

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Sciences

Ecole Doctorale ED 258

EA 3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies – Laboratoire de Physiologie
Mitochondriale

N°.....

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Emilie MALISSEIN

Le 23 mars 2005

**Physiologie mitochondriale et apoptose couplée à la
signalisation du récepteur à l'antigène des lymphocytes B**

Directeur de Thèse : D TROUTAUD, Professeur, Université de Limoges

Soutenance devant le jury composé de :

Président **Marie-Hélène Ratinaud** - Professeur, Université de Limoges

Rapporteurs **Angelita Rebollo** - DR INSERM, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Université Paris VI
Alphonse Garcia - DR, Institut Pasteur, Paris

Examineur **Marie-Lise Gougeon** - DR, Institut Pasteur, Paris

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement ma directrice de thèse Danielle Troutaud, qui a dirigé l'ensemble de ce travail avec enthousiasme et énergie. Merci de m'avoir fait confiance et encouragé tout au long de ces quatre années. La qualité de son encadrement tant sur le plan scientifique qu'humain, sa rigueur et son engouement pour la recherche m'ont conduit à tirer le meilleur de moi-même. Son expérience et ses conseils avisés me serviront sans aucun doute pour la suite. Avec toute mon amitié.

Je remercie Madame Angelita Rebollo et Monsieur Alphonse Garcia de m'avoir fait l'honneur d'apporter leur jugement expert sur ce travail. Je tiens également à exprimer mes remerciements à Madame Marie-Lise Gougeon pour avoir eu l'amabilité d'accepter de juger ce travail en tant qu'examinateur. Enfin, je suis particulièrement ravie que Madame Marie-Hélène Ratinaud ait accepté de présider mon jury de thèse. Je la remercie de m'avoir accueillie chaleureusement dans son équipe de recherche et de m'avoir donné les moyens de réaliser ma thèse.

Je remercie très amicalement Mireille Verdier pour son aide et son soutien au quotidien. Ses encouragements constants, sa disponibilité sans faille, sa gentillesse et son incroyable bonne humeur ont été pour moi une aide précieuse pour la réalisation de ce travail. Merci ma petite Mimi, à tes côtés, ce fût aussi un réel plaisir de m'initier à l'enseignement. Je remercie mon cher collègue Tom-Tom et je lui souhaite bonne chance dans sa recherche post-doctorale. Encore merci, chers collègues de labo. Je garderai un très bon souvenir de nos petits repas bien sympathiques, arrosés des expressions de Mimi dont elle-seule a le secret...ah, diable vert !

Mes remerciements vont aussi à tous mes collègues du 3ème et du 2nd. Mention spéciale pour mes deux copines : Sophie (accroche-toi !) et Claire qui ont eu le mérite l'une et l'autre, à la pause café, de trouver des réponses à mes nombreuses questions existentielles ! Vous avez été adorables et je vous souhaite plein de bonheur et bonne chance pour tous vos projets. Je remercie et souhaite également bonne route à mes deux anciens collègues : Isa (merci pour tes web-encouragements) et Krap.

Je tiens aussi à remercier Frédéric Dessauge et Julien Guernon de l'Institut Pasteur, qui ont toujours répondu très chaleureusement à mes mails et échangé avec moi conseils et protocoles de manip.

J'ai une pensée particulière pour mon amie de toujours, Emilie. Des bancs du lycée à ceux de la Fac, des rires aux larmes, que de bons moments passés ensemble ! Je te remercie vraiment pour tes encouragements et ton écoute de tous les instants.

Je remercie mes grands-parents et ma belle-famille. Avec votre soutien à tous, j'ai toujours avancé...Mille Merci.

Mes pensées les plus chères reviendront à mes parents qui m'ont soutenue pendant toutes ces années, chacun à leur manière, et sans qui je n'aurais pas pu aller au bout de mes projets. Je vous aime.

Enfin, je dédie ce travail à Nicolas, mon tendre amour et mon doudou chéri ; heureusement que tu as été là, que tu es là et je sais que tu seras là encore pour tous les moments heureux que nous avons à partager ensemble...

SOMMAIRE

SOMMAIRE	4
ABREVIATIONS	7
Table des illustrations	9
INTRODUCTION GENERALE	11
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	15
Partie 1 : Mécanismes et contrôle de l'apoptose	16
I- Caractéristiques générales de l'apoptose	16
II- Les gènes de l'apoptose	19
II.1- Les homologues mammifères de <i>ced-3</i>	20
II.2- Les homologues mammifères de <i>ced-9</i>	25
II.3- Les homologues mammifères de <i>ced-4</i>	25
II.4- Les homologues mammifères de <i>egl-1</i>	26
III- La voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose	26
III.1- Altérations mitochondriales et conséquences physiologiques.....	26
III.2- Voie mitochondriale caspase-dépendante.....	31
III.3- Voie mitochondriale caspase-indépendante.....	32
IV- La voie extrinsèque de l'apoptose (voie des récepteurs de mort)	33
V- Contrôle de la phase mitochondriale de l'apoptose : rôle des protéines de la famille Bcl-2	36
V.1- Classification, activation et régulation des protéines de la famille Bcl-2.....	36
V.2- La régulation de la perméabilité mitochondriale par les protéines de la famille Bcl-2.....	43
VI- Les protéines inhibitrices de l'apoptose	47
Partie 2 : Signalisation du BCR, dualité fonctionnelle et apoptose	48

I- Le récepteur à l'antigène des cellules B ou BCR.....	48
II- Signalisation du BCR (B mature).....	52
II.1- Initiation du signal.....	52
II.2- Propagation du signal.....	55
II.2.1- La voie de la PI3-K.....	55
II.2.2- La voie de la PLC- γ 2.....	57
II.2.3- Voie des MAP-Kinases.....	58
II.3- Intégration du signal.....	60
II.4- Importance des rafts dans la signalisation du BCR.....	61
II.5- Modulation de la signalisation du BCR.....	62
II.6- Apoptose et ontogenèse B : dualité fonctionnelle du BCR.....	65
 Partie 3 : Implication de la protéine Bad dans la signalisation du BCR et le devenir du lymphocyte B ?.....	 71
I- Phosphorylation/Déphosphorylation des protéines de la famille Bcl-2.....	71
I.1- Phosphorylation et fonctionnalité des protéines de la famille Bcl-2.....	71
I.2- Les kinases et les phosphatases impliquées dans les phosphorylations /déphosphorylations de Bad et Bcl-2.....	74
II- Mécanisme de l'apoptose induite par le BCR : implication du statut de phosphorylation de Bad ?.....	78
 RESULTATS.....	 81
 Partie 1 : Etat de phosphorylation de Bad et apoptose induite par le BCR dans la lignée murine B immature WEHI-231.....	 82
I- Mise en place d'un modèle de synchronisation des cellules WEHI-231 en culture pour l'étude de la réponse apoptotique induite par le BCR.....	84
I.1-Protocole expérimental.....	84
I.2- Résultats/Discussion.....	85
I.2.1- Choix des conditions de pré-culture.....	85
I.2.2- Comparaison modèle synchronisé et non synchronisé.....	86
II- ARTICLE 1.....	89

III- Etude de la baisse du potentiel membranaire mitochondrial au cours de l'apoptose induite par la signalisation du BCR dans les cellules WEHI-231.	90
III.1- Protocole expérimental	92
III.2- Résultats/Discussion	92
IV- Conclusion	96
<i>Partie 2 : Trafic intracellulaire de Bad et apoptose induite par le BCR dans la lignée murine B immature WEHI-231</i>	<i>97</i>
I - ARTICLE 2	99
II- Complément d'étude de la translocation cytosol/mitochondrie de la protéine Bad au cours de l'apoptose induite par le BCR dans les cellules WEHI-231	100
II.1- Protocole expérimental	100
II.2-Résultats/Discussion	101
II.2.1- Comparaison des 2 protocoles de fractionnement subcellulaire	101
II.2.2- Analyse de l'expression de Bad	101
II.2.3- Analyse de la translocation de l'AIF	102
III-Conclusion	106
<i>DISCUSSION GENERALE -PERSPECTIVES</i>	<i>107</i>
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	<i>118</i>
<i>ANNEXES</i>	<i>148</i>

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
AIF	Apoptosis inducing factor
ANT	Adenine nucleotide translocase
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR	B cell receptor
BH	Bcl-2 homology
CARD	Caspase recruitment domain
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CsA	Cyclosporine A
Cyp-D	Cyclophiline D
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DiOC ₆ (3)	3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide
DISC	Death inducing signaling complex
DR	Death receptor
EndoG	Endonucléase G
FADD	Fas associated death domain
FasL	Fas ligand
FLIP	FLICE inhibitory protein
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
IAP	Inhibitor of apoptosis
Ig	Immunoglobuline
IP	Iodure de propidium
ITAM	Immunoreceptor tyrosine based activation motif

ITIM	Immunorecepteur tyrosine based inhibitory motif
JC-1	5,5', 6,6'- tetrachloro-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide
kDa	Kilo dalton
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mIg	Immunoglobuline membranaire
NF- κ B	Nuclear factor B
PBS	Phosphate buffer saline
PH	Plecstrin homology
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PLC γ 2	Phospholipase C γ 2
PS	Phosphatidylsérines
PTP	Pore de transition de perméabilité
RE	Réticulum endoplasmique
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIMP	Soluble inter-membrane mitochondrial proteins
tBid	Truncated Bid
TCR	T cell receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
VDAC	Voltage-dependent anion channel
$\Delta\psi_m$	Potentiel membranaire mitochondrial

Table des illustrations

Liste des Figures

- Figure 1** Illustration des principales altérations de la cellule pendant l'apoptose.
- Figure 2** Les protéines impliquées dans l'apoptose chez *C.elegans* et chez les mammifères.
- Figure 3** Mécanisme général d'activation des caspases.
- Figure 4** Les caspases initiatrices et effectrices.
- Figure 5** Configuration minimale du pore de transition de perméabilité membranaire mitochondrial.
- Figure 6** Modèles possibles de la perméabilisation membranaire mitochondriale observée pendant l'apoptose.
- Figure 7** Représentation schématique de la formation de l'apoptosome.
- Figure 8** Voies d'activation de Fas dans les cellules de type I ou de type II.
- Figure 9** Les membres de la famille Bcl-2.
- Figure 10** Structures moléculaires de Bcl-x_L/Bcl-2 obtenues par diffraction aux rayons X.
- Figure 11** Localisation/translocation des protéines de la famille Bcl-2 suite à un signal apoptotique.
- Figure 12** Deux modèles possibles expliquant le rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans la perméabilisation membranaire mitochondriale.
- Figure 13** Structure du récepteur à l'antigène des lymphocytes B.
- Figure 14** Initiation de la signalisation du BCR.
- Figure 15** Les différentes voies de signalisation du BCR.
- Figure 16** Représentation schématique des co-récepteurs du BCR.
- Figure 17** Mécanismes de sélection négative pendant le développement des lymphocytes B.

- Figure 18** Le BCR et les rafts dans le développement B.
- Figure 19** Modèle schématique de l'inactivation de Bad.
- Figure 20** Résumé des différents sites de phosphorylation identifiés chez la protéine Bad murine.
- Figure 21** Modèle hypothétique du fonctionnement de la « Bad phosphatase ».
- Figure 22** Analyse mathématique des cycles cellulaires correspondant aux 2 conditions de pré-culture testées pour les cellules WEHI-231.
- Figure 23** Mesure, par le double marquage Annexine-V-FITC/IP, de l'apoptose suite au pontage du BCR, dans les cellules WEHI-231.
- Figure 24** Mise en évidence, par microscopie confocale, d'altérations liées à l'apoptose induite par le BCR.
- Figure 25** Mesure de la baisse du potentiel membranaire mitochondrial par le marquage à la sonde JC1, lors de l'apoptose induite à 48h dans les cellules WEHI-231.
- Figure 26** Analyse comparative des 2 protocoles de fractionnement subcellulaire testés.
- Figure 27** Analyse par Western Blot de l'expression des protéines VDAC, 14-3-3 et Bad dans différents compartiments cellulaires des cellules WEHI-231 au cours de la stimulation du BCR.
- Figure 28** Analyse par Western Blot de l'expression et de la translocation de l'AIF dans les cellules WEHI-231 stimulées par le pontage du BCR.

Liste des Tableaux

- Tableau 1** Répartition du nombre de cellules dans chaque phase du cycle pour les 2 conditions de pré-culture testées chez les cellules WEHI-231
- Tableau 2** Pourcentages de cellules WEHI-231 en apoptose (baisse du potentiel membranaire mitochondrial révélée par le marquage à la sonde JC1) après 48h de stimulation par des anti-IgM.

INTRODUCTION GENERALE

L'apoptose joue un rôle déterminant dans le développement (embryogenèse) et l'homéostasie tissulaire. Paradoxalement, elle contribue à la « sculpture du vivant » à l'image du modelage progressif de nos doigts « transformant une moufle en gant » (Ameisen., 1999). Au niveau du système immunitaire, elle participe au processus de sélection négative des lymphocytes (élimination des lymphocytes immatures auto-réactifs), configurant un système de défense spécifique capable de dialoguer avec le soi sans l'agresser. Par ailleurs, elle régule l'homéostasie lymphocytaire en périphérie, permettant la suppression en fin de réponse immune des cellules immunitaires excédentaires produites lors de l'expansion clonale. En conséquence, elle assure en périphérie le maintien de la diversité du répertoire de reconnaissance antigénique.

Au cours de l'apoptose, des altérations majeures de la perméabilité membranaire mitochondriale (dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, $\Delta\psi_m$) se produisent et sont déterminantes dans le déclenchement du processus. Ces modifications sont contrôlées par les protéines pro ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, protéines dont l'activité est elle-même régulée notamment par leur statut de phosphorylation et leur localisation intracellulaire. Pour la protéine pro-apoptotique Bad, des événements de phosphorylation sur résidus sérines ont été décrits suite à l'activation de kinases (voies PI3K/Akt, PKC, Erk1/2, PKA) par des facteurs de croissance et aboutissent à l'inhibition de sa fonction. Inversement, sa déphosphorylation par des phosphatases cellulaires comme PP1 α permet de lever cette inhibition, restaurant sa fonction pro-apoptotique. De plus, le trafic intracellulaire semble dépendant de cet état de phosphorylation : Bad phosphorylé (forme inactive) serait préférentiellement retrouvé dans le cytosol, associé à la protéine 14-3-3, et sa déphosphorylation (forme active) lors d'un signal de mort induirait sa translocation à la mitochondrie. Par ailleurs, il est actuellement proposé que l'inactivation de Bad puisse aussi être réalisée, indépendamment de sa phosphorylation, par la séquestration de la protéine sous forme non phosphorylée dans des compartiments subcellulaires (comme les rafts).

Le devenir des lymphocytes B matures et immatures est dirigé par la signalisation du récepteur à l'antigène des cellules B ou BCR, qui les conduit respectivement vers deux voies physiologiques distinctes : l'activation/prolifération et l'apoptose. L'apoptose a lieu dans la moelle osseuse, notamment lors de la stimulation du BCR des lymphocytes B immatures par un antigène (auto-Ag) et permet donc l'élimination de lymphocytes B potentiellement auto-réactifs avant leur exportation en périphérie (processus de sélection négative). Les mécanismes moléculaires décisifs dans l'orientation du programme cellulaire vers l'une ou

l'autre voie restent encore incompris mais plusieurs hypothèses sont envisagées. En particulier, le devenir des lymphocytes B serait déterminé par le bilan de l'équilibre entre des signaux de vie et de mort ; ces signaux initiés par l'activation du BCR seraient consécutifs à des différences intrinsèques structurales et/ou biochimiques caractérisant les lymphocytes B matures et immatures (structure des rafts, profil d'expression de kinases, de molécules adaptatrices et/ou de co-récepteurs (CD19, CD22), expression de protéines de la famille Bcl-2...).

La mort cellulaire programmée via le BCR a été mise en évidence initialement à partir de lignées de cellules lymphocytaires B immatures issues de lymphoblastomes, comme la lignée murine WEHI-231, où il a été montré que le pontage du BCR (IgM membranaire) entraîne l'arrêt de la croissance et l'apoptose des cellules. Ce programme d'apoptose induit par la signalisation du BCR n'implique pas, contrairement aux lymphocytes T, l'activation de la voie des récepteurs de mort (Fas/CD95) mais une phase mitochondriale dont l'initiation est caspase-indépendante. Le rôle déclenchant joué par des altérations physiologiques de la mitochondrie dans l'apoptose des lymphocytes B immatures a été mis en évidence notamment par l'effet protecteur de la surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-x_L, Bcl-2). Cependant, le déterminisme de ces dysfonctionnements et leur lien avec les voies de signalisation en aval du BCR restaient à préciser.

Plusieurs travaux ont recherché l'existence de différences fonctionnelles liées à la transduction du signal par le BCR entre les lymphocytes B matures et immatures. Il ressort de certains résultats que des kinases (parmi lesquelles PI3K, Erk1/2, PKC), impliquées dans cette signalisation, sont régulées négativement lors du pontage du BCR dans les lymphocytes B immatures comparativement aux cellules B matures. Or, nous avons remarqué que la plupart de ces kinases étaient aussi impliquées dans des événements de phosphorylation de Bad. Cette observation nous a conduit à émettre l'hypothèse que certaines voies de la signalisation du BCR pouvaient converger en partie vers Bad. Ainsi, la régulation différentielle de la fonction de Bad lors du pontage du BCR dans les lymphocytes B matures et immatures pouvait expliquer, du moins en partie, le devenir différent des cellules B.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc souhaité apporter une contribution à l'amélioration de la compréhension des mécanismes moléculaires reliant la signalisation du BCR aux événements mitochondriaux de l'apoptose, dans les lymphocytes B immatures. Nous avons choisi la lignée cellulaire murine B immature, WEHI-231, comme modèle

biologique, car elle est classiquement utilisée pour aborder *in vitro* les mécanismes *in vivo* de la sélection négative des lymphocytes B immatures.

Plus particulièrement, il nous a paru intéressant de pouvoir établir une corrélation entre les évènements de phosphorylation/déphosphorylation de Bad, son activation et les altérations mitochondriales induites dans des lymphocytes B immatures lors de l'apoptose médiée par le BCR.

Pour ce faire, ce travail a été réalisé en plusieurs étapes :

- la finalisation d'un modèle d'étude de l'apoptose induite par le pontage du BCR sur la lignée murine lymphocytaire B (WEHI-231),
- l'étude du statut de phosphorylation de la protéine Bad lors de l'apoptose induite par le BCR et la recherche de l'implication de kinases et phosphatases (WEHI-231),
- l'étude du trafic intracellulaire de la protéine Bad et la recherche d'éventuels partenaires lors de la signalisation du BCR dans les lymphocytes B immatures (WEHI-231),
- enfin, une étude préliminaire a été initiée chez la souris sur la signification physiologique des résultats obtenus à partir de la lignée cellulaire murine, WEHI-231. Ce travail a été réalisé à partir de cellules B purifiées fraîchement isolées ou issues de cultures primaires.

Dans ce mémoire, nous commencerons par faire un exposé bibliographique, présentant l'apoptose d'un point de vue général, ses principaux acteurs moléculaires, ses grandes voies de signalisation ainsi que ses régulations. Nous poursuivrons en décrivant la signalisation du BCR et sa dualité fonctionnelle. Enfin nous développerons les arguments théoriques et expérimentaux à la base de notre hypothèse de travail.

Les méthodes, résultats et discussions de ce travail seront présentés sous forme d'articles.

Enfin, nous terminerons ce manuscrit par une discussion générale et nous exposerons des perspectives à notre travail.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Mécanismes et contrôle de l'apoptose

I- Caractéristiques générales de l'apoptose

Le terme d'apoptose ou mort cellulaire programmée a été introduit en 1972 pour définir une forme de mort cellulaire morphologiquement, biochimiquement et moléculairement différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire connue jusqu'alors (Kerr et coll., 1972). « Apoptose » est un nom qui signifie « chute » en grec ancien et qui a été utilisé en référence à la chute des feuilles des arbres en automne, la chute des pétales de fleurs qui se fanent, une métaphore pour une mort à la fois naturelle, inéluctable et programmée (Ameisen., 1999).

L'apoptose et la nécrose sont différentes d'un point de vue mécanistique : la nécrose est la conséquence passive d'une agression de la cellule alors que l'apoptose est parfaitement intégrée dans les processus physiologiques normaux de la cellule. L'apoptose est une réponse hautement conservée des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères. Elle joue un rôle central dans le développement et dans le maintien de l'homéostasie. Elle est impliquée dans le renouvellement tissulaire et le développement du système nerveux. Elle participe notamment à l'élimination de cellules surnuméraires, lors du développement embryonnaire. Toute anomalie de l'apoptose peut être responsable du déclenchement et de la progression de nombreuses pathologies. Une résistance accrue entraîne l'apparition de maladies comme les cancers ou syndromes lymphoprolifératifs ; à l'inverse, un excès d'apoptose participe à l'émergence de maladies neurodégénératives ou de syndromes d'immunodéficiences comme le SIDA (Groux H et coll., 1991 ; Mapara et coll., 1993 ; Fisher., 1994 ; Griffith et coll., 1995).

La nécrose est une mort « désordonnée » et accidentelle. Elle se caractérise par une augmentation du volume cellulaire, la perte précoce de l'intégrité membranaire et la dispersion du contenu cellulaire provoquant une lésion et une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant. Par opposition, l'apoptose est un processus de mort cellulaire

programmée rapide (quelques heures) et discrète mettant en oeuvre une véritable machinerie interne de destruction de la cellule, procédant par différentes phases chronologiques (Kerr et coll., 1972; Duvall and Wyllie., 1986) (Figure 1).

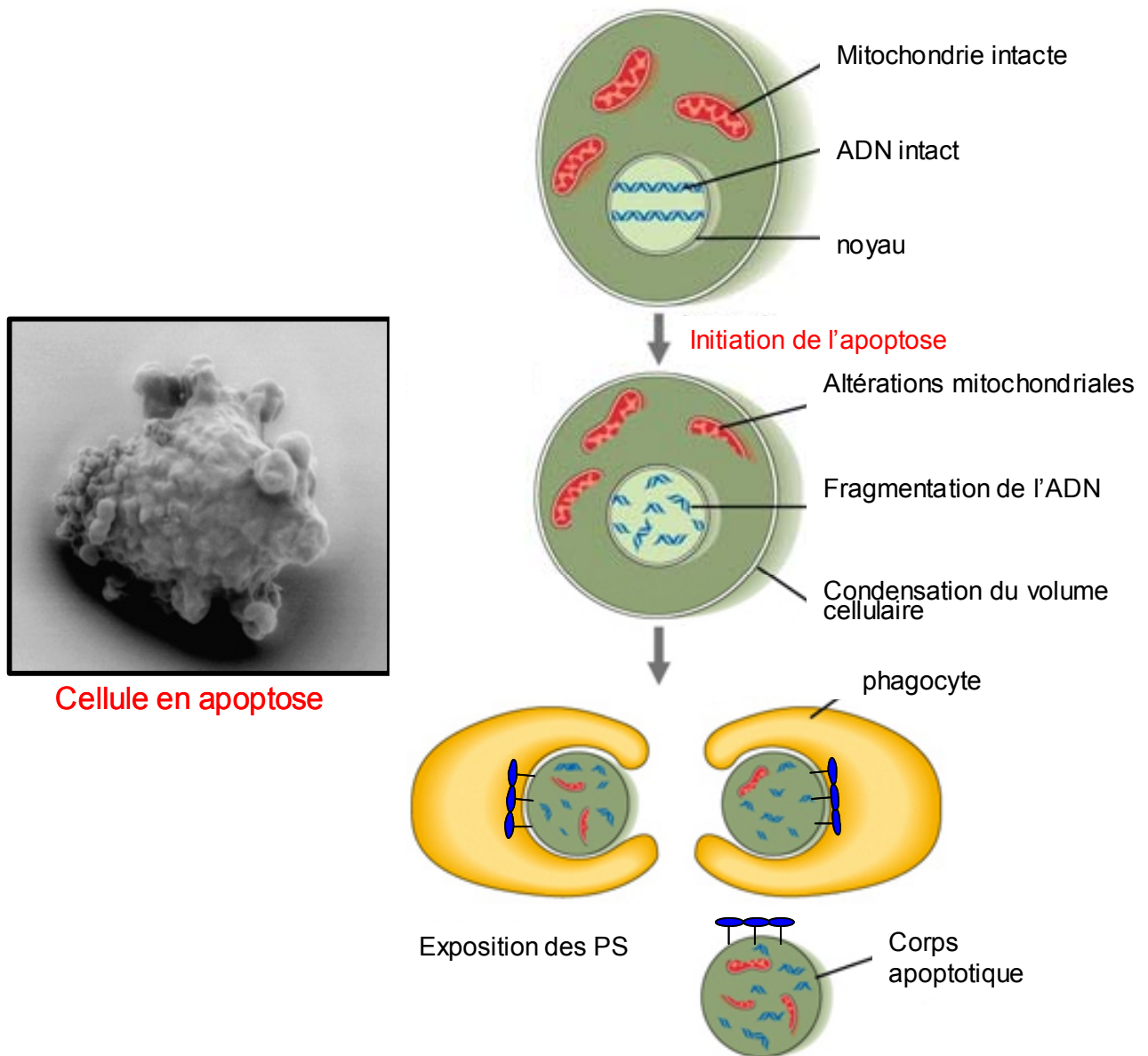


Figure 1 : Illustration des principales altérations de la cellule pendant l'apoptose.

Tout d'abord, les cellules en apoptose vont s'isoler des autres cellules (perte des contacts). On remarque une condensation du cytoplasme et une diminution significative du volume cellulaire, se traduisant aussi par des modifications de réfringence de la cellule. Les mitochondries des cellules apoptotiques subissent des modifications majeures : diminution du potentiel membranaire mitochondrial, modification de la perméabilité membranaire mitochondriale (Marchetti et coll., 1996 ; Zamzami et coll., 1996) et relargage dans le cytoplasme de molécules apoptogènes comme le cytochrome c (Kluck et coll., 1997 ; Yang et coll., 1997). Après la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, les cellules atteignent un point de non-retour. La chromatine se condense en volumineux amas. A la différence de la nécrose où le clivage de l'ADN a lieu de manière aléatoire libérant des fragments de grande taille, on observe, dans le cas de l'apoptose, une fragmentation régulière de l'ADN. Des endonucléases génèrent des fragments d'ADN réguliers multiples de 180 paires de bases (pb) (Wyllie., 1980 ; Wyllie et coll., 1984) donnant un profil caractéristique dit en « barreaux d'échelle », après électrophorèse de l'ADN. Finalement, la membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. *In vivo*, ces corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par les cellules voisines, aboutissant à l'élimination silencieuse de la cellule. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement, notamment grâce à la translocation des molécules de phosphatidylsérines du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique (Platt et coll., 1998). La phagocytose permet d'éviter toute libération du contenu cellulaire et de prévenir ainsi d'éventuelles lésions des cellules voisines. *In vitro*, les cellules et corps apoptotiques finissent par être lysés, conduisant à une « nécrose secondaire ».

Les techniques pour identifier, quantifier et caractériser ces altérations sont nombreuses mais la cytométrie en flux reste une méthode de choix pour étudier la cascade apoptotique en fonction du type cellulaire, de l'inducteur de mort et de la cinétique. En effet, la condensation du cytoplasme et la diminution du volume cellulaire peuvent être mesurées par l'analyse des cytogrammes (taille/structure), la transition de perméabilité membranaire mitochondriale peut être appréhendée par la perte de capacité des mitochondries à accumuler des sondes cationiques lipophiles comme la DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide) ou le JC-1 (5,5', 6,6'- tetrachloro-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide). En utilisant l'Annexine-V (molécule ayant une affinité pour les phosphatidylsérines) couplée au FITC, et

en combinaison au iodure de propidium (qui ne pénètre pas dans les cellules saines), on peut distinguer nettement les cellules vivantes (Annexine⁻/IP⁻) des cellules en apoptose (Annexine⁺/IP⁻) ou en nécrose (Annexine⁺/IP⁺) (Lecoeur et Gougeon., 1999 ; Vermes et coll., 2000).

L'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est pas altérée au cours du processus, du moins initialement, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire et ainsi de prévenir tout dommage infligé aux tissus alentours. Ainsi, l'absence de réaction inflammatoire et le rapide « nettoyage » réalisé par les phagocytes font de l'apoptose une mort « silencieuse », expliquant la relative difficulté à la mettre en évidence *in vivo* même dans des tissus caractérisés par une apoptose massive (pour exemple le thymus).

II- Les gènes de l'apoptose

La majeure partie de nos connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'apoptose provient des travaux menés sur le nématode *Caenorhabditis elegans* (Hengartner et Horvitz., 1994). Ces recherches ont montré que sur les 1090 cellules produites durant le développement embryonnaire de *C. elegans*, 131 meurent, certaines moins d'une heure après le dédoublement cellulaire qui leur a donné naissance. Ces cellules meurent par apoptose. L'analyse de mutants génétiques de *C. elegans* a permis de mettre en évidence 3 gènes qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de cette mort cellulaire programmée. Ils ont été nommés : *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* (*ced* : **c**ell **d**eath **a**bnormal) (Figure 2). Dans les mutants où soit *ced-3* soit *ced-4* sont incapables de fonctionner, l'ensemble des 1090 cellules survit ; à l'inverse, dans les mutants où *ced-9* ne s'exprime pas, l'ensemble des cellules de l'embryon meurt. Les gènes *ced-4* et *ced-3* sont donc requis pour l'initiation et l'exécution de l'apoptose. Le gène *ced-9* agit en amont des gènes *ced-4* et *ced-3* et inhibe leurs activités pro-apoptotiques. Enfin, un troisième gène *egl-1* (*egg-laying defective*) a été mis en évidence, il agit en amont des gènes *ced-9*, *ced-4* et *ced-3* et régule négativement l'activité de *ced-9* (Metzstein et coll., 1998).

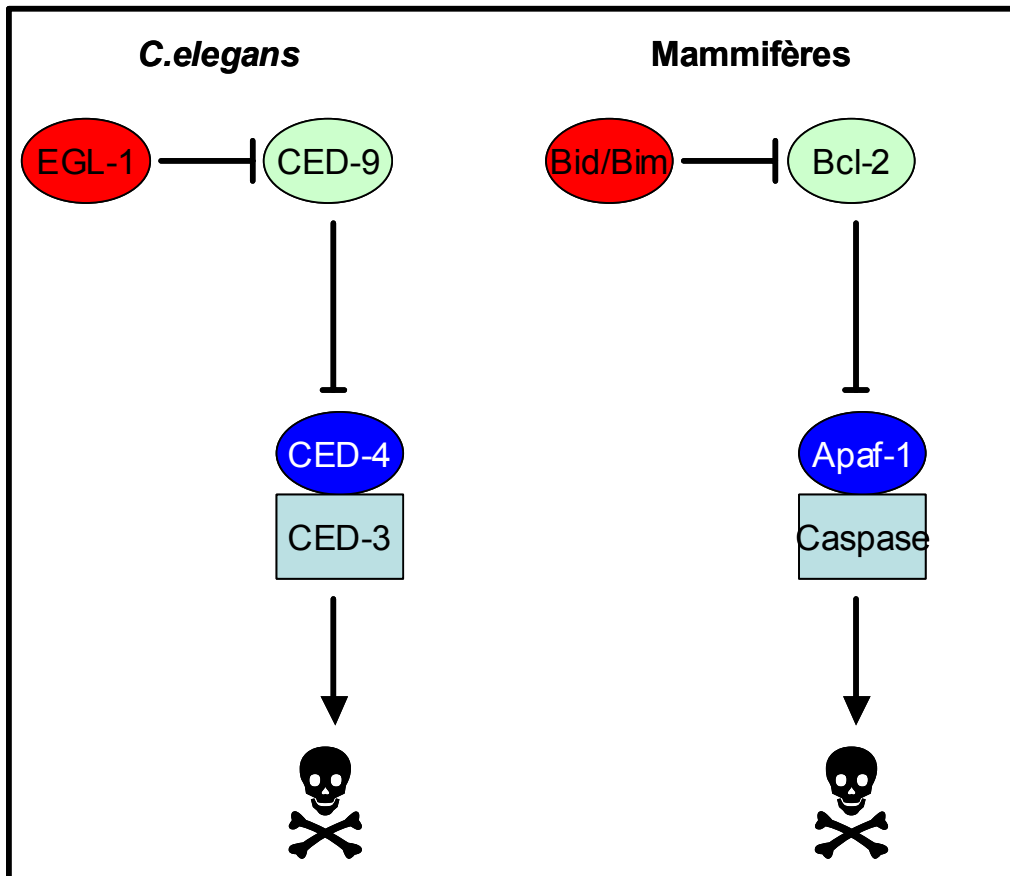


Figure 2 : Les protéines impliquées dans l'apoptose chez *C. elegans* et chez les mammifères (Adapté de Couzinet et coll., 2002).

Les analyses fonctionnelles des interactions des produits de ces gènes ont permis de définir un modèle d'activation de l'apoptose. La protéine Ced-9, en interagissant avec la protéine Ced-4, l'empêche d'activer la protéine Ced-3. Suite à un stimulus de mort cellulaire, la protéine Egl-1 se lie à Ced-9 et l'inactive ; la protéine Ced-4 est alors libérée et peut s'oligomériser avec Ced-3, ce qui provoque son auto-activation (Figure 2).

Les homologues des gènes *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* et *egl-1* ont été identifiés chez les mammifères et correspondent chacun à une famille de gènes, ce qui aboutit à une grande diversification d'action de ces molécules pro ou anti-apoptotiques.

II.1- Les homologues mammifères de *ced-3*

Le gène *ced-3* code pour une cystéine protéase homologue à l'enzyme de conversion de l'interleukine-1- β humaine ou ICE. Cette protéine, rebaptisée plus tard caspase-1, constitue en fait le premier membre d'une famille de protéases nommées caspases (cysteinyll aspartyl proteases). On connaît aujourd'hui 14 caspases différentes dont 11 chez l'Homme (Ferri KF, 2000). Les caspases sont exprimées sous forme de pro-enzymes inactives appelées formes zymogènes ou pro-caspases. Elles sont constituées d'un pro-domaine N-terminal, d'une grande sous-unité d'environ 20 kDa, portant le site catalytique avec un motif conservé QACxG et d'une petite sous-unité C-terminale d'environ 10 kDa. Leur activation nécessite un clivage en deux étapes successives, libérant tout d'abord la petite sous unité puis la grande. Ceci aboutit à la formation de la forme active de l'enzyme, tétramère constitué de deux hétérodimères, possédant donc deux sites catalytiques (Wolf et Green., 1999). Les caspases reconnaissent puis clivent leurs substrats au niveau d'un résidu aspartique dans la partie C-terminale de la chaîne polypeptidique (Nicholson et Thornberry., 1997). La présence de résidus aspartiques dans la séquence des formes inactives des caspases montre qu'elles peuvent s'autoactiver ou être activées par d'autres caspases conduisant à une amplification en cascade (Stennicke et Salvesen., 1998) (Figure 3).

On distingue les caspases possédant un pro-domaine long dites caspases initiatrices (caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10 et -12) et les caspases qui possèdent un pro-domaine court dites caspases effectrices (caspases -3, -6, -7 et -11). L'activation des caspases initiatrices est déclenchée suite à leur liaison à des molécules adaptatrices par des motifs d'interaction, contenus dans leur pro-domaine. En effet, les prodomaines des caspases 8 et 10 contiennent des domaines DED (death effector domains) et les prodomaines des caspases 1, 2, 4 et 9 possèdent un domaine CARD (caspase recruitment domain). Ces motifs leur permettent d'interagir avec des protéines comme MORT1/FADD ou Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1), ce qui conduit finalement à leur clivage (Figure 4). Les caspases effectrices se situent en aval du processus apoptotique. Leur activation par les caspases initiatrices aboutit à un fonctionnement dit en cascade, conduisant à la dégradation d'un grand nombre de protéines nécessaires à la vie de la cellule (Earnshaw et coll., 1999). Le rôle déterminant des caspases dans le développement embryonnaire et dans la mort cellulaire programmée qu'elles initient, a été confirmé dans les modèles murins d'inactivation génique. Les souris invalidées pour le gène *caspase-3* sont plus petites que les souris sauvages et meurent entre la première et la troisième semaine après la naissance. Les anomalies les plus marquées semblent sélectivement localisées au niveau du système nerveux central : les

animaux *caspase 3*^{-/-} souffrent d'une hyperplasie cérébrale massive. Les souris *caspase 8*^{-/-} se développent normalement durant les 11 premiers jours suivant la fécondation, puis meurent, probablement des suites de malformations cardiaques importantes. Le phénotype des souris *caspase 9*^{-/-} est semblable mais cependant plus sévère que celui des souris *caspase 3*^{-/-}. Ces souris meurent au 16^{ème} jour de développement et souffrent de malformations cérébrales (Los et coll., 1999).

Les caspases clivent de nombreuses protéines à l'origine de la plupart d'évènements morphologiques, structuraux ou biochimiques de l'apoptose. Ces substrats regroupent un large panel de protéines cellulaires : cytoplasmiques (actine, β -caténine...), nucléaires (lamine A et B, Mdm2...), des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN (PARP, ARN polymérase I, ADN topoisomérase I...), des protéines kinases (PKC, MAP/ERK kinases...), des protéines impliquées dans la transduction du signal (NF- κ B, cytokines...), des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et la prolifération (p27^{Kip1}, pRB...) et des protéines dont le clivage a un rôle direct dans l'apoptose (caspases, protéines de la famille Bcl-2) (Earnshaw., 1999).

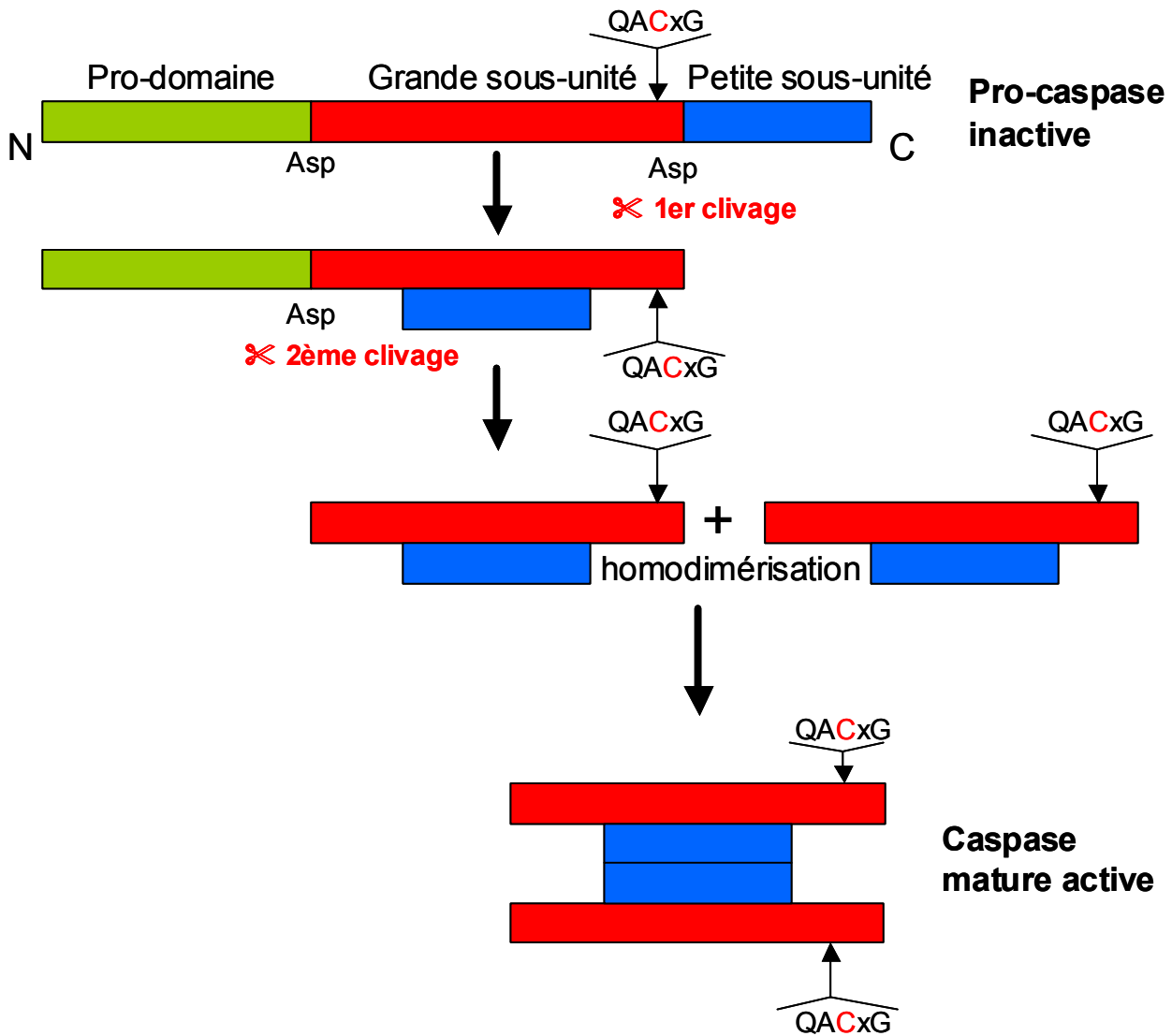


Figure 3 : Mécanisme général d'activation des caspases (Adapté de Couzinet et coll., 2002).

Les caspases possèdent un site catalytique comprenant un motif QACxG où le résidu cystéine est directement impliqué dans le processus catalytique. (Asp : résidu aspartique)

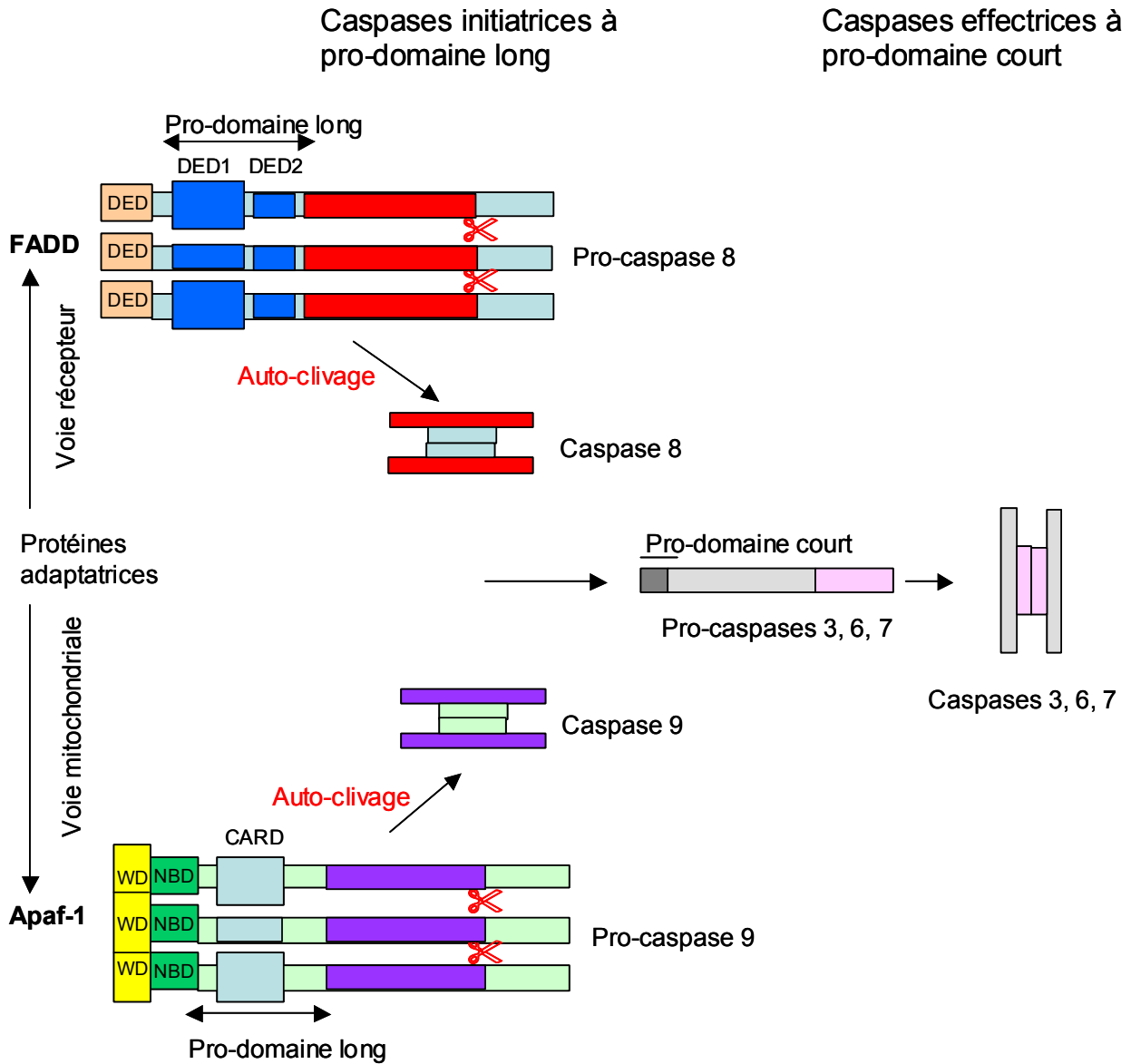


Figure 4 : Les caspases initiatrices et effectrices (Adapté de Couzinet et coll., 2002).

DED : **d**eath **e**ffector **d**omain ; CARD : **c**aspase **r**ecruitment **d**omain ; FADD : **f**as-**a**ssociated **d**eath **d**omain ; NBD : **n**ucleotide **b**inding **d**omain ; WD : 40 répétitions tryptophane/acide aspartique.

II.2- Les homologues mammifères de *ced-9*

Les homologues mammifères du gène *ced-9* correspondent à une famille de gènes codant pour les protéines de la famille Bcl-2, régulateurs majeurs de l'apoptose notamment par leur action au niveau de la mitochondrie (pour détail voir Partie 1 ; paragraphe V-1).

II.3- Les homologues mammifères de *ced-4*

L'homologue mammifère du gène *ced-4* a été découvert en 1997 par l'équipe de Wang (Zou et coll., 1997) et il correspond à l'*Apaf-1* (apoptotic protease activating factor 1). L'*Apaf-1* est un régulateur de l'apoptose au niveau des phases post-mitochondriales et son action est dépendante de son association au cytochrome c, pour former une structure particulière nommée apoptosome, elle-même responsable d'une activation en cascade de certaines caspases (caspase-3). Des embryons déficients en *Apaf-1* meurent avant la naissance. Ils présentent une réduction importante de l'apoptose au niveau du cerveau et des altérations dramatiques des yeux et du visage (Cecconi., 1999). Comparativement aux gènes *ced-3* et *ced-9*, différents auteurs ont envisagé l'existence de plusieurs protéines homologues à *Apaf-1* chez les mammifères. A ce jour, seulement 4 protéines ont été identifiées :

- la protéine FLASH (FLICE-associated huge protein) découverte par Imai et coll., en 1999 ; elle interviendrait dans l'activation de la caspase 8,
- la protéine Nod1/CARD4 (nucleotide oligomerization domain-containing protein 1) et la protéine Nod2 identifiées respectivement en 1999 par Inohara et coll., et Bertin et coll., et en 2001 par Ogura et coll. Ces 2 protéines auraient pour fonction d'activer la voie NF- κ B,
- la protéine Nac/Defcap (Nac : NBD and CARD ; Defcap : death effector filament forming *ced-4* like apoptosis protein) identifiée par Chu et coll. et Hlaing et coll., en 2001. Son interaction avec *Apaf-1*, induite par le cytochrome c, conduit à la formation d'un méga-complexe qui favorise le recrutement et la protéolyse de la pro-caspase 9. Plus récemment, Wang et coll. ont découvert une nouvelle protéine appelée PYNOD qui aurait un rôle d'inhibiteur de l'apoptose à la différence d'*Apaf-1*. Elle empêcherait l'activation de NF- κ B et la maturation de la caspase 1 lors d'un signal apoptotique (Wang et coll., 2004).

II.4- Les homologues mammifères de *egl-1*

Le gène *egl-1* a des homologies fonctionnelles et moléculaires avec les membres de la sous famille « BH3-only » des protéines de la famille Bcl-2 (pour détail voir Partie 1 ; paragraphe V-1).

III- La voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose

On distingue 2 grandes voies de signalisation aboutissant à la mort. La première, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. La deuxième voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.

III.1- Altérations mitochondriales et conséquences physiologiques

Depuis une dizaine d'années, il est maintenant clairement établi que la mitochondrie, organe producteur de l'énergie de la cellule (ATP), joue un rôle clé dans l'apoptose. Son intervention dans ce processus ne s'explique pas par une « simple perte de fonction » ayant pour conséquence un déficit énergétique, mais est reconnue plutôt comme un mécanisme actif s'accompagnant de profondes altérations. On observe une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale - liée à une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) - et la libération dans le cytoplasme de protéines apoptogènes comme le cytochrome c.

Le concept du mégapore mitochondrial appelé PTP (pore de transition de perméabilité) responsable du relargage de facteurs apoptotiques a été récemment décrit. La composition exacte du PTP reste encore à déterminer. Il se composerait d'un complexe polyprotéique avec des composants localisés dans les 2 membranes mitochondriales (externe/interne), dans l'espace intermembranaire et dans la matrice mitochondriale.

Le regroupement de différents travaux permet d'établir une configuration minimale au PTP qui regrouperait : la translocase des nucléotides adényliques (ANT : membrane interne), le canal anionique voltage-dépendant (VDAC, membrane externe), et la cyclophiline D (Cyp-D, matrice) (Figure 5). Ces protéines coopèrent pour former un pore responsable de la transition

de perméabilité membranaire mitochondriale. Ce processus est décrit comme une conséquence de la dissipation du potentiel mitochondrial, responsable d'une soudaine augmentation de la perméabilité membranaire de la mitochondrie à des solutés de masse moléculaire < 1.5 kDa (Zoratti et Szabo., 1994 ; Marzo et coll., 1998 ; Crompton., 1999 ; Halestrap., 1999).

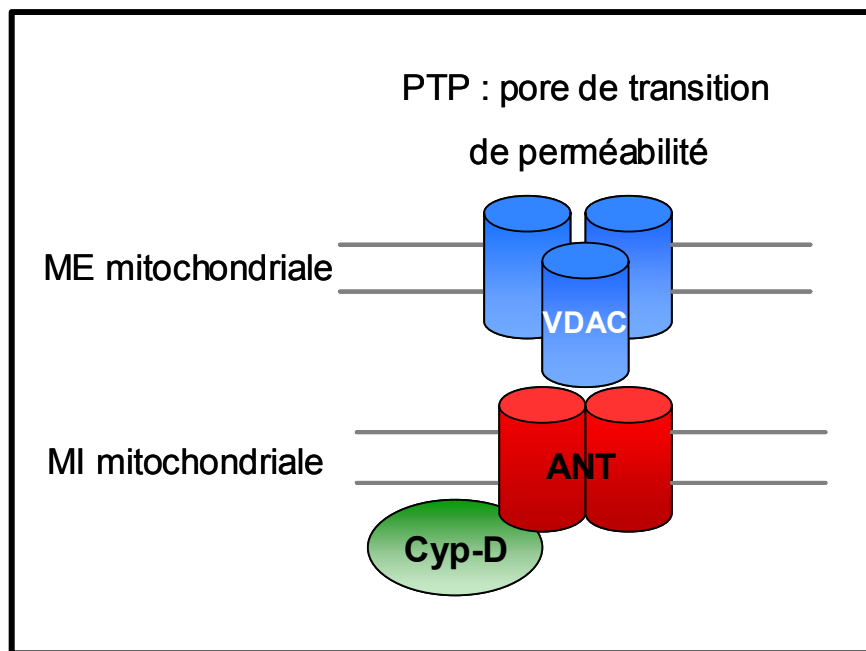


Figure 5 : Configuration minimale du pore de transition de perméabilité membranaire mitochondrial.

VDAC : canal anionique voltage-dépendant ; ANT : translocase des nucléotides adényliques ; Cyp-D : cyclophiline D ; ME : membrane externe ; MI : membrane interne.

L'ouverture du PTP est régulée à la fois par le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et le pH matriciel. L'ouverture est ainsi favorisée par une baisse du $\Delta\Psi_m$ et une acidification du pH matriciel (Bernardi et coll., 1992 ; Petronilli et coll., 1994). On décrit 3 états de fonctionnement du PTP :

- état fermé où le $\Delta\Psi_m$ reste intact,
- état de faible conductance où le pore est partiellement ouvert, perméable à des molécules < 300 Da et la dissipation du $\Delta\Psi_m$ est réversible,
- état de forte conductance où le pore est perméable à des molécules < 1,5 kDa et la dissipation du $\Delta\Psi_m$ est alors irréversible.

Le PTP peut être inhibé expérimentalement par l'atractyloside, l'acide bongkréique, la cyclosporine A (CsA). La CsA provoque notamment la fermeture du PTP ; elle va former un complexe avec la Cyp-D, qui se lie à l'ANT et le bloque (Crompton et coll., 1992). Enfin, la régulation du PTP se fait également par l'action de kinases. Il a été montré qu'en présence d'hexokinase, le VDAC et l'ANT pouvaient former, dans des vésicules lipidiques, un pore fonctionnel aux propriétés comparables au PTP. La CsA peut inhiber ce pore artificiel en présence de Cyp-D. Au contraire, en présence de créatine kinase, ce même pore formé par VDAC et l'ANT est bloqué (Beutner et coll., 1998).

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment lors d'un signal de mort, l'ouverture du pore et la dissipation du $\Delta\Psi_m$ peuvent être impliquées dans l'induction du relargage de molécules apoptogènes (pour revue, Ly et coll., 2003).

Le premier modèle « *PTP-induced mitochondrial swelling model* » se caractérise par l'ouverture du VDAC et un gonflement de la matrice mitochondriale. Ce concept implique que l'agent apoptotique interagisse directement avec le PTP, provoquant son ouverture, puis une dépolarisation rapide de la mitochondrie et un gonflement de la matrice, une rupture de la membrane externe mitochondriale, et par conséquent le relargage des facteurs apoptogènes comme le cytochrome c, l'AIF (Figure 6-A). Le deuxième modèle « *PTP-non swelling model* » ne mettrait pas en jeu le gonflement de la matrice. Des travaux ont montré à partir de mitochondries isolées que le relargage du cytochrome c peut être induit par de faibles concentrations de Bax recombinant ou de Bid tronqué, sans observer de gonflement de la matrice mitochondriale ou de rupture de la membrane externe mitochondriale (Jurgensmeier et coll., 1998 ; Pastorino et coll., 1999). Récemment, il a été montré que l'ouverture du pore (sans gonflement de la matrice mitochondriale) induit l'effondrement de $\Delta\Psi_m$ par un processus de dissipation des protons. Ceci provoque un changement conformationnel de Bax et sa translocation à la mitochondrie, induisant le relargage du cytochrome c (De Giorgi et coll., 2002) (Figure 6-B). Le troisième modèle « *Formation of conducting channels model* » mettrait en jeu des protéines pro-apoptiques de la famille Bcl-2 (Figure 6-C). Ces protéines sont capables de s'insérer dans la membrane externe mitochondriale où une fois oligomérisées, elles forment des pores de façon autonome. Plusieurs exemples sont connus : le pore Bax (comportant 4 molécules Bax), le pore Bax/Bid ou le pore Bax/VDAC. La translocation spécifique du cytochrome c, à travers ces canaux, a été également décrite (Antonsson et coll., 2000 ; Korsmeyer et coll., 2000 ; Shimizu et coll., 2000). Le dernier

modèle « *VDAC closure model* » implique la fermeture du PTP et plus précisément la fermeture du VDAC. On n'observe pas, lors d'un signal apoptotique induit par déprivation en facteurs de croissance, un rapide effondrement du $\Delta\Psi_m$ mais plutôt une hyperpolarisation transitoire et précoce de la mitochondrie, précédant la rupture de la membrane externe et le relargage de facteurs pro-apoptotiques dans le cytoplasme (Vander Heiden et coll., 1999). Ainsi, ce modèle propose que cette hyperpolarisation soit la conséquence d'un dysfonctionnement de l'échange ATP/ADP mitochondrial lié à la fermeture du VDAC, provoquant une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, responsable à la fois du gonflement de la matrice et d'une production de radicaux oxygénés (Zamzami et Kroemer., 2001) (Figure 6-D).

Enfin, il est important de noter que Bossy-Wetzel et coll. ont décrit un système où la libération du cytochrome c et l'activation de caspases pouvaient avoir lieu sans aucune dissipation du $\Delta\Psi_m$ et dans lequel l'ouverture du PTP est consécutive à la formation de l'apoptosome (Bossy-Wetzel et coll., 1998).

Les protéines mitochondriales libérées lors du processus apoptotique sont regroupées sous le nom générique de SIMP (**s**oluble **i**nter **m**embrane **m**itochondrial **p**roteins) et possèdent toutes une activité pro-apoptotique. Elles sont associées soit à une voie mitochondriale caspase-dépendante, soit à une voie mitochondriale caspase-indépendante.

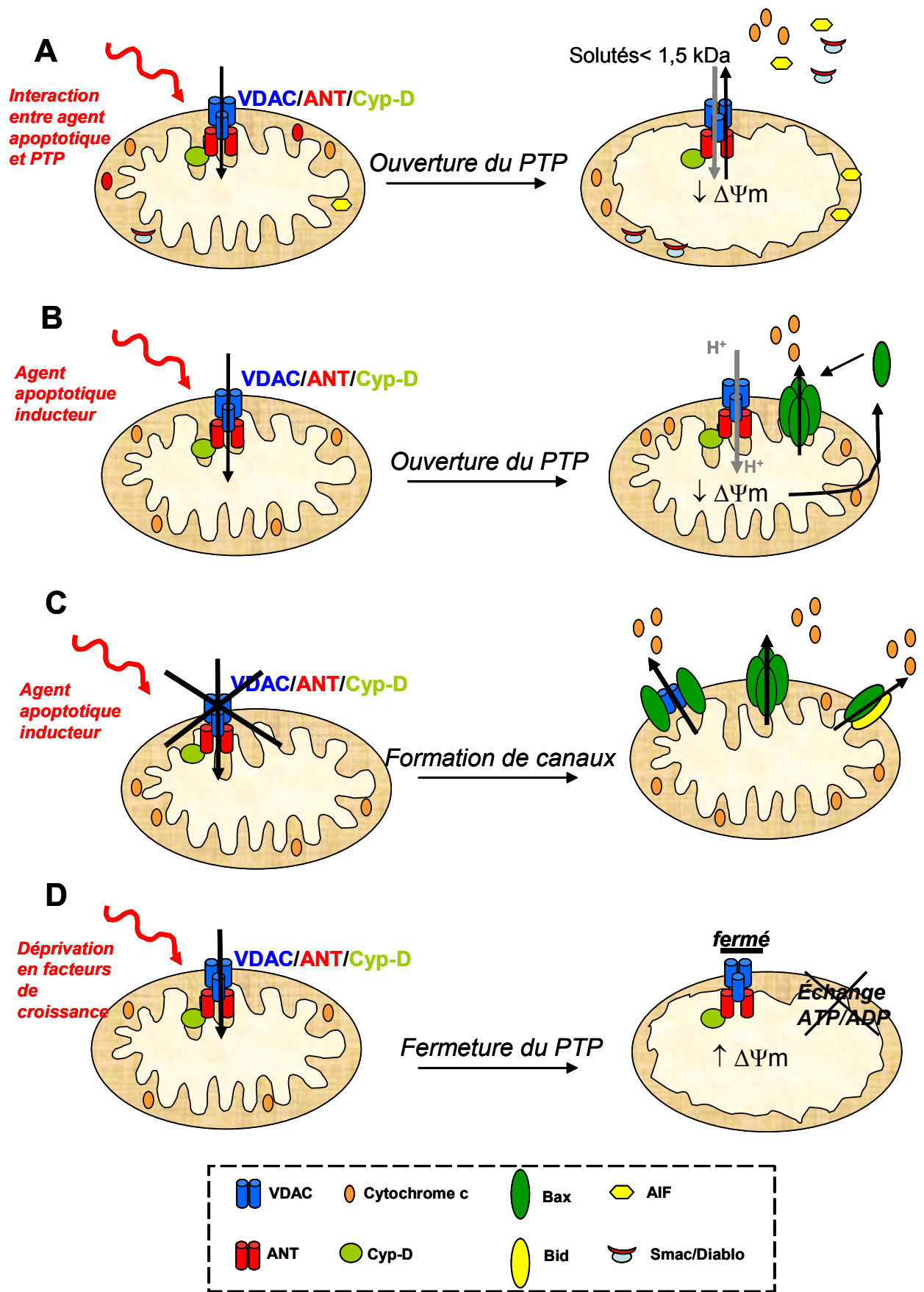


Figure 6 : Modèles possibles de la perméabilisation membranaire mitochondriale observée pendant l'apoptose (Adapté de Ly et coll., 2003).

III.2- Voie mitochondriale caspase-dépendante

Une première classe de SIMP agit sur la voie classique d'apoptose dépendante des caspases. On y distingue notamment le cytochrome c et la protéine Smac/DIABLO. Le cytochrome c a été identifié pour la première fois en 1930 par Keilin et coll (Keilin., 1930). Il est synthétisé dans le cytosol sous la forme d'apo-cytochrome c et transloqué dans la membrane externe mitochondriale. Il est ensuite transformé en un holo-cytochrome c suite à son attachement à un noyau hème. Pendant longtemps, son rôle n'a été attribué qu'à sa participation à la phosphorylation oxydative comme transporteur d'électrons. Ce n'est que depuis les années 90 que son rôle dans l'exécution de la mort cellulaire programmée a été clairement démontré (Zhivotovsky et coll., 1998). Le cytochrome c participe à l'assemblage de l'apoptosome. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1, et la pro-caspase 9, via des domaines CARD ; ils forment ainsi un complexe multiprotéique à l'origine du clivage de la pro-caspase-9, et donc à son activation. Cette dernière activera à son tour des caspases exécutrices comme les caspases 3 ou 7 (Slee (b) et coll., 1999) (Figure 7).

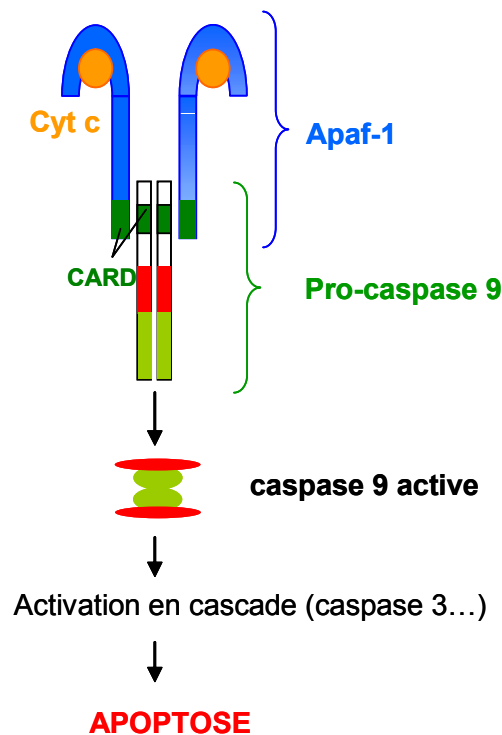


Figure 7 : Représentation schématique de la formation de l'apoptosome.

CARD : caspase recruitment domain ; Cyt c : cytochrome c.

La libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome ne sont pas les seuls mécanismes aboutissant à l'activation en cascade des caspases. La protéine murine Smac et son orthologue humain DIABLO sont des protéines mitochondriales synthétisées sous la forme de précurseurs de 29 kDa ; après protéolyse, elles deviennent des protéines matures de 23 kDa, pouvant être libérées en réponse à un stimulus apoptotique (Verhagen et coll., 2000). Elles agissent sous forme de dimères et contribuent à l'activation des caspases en séquestrant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs : inhibitors of **ap**optosis). Leur fonction physiologique mitochondriale est inconnue.

III.3- Voie mitochondriale caspase-indépendante

L'AIF (**apoptosis inducing factor**) est une flavoprotéine, présentant des homologies avec des enzymes de type oxydoréductases de plantes ou de bactéries (Ameisen., 2002). Ce facteur est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 67 kDa dont la partie N-terminale contient un domaine signal de localisation mitochondriale. Une fois introduit dans l'espace intermembranaire mitochondrial, il est clivé et libère une protéine mature de 57 kDa. Cette protéine a une double fonction de NADPH oxydase et monodéhydroascorbate réductase mitochondriales, et de facteur apoptogène (Klein et coll., 2002 ; Mate et coll., 2002). Son activité oxydoréductase n'est pas essentielle à sa fonction apoptotique. Après un stimulus apoptotique, l'AIF est libéré par la mitochondrie, transloqué dans le noyau des cellules en apoptose et induit, en coopération avec des endonucléases (notamment l'endonucléase G), le clivage de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires de 50 kpb (Susin et coll., 1999).

L'endonucléase G est une endonucléase mitochondriale codée par le génome nucléaire et son rôle principal est d'être impliquée dans la réplication du génome mitochondrial. Durant l'apoptose des cellules de mammifères, l'endonucléase G est relarguée par la mitochondrie, transloquée vers le noyau où elle digère l'ADN nucléaire (Li et coll., 2001 ; van Loo et coll., 2001).

Enfin, on peut citer la protéase Omi, aussi appelée HtrA2. Elle a été identifiée comme une sérine protéase de 49 kDa, homologue à l'endoprotéase bactérienne HtrA2 (Faccio et coll., 2000). Omi/HtrA2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 49 kDa portant en position N-terminale un domaine signal de localisation mitochondriale. Une fois introduite dans l'espace intermembranaire mitochondrial, elle est clivée et devient une protéine mature

de 37 kDa (Savopoulos et coll., 2000). Après un stimulus apoptotique, Omi/HtrA2 est libérée dans le cytosol et peut induire une mort soit dépendante soit indépendante des caspases (van Loo et coll., 2002 ; Verhagen et coll., 2002). En effet, Omi/HtrA2 présente une dualité fonctionnelle. Elle peut soit se lier et inhiber les IAPs déclenchant alors la cascade de caspases, soit elle dégrade, grâce à son activité de sérine protéase, des protéines intracellulaires nécessaires à la vie de la cellule.

IV- La voie extrinsèque de l'apoptose (voie des récepteurs de mort)

La deuxième grande voie apoptotique est celle induite par les récepteurs membranaires DR (**d**eath **r**eceptors) faisant partie de la superfamille des TNF-R (**t**umor **n**ecrosis **f**actor **r**eceptor). Certains membres de cette famille ont la caractéristique de posséder au niveau de leur région intracellulaire un domaine conservé DD (**d**eath **d**omain), qui est un motif protéique d'une taille d'environ 80 acides aminés, indispensable à la transmission du signal de mort. De façon générale, les voies de signalisation apoptotique des récepteurs de mort conduisent à l'activation des caspases et en sont directement dépendantes (Enari et coll., 1995 ; Longthorne et Williams., 1997). Les récepteurs de mort sont activés par la fixation de leur ligand et vont recruter des protéines intracellulaires dites adaptatrices. Ces protéines vont à leur tour recruter les caspases initiatrices (principalement la 8 et la 10) et induire leur activation par auto-clivage. Nous avons choisi de présenter le modèle Fas/FasL, modèle le plus connu et le plus décrit. Comme Fas ne contient aucune activité enzymatique propre, le signal de mort doit être transmis par l'intermédiaire de protéines qui s'associent au récepteur après sa stimulation.

La transmission du signal apoptotique de Fas passe par la formation d'un complexe multiprotéique formé par l'agrégation des récepteurs Fas, la protéine FADD (**F**as-**a**ssociated **d**eath **d**omain) (Kischkel et coll., 1995) et la pro-caspase-8. Ce complexe est nommé DISC (**d**eath **i**nducing **s**ignaling **c**omplex). Suite à son auto-activation, la caspase-8 va alors activer par clivage la caspase-3, déclenchant une cascade de caspases effectrices qui vont conduire de façon inéluctable à la mort apoptotique de la cellule (Slee (a) et coll., 1999). Il est à noter que la caspase-8 est essentielle à la mort cellulaire induite par Fas (Varfolomeev et coll., 1998).

Les travaux récents de Algeciras-Schimmich et coll. (Algeciras-Schimmich et coll., 2002) ont permis de préciser l'ordre de la signalisation initiale de la voie de Fas. Ainsi, il a été montré que la fixation de FasL induit la formation de microagrégats de Fas. Ceci permet alors la formation de DISC selon un processus faisant intervenir les filaments d'actine et l'activation de la caspase-8 mais avec trop peu d'efficacité pour la transduction d'un signal apoptotique. Cependant, l'activation de la caspase-8 permet la formation à la surface cellulaire de larges regroupements membranaires de protéines Fas. Ces regroupements membranaires de récepteurs Fas vont permettre d'augmenter le signal transmis et d'amplifier l'activation de la caspase-8 pour induire le signal apoptotique. Le complexe Fas / FasL serait alors internalisé, grâce à la formation de vésicules d'endocytose par un processus encore mal défini.

L'importance de la voie mitochondriale a été démontrée dans la mort induite par Fas au moins dans certaines cellules (Fulda et coll., 1998). En fait, selon l'utilisation ou non de la phase mitochondriale en aval de Fas, deux types de cellules ont pu être définies (Scaffidi et coll., 1998). Les cellules de type I seraient indépendantes d'une activité apoptotique des mitochondries et utiliseraient uniquement une activité directe des caspases telle que décrite précédemment. Les cellules de type II seraient dépendantes de l'activation de la voie apoptotique mitochondriale. Mis à part la quantité de pro-caspase-8 recrutée et clivée au niveau du DISC (faible dans les cellules de type II et importante dans les cellules de type I), aucune différence moléculaire n'a permis à ce jour d'expliquer cette différence d'activation entre les deux types de cellules (Figure 8). Un membre de la famille de Bcl-2, la protéine Bid (Luo et coll., 1998), constitue un des liens entre la voie du récepteur Fas et la voie mitochondriale (Li et coll., 1998). Un fragment de la protéine Bid, issu du clivage par la caspase 8, est transféré du cytoplasme à la mitochondrie. En effet, Bid tronqué (tBid), en se liant à Bax, un autre membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 présent sous forme monomérique dans le cytosol, induit l'oligomérisation de ce dernier et son intégration dans la membrane externe mitochondriale, entraînant l'ouverture de mégapores mitochondriaux à l'origine de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et de la libération du cytochrome c (Eskes et coll., 2000). Une autre protéine faisant la jonction entre les deux voies a été identifiée. Il s'agit de la protéine régulatrice BAR (**b**ifunctional **a**poptosis **r**egulator) (Zhang et coll., 2000) qui possède la capacité de s'associer à la fois aux molécules anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-x_L *via* un domaine d'interaction protéine-protéine SAM (**s**terile-**a**lpha **m**otif) et à la caspase-8 (*via* un domaine DED-like).

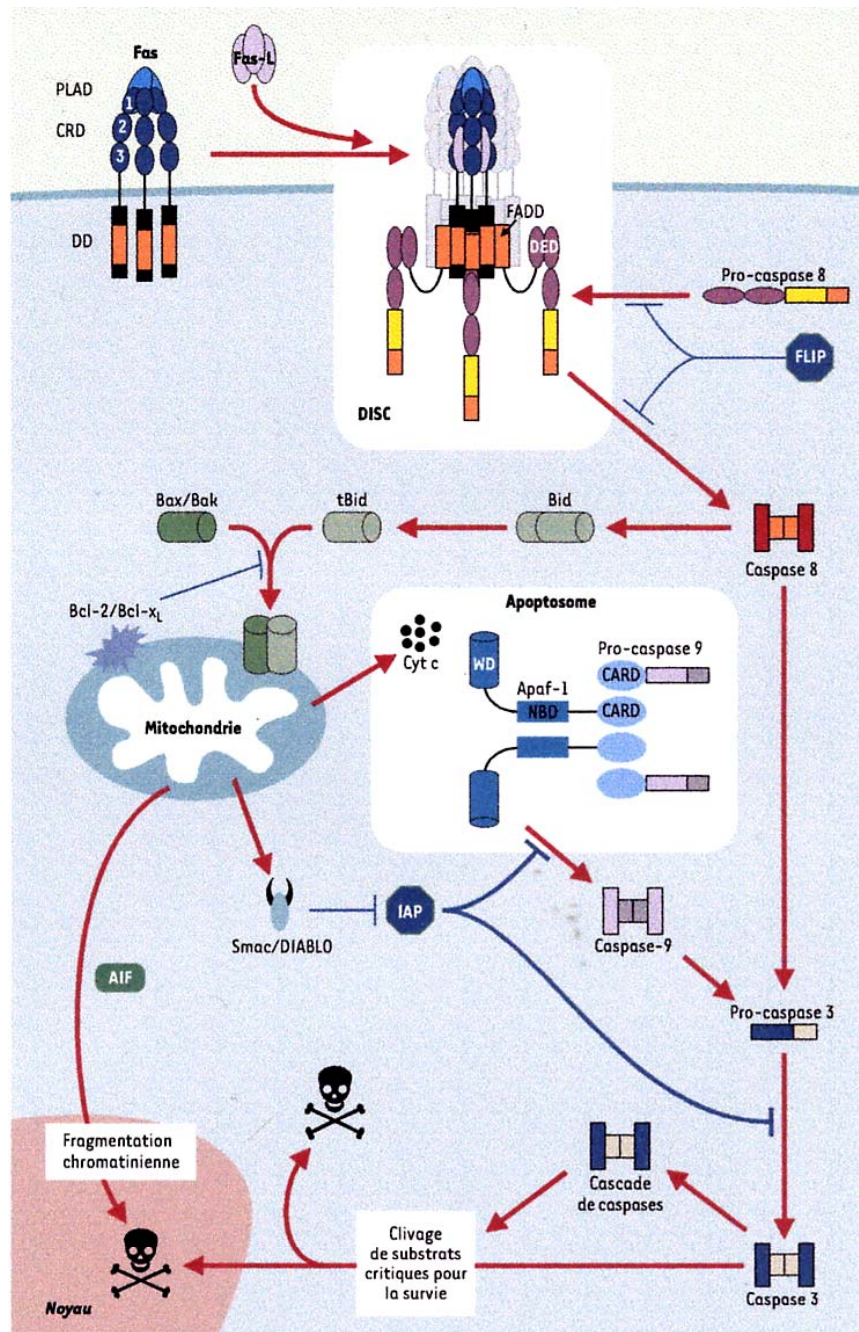


Figure 8 : Voies d'activation de Fas dans les cellules de type I ou de type II
(Adapté de Couzinet et coll., 2002).

L'oligomérisation de Fas permet le recrutement de FADD et de la pro-caspase 8. Le complexe multiprotéique ainsi formé est appelé DISC ; il entraîne le clivage de la pro-caspase 8 et sa libération sous forme active dans le cytosol. La deuxième voie déclenchée par le clivage de Bid par la caspase 8 aboutit au relargage, de la mitochondrie dans le cytosol, du cytochrome c, de Smac/Diablo, et de l'AIF. FADD : Fas-associated death domain; DD : death domain; DED : death effector domain ; DISC : death-inducing signalling complex ; Fas-L : Fas-ligand; CARD : Caspase Recruitment Domain; NBD : nucleotide binding domain ; FLIP : FADD-like ICE inhibitory proteins ; AIF : apoptosis inducing factor ; IAP : inhibitors of apoptosis ; WD : 40 répétitions tryptophane/acide aspartique.

V- Contrôle de la phase mitochondriale de l'apoptose : rôle des protéines de la famille Bcl-2

Le gène *bcl-2* (**B cell lymphoma 2**) est le prototype d'une famille de gènes contrôlant la mort cellulaire. Il a été identifié chez l'Homme par Vaux et coll en 1988 à partir d'études sur des lymphomes folliculaires. La translocation chromosomique t(14;18) associée à ces lymphomes a permis d'isoler le gène *bcl-2*, localisé au point de cassure de la translocation (Vaux et coll., 1988). Le site de cassure sur le chromosome 14 correspond au gène de la chaîne lourde des immunoglobulines ; ainsi la juxtaposition d'éléments activateurs (enhancers) des gènes d'immunoglobulines au voisinage du promoteur majeur du gène *bcl-2* créait les conditions de son expression constitutive favorisant la prolifération des lymphocytes B. Bien qu'on ait initialement attribué à Bcl-2 un rôle dans la survie, l'invalidation du gène chez la souris a permis d'aller plus loin dans la compréhension de sa fonction anti-apoptotique. Le blocage du gène aboutit à une variété d'anomalies attribuées pour la plupart à un dérèglement de l'apoptose, notamment une mort cellulaire excessive. En effet, les souris *Bcl-2*^{-/-} ont un développement complet de l'embryon mais, après la naissance, elles montrent des retards de croissance (oreilles plus petites), une hypo-pigmentation des poils, et une mortalité précoce ; la différenciation lymphocytaire est initialement normale mais le thymus et la rate involuent rapidement, à cause d'une apoptose massive (Veis et coll., 1993 ; Nakayama et coll., 1994 ; Kamada et coll., 1995). Après la découverte de Bcl-2, de nombreuses protéines présentant des similitudes avec Bcl-2 furent mises en évidence ; ainsi, la famille des protéines de la famille Bcl-2 regroupe finalement des protéines anti et pro-apoptotiques, l'équilibre entre les 2 déterminant en partie la susceptibilité des cellules à l'apoptose.

V.1- Classification, activation et régulation des protéines de la famille Bcl-2

Les homologues mammifères du gène *ced-9* correspondent à une famille de gènes codant pour les protéines de la famille Bcl-2. L'alignement des séquences protéiques des membres de la famille Bcl-2 a permis d'identifier quatre régions, hautement conservées chez les mammifères, appelées domaines BH (Bcl-2 homology) : BH1 à BH4. On peut ainsi classer les membres de la famille Bcl-2 en trois groupes (Adams et coll., 1998 ; Tsujimoto et Shimizu., 2000) (Figure 9).

Le premier groupe « **Bcl-2-like survival factors** » rassemble les membres anti-apoptotiques. Ils contiennent les domaines BH1, -2, -3 et -4. On peut citer Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1.

Le deuxième groupe « **Bax-like death factors** » regroupe une partie des membres pro-apoptotiques et se caractérise par l'absence du domaine BH4 dans la séquence des protéines. On peut citer Bax, Bak, et Book.

Le troisième groupe « **BH3-only death factors** » fait partie des membres pro-apoptotiques. Les protéines de ce groupe possèdent uniquement le domaine BH3. On peut citer Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Noxa et Puma.

Presque toutes les protéines de la famille Bcl-2 (Figure 9) possèdent un domaine transmembranaire carboxy-terminal dit TM leur permettant de s'ancrer dans des membranes cellulaires.

Des études structurales des protéines de la famille Bcl-2 par diffraction de rayons X et RMN (Muchmore et coll, 1996) ont permis de mettre en évidence leur mécanisme d'action et d'interaction réciproque. Leur structure tridimensionnelle se compose de 2 hélices α hydrophobes centrales, entourée de 6 à 7 hélices α amphipatiques de taille variable, le long desquelles sont répartis les domaines BH. Une longue boucle flexible et hydrophile est présente entre les 2 premières hélices, elle interviendrait dans la régulation des phénomènes de modifications post-traductionnelles des protéines de la famille Bcl-2 comme la phosphorylation. Enfin, la proximité spatiale des domaines BH1, BH2 et BH3 et leur organisation à la surface de la protéine en une poche hydrophobe, permet de recevoir des peptides mimant le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques comme Bax ou Bad (Petros et coll., 2004) (Figure 10).

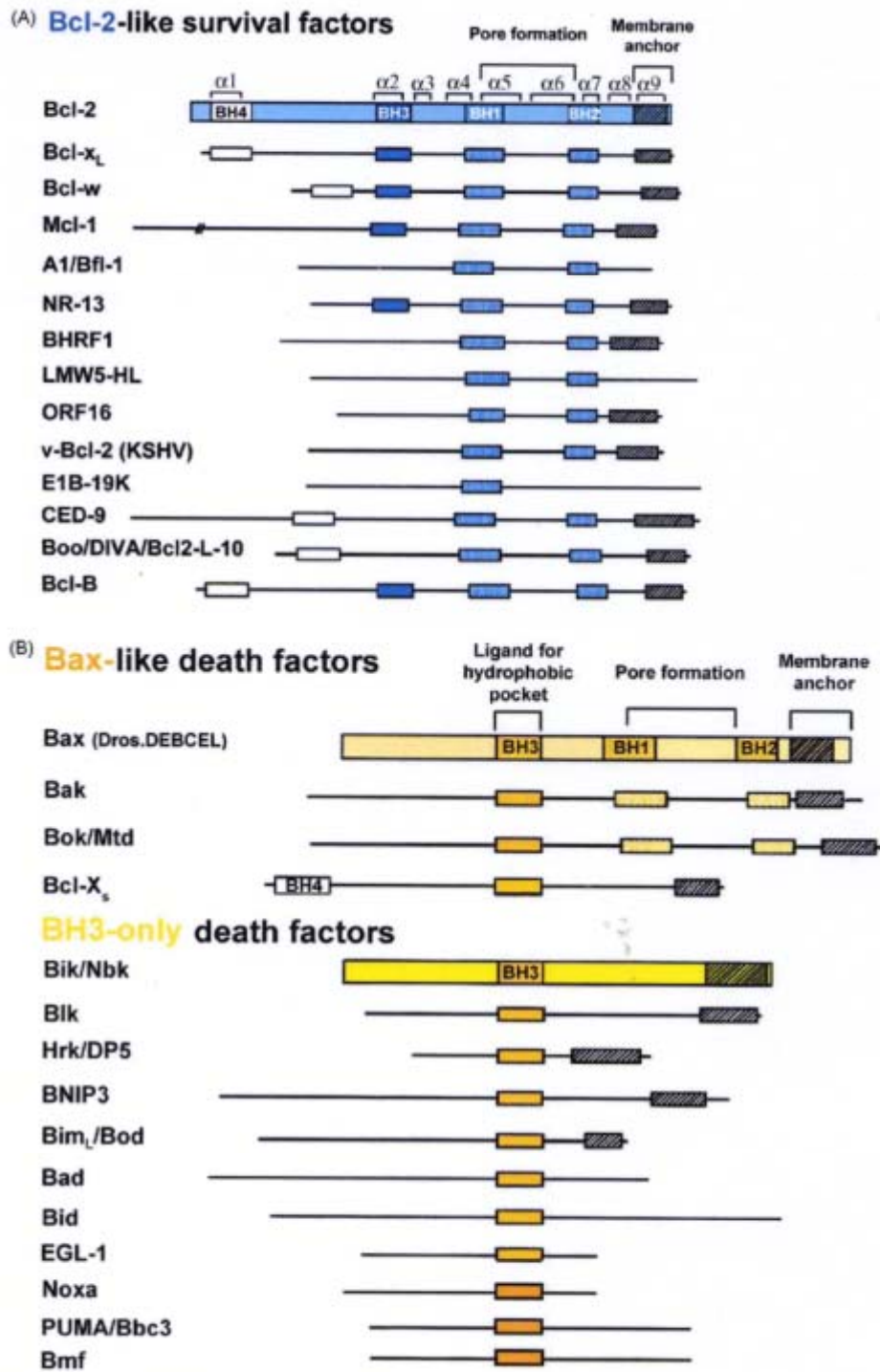


Figure 9 : Les membres de la famille Bcl-2 (d'après Borner., 2003).

Les 3 grandes familles sont représentées ; les protéines anti-apoptotiques (A), les protéines pro-apoptotiques (B) : à « multidomains » et « BH3-seul ».

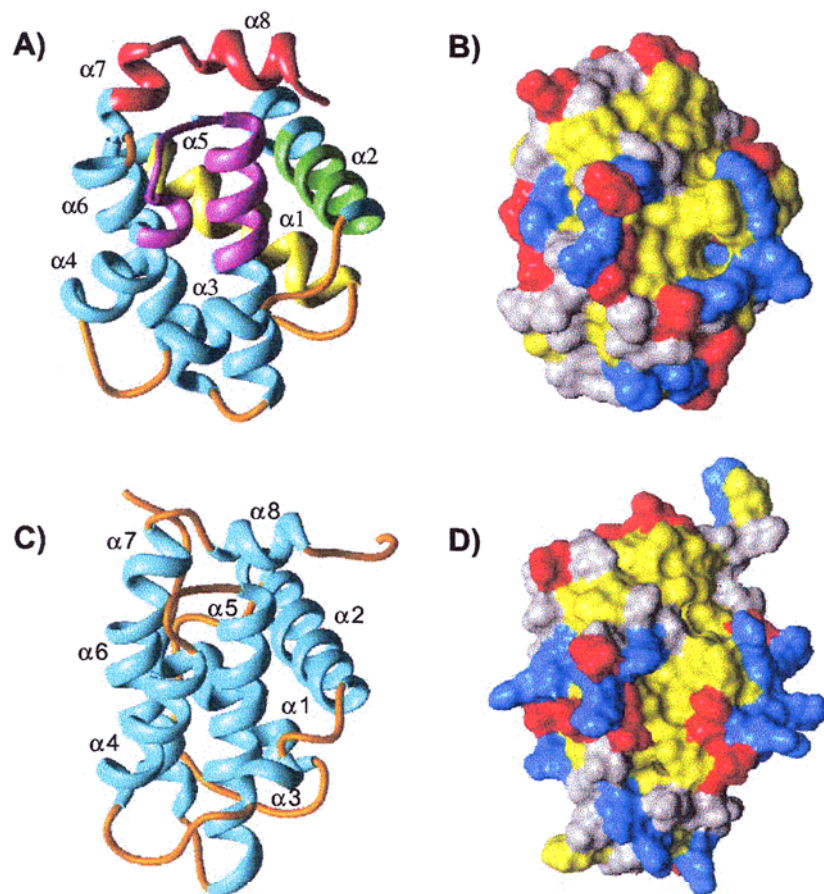


Figure 10 : Structures moléculaires de Bcl-xL (A) et de Bcl-2 (C) obtenues par diffraction aux rayons X (Adapté de Petros et coll., 2004).

Les régions BH1, BH2, BH3 et BH4 de Bcl-xL sont colorées respectivement en magenta, en rouge, en vert et en jaune. Les surfaces de Bcl-xL (B) et Bcl-2 (D) ont été déterminées en utilisant une sonde de rayon de 1,4 Å et sont colorées de la façon suivante : leucine, valine, isoleucine, phénylalanine, tyrosine, méthionine et alanine en jaune ; arginine, lysine et histidine en bleu ; acide aspartique et acide glutamique en vert ; tous les autres résidus sont colorés en gris. La poche hydrophobe en jaune est mise en évidence à la surface des molécules.

En effet, un des mécanismes d'action des protéines de la famille Bcl-2 est l'hétérodimérisation entre les membres pro et anti-apoptotiques, suggérant une neutralisation compétitive entre eux. Le niveau relatif de chaque protéine déterminerait ainsi la sensibilité de la cellule à un signal de mort. Cette hétérodimérisation se fait par l'insertion du domaine BH3 d'une protéine pro-apoptotique dans la poche hydrophobe composée par les domaines BH1, BH2 et BH3 d'une protéine anti-apoptotique. Des expériences de mutagenèse dirigée sur les domaines BH1 et BH-2 de Bcl-2 et Bcl-x_L montrent que BH1 et BH2 constituent les zones minimales pour leur interaction physique avec leurs homologues pro-apoptotiques et leur neutralisation (Sedlak et coll., 1995). En revanche, le domaine BH3 seul est essentiel et suffisant pour l'activité pro-apoptotique mais ne permet pas aux protéines pro-apoptotiques de s'associer entre elles ; elles ne forment que des hétérodimères avec des protéines ayant les domaines BH-1 et BH-2 (Oltvai et coll., 1993). Enfin, la délétion du domaine BH-4 de Bcl-2 ou Bcl-x_L induit la perte de la propriété anti-apoptotique, sans influencer la capacité à former des dimères.

Les membres anti et pro-apoptotiques ont des localisations subcellulaires différentes. Certaines protéines de la famille Bcl-2 peuvent s'ancrer dans des membranes (membrane externe mitochondriale ou membrane du réticulum endoplasmique) via leur domaine TM (Nguyen and coll., 1993 ; Wattenberg et Lithgow., 2001). Ainsi, il a été montré que les membres anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w et Mcl-1 résidaient dans certaines membranes intracellulaires et contrôlaient de cette manière l'apoptose. Bcl-2 est majoritairement localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique et associé à l'enveloppe nucléaire, seule une petite fraction est résidente à la membrane externe mitochondriale (Lithgow et coll., 1994). A l'inverse, Bcl-x_L présenterait une haute spécificité pour la membrane externe mitochondriale (Kaufmann et coll., 2003) mais serait toutefois faiblement attaché à celle-ci et serait donc plutôt retrouvé dans le cytosol. Les membres pro-apoptotiques « Bax-like death factors » ont été initialement décrits comme des protéines localisées dans la membrane externe mitochondriale mais également plus récemment dans la membrane du réticulum endoplasmique (où une fonction spécifique leur a été attribuée) (Antonsson., 2001 ; Scorrano et coll., 2003). Enfin, les protéines pro-apoptotiques du groupe « BH3-only death factor » seraient séquestrées dans le cytosol et suite à un stimulus apoptotique, elles pourraient fonctionner en association avec les autres membres de la famille Bcl-2, déjà localisés dans la membrane externe mitochondriale, la membrane du réticulum endoplasmique ou l'enveloppe nucléaire. Bien que certaines protéines de la famille Bcl-2

soient directement ancrées dans les membranes où elles sont directement actives, d'autres ont besoin d'un second niveau de régulation pour être transloquées dans la cellule et exercer leur fonction.

Ces mécanismes régulateurs correspondent à des changements conformationnels et/ou des modifications post-traductionnelles (Puthalakath et Strasser., 2002). Nous avons choisi plusieurs exemples pour illustrer ces processus (Figure 11). Dans sa conformation cytosolique, le domaine TM de Bax est caché dans sa poche hydrophobique. En réponse à un stimulus apoptotique, Bax changerait de conformation, permettant à nouveau l'exposition de son domaine TM et donc son possible ancrage à la membrane externe mitochondriale (Suzuki et coll., 2000). Un mécanisme similaire a mis en évidence pour Bcl-x_L (Hinds et coll., 2003). En réponse à un stimulus apoptotique, l'expression des protéines Noxa ou Bim est induite et serait régulée par p53; il est connu que Bad, Bid ou Bmf subissent des protéolyses (clivage) et/ou des modifications post-traductionnelles (type phosphorylation) (Borner., 2003). En réponse à l'activation des récepteurs de mort, la protéine Bid est clivée par la caspase-8 et la forme tronquée de Bid : tBid peut ainsi être transloquée à la mitochondrie pour interagir avec d'autres membres de la famille Bcl-2 comme Bak (Li et coll., 1998). De même, la protéine Bad est régulée par une variété de kinases, qui peuvent la phosphoryler sur différents résidus sérines et contrôler ainsi son interaction ou non avec la protéine chaperonne 14-3-3 et donc sa séquestration dans le cytosol (Datta SR et coll., 1997 ; Harada H et coll., 1999). Cette forme de séquestration de Bad n'est pas à généraliser puisqu'il a été décrit dans certaines lignées cellulaires que Bad phosphorylée n'était pas associée à la 14-3-3 (Ayllon et coll., 2001 ; Ayllon et coll., 2002) (pour détails voir Partie 3). Bim et Bmf, étant liées dans les conditions normales à des protéines ou structures du cytosquelette, peuvent s'en détacher lors d'un signal de mort et sont transloquées à la mitochondrie pour interagir avec d'autres protéines de la famille Bcl-2 (Puthalakath et coll., 1999).

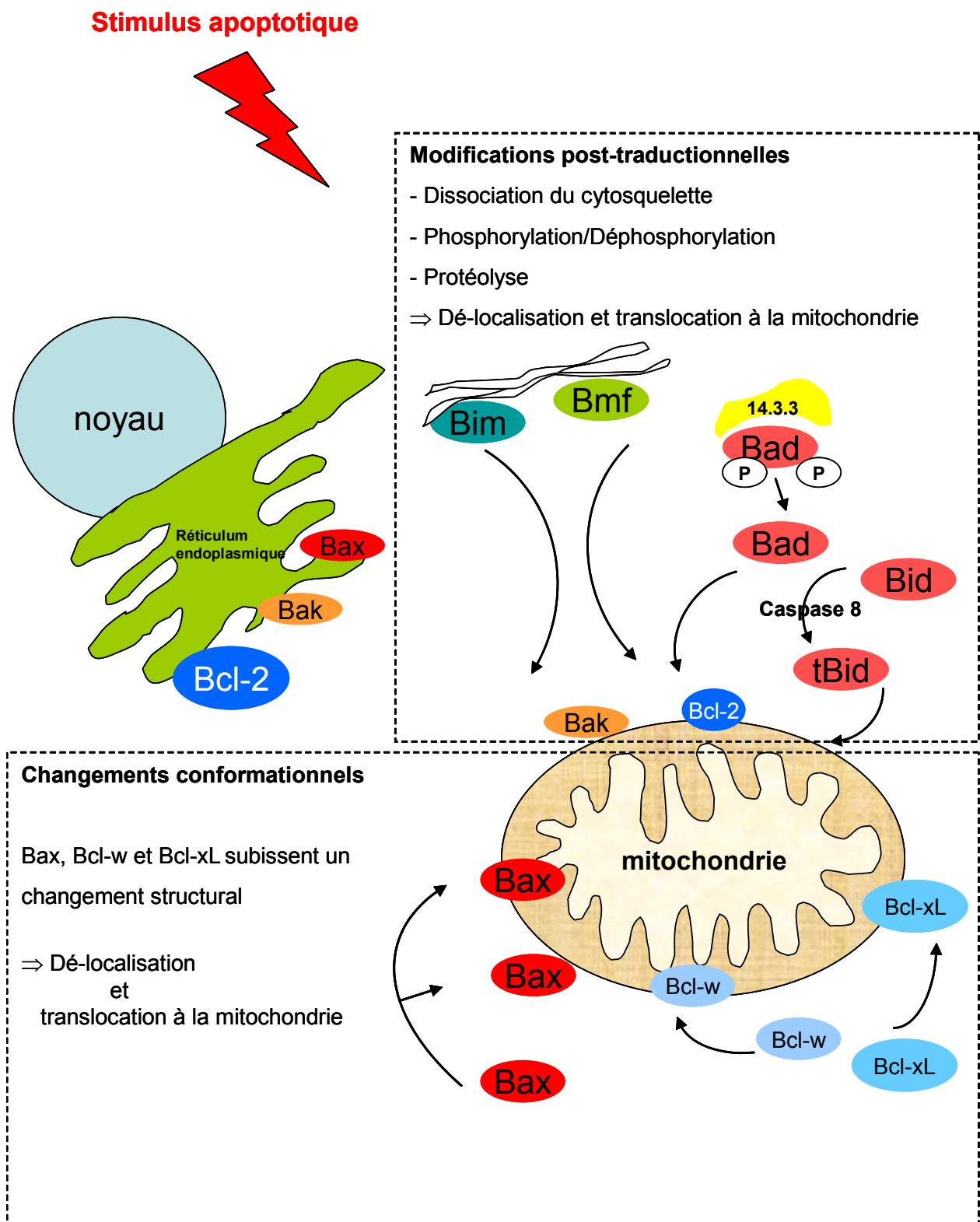


Figure 11 : Localisation/translocation des protéines de la famille Bcl-2 suite à un signal apoptotique (Adapté de Schinzel et coll., 2004).

V.2- La régulation de la perméabilité mitochondriale par les protéines de la famille Bcl-2

Le mécanisme exact par lequel les protéines de la famille Bcl-2 protègent ou induisent la perméabilité membranaire mitochondriale est très controversé et fait l'objet de nombreuses recherches. Deux hypothèses sont classiquement retenues. Dans le premier modèle, les protéines de la famille Bcl-2 pourraient former elles-mêmes des canaux dans la membrane externe mitochondriale : en interagissant directement avec des lipides, en s'associant au VDAC ou par auto-oligomérisation ou hétéro-oligomérisation avec leurs homologues de la famille Bcl-2 (Martinou et coll., 2000). Le deuxième modèle propose que les protéines de la famille Bcl-2 puissent interagir et réguler des canaux déjà existants dans les membranes mitochondriales comme le PTP. De nombreux articles vont dans un sens ou dans l'autre mais tous s'accordent à dire que ces mécanismes sont compatibles avec la théorie du relargage des protéines inter-membranaires de la mitochondrie qui jouent un rôle dans les processus d'apoptose caspase-dépendants ou indépendants (Martinou et Green., 2001; Zamzami et Kroemer., 2001; Borner., 2003).

La première hypothèse (Figure 12-A) proposant que les membres de la famille Bcl-2 puissent former eux-mêmes des canaux dans la membrane externe mitochondriale est basée sur la découverte d'homologies structurales entre Bcl-x_L et des pores formés par des toxines bactériennes (Muchmore et coll., 1996, Minn et coll., 1997). Par la suite, on a découvert que d'autres membres de la famille Bcl-2 étaient capables de former des canaux dans des membranes artificielles (bicouches lipidiques) : Bax, (Antonsson et coll., 1997), Bcl-2 (Schendel et coll., 1997), Bid clivé (Schendel et coll., 1999). Le clivage de Bcl-x_L, au cours de l'apoptose, a pour conséquence de le transformer en une protéine létale. L'activité pro-apoptotique de Bcl-x_L due au clivage augmente et/ou favorise la formation de pores actifs. Ceci a été montré par des expériences où des fragments clivés de Bcl-x_L, à contrario de la protéine totale, perméabilisent à la fois des mitochondries et des membranes lipidiques (Bazanez et coll., 2001). Bax est probablement la protéine la plus étudiée et la mieux caractérisée, parmi les membres pro-apoptotiques capables de former des canaux dans des conditions physiologiques. Il est intéressant de noter que Bax est activée dans de nombreuses voies de mort caspase-indépendantes, ce qui démontre le rôle des « canaux Bax » dans le relargage des facteurs de mort caspase-indépendants comme l'AIF. Bax est normalement

située dans le cytosol de la cellule et est transloquée à la membrane externe mitochondriale en réponse à un stimulus apoptotique. Son oligomérisation est requise pour la formation de canaux ; en effet, il a été montré que Bax forme des complexes homo-oligomériques dans les membranes mitochondriales (Mikhailov et coll., 2001). Concernant tBid, une des hypothèses est qu'après un stimulus apoptotique, tBid serait transloquée à la mitochondrie où elle s'insérerait dans la membrane externe ; elle provoquerait alors un changement conformationnel de Bak aboutissant à son oligomérisation et de manière indirecte, son hétéro-oligomérisation avec Bax (Mikhailov et coll., 2003).

La deuxième hypothèse (Figure 12-B) qui propose que les protéines de la famille Bcl-2 régulent l'ouverture/fermeture du PTP est basée sur des expériences montrant les interactions possibles entre des composants du PTP et les protéines de la famille Bcl-2. Bcl-x_L et Bax pourraient interagir avec le VDAC et moduler son activité. Dans des conditions normales, Bcl-x_L maintient le VDAC dans sa conformation ouverte permettant ainsi le passage de l'ATP de la matrice mitochondriale vers le cytoplasme. La fermeture du VDAC par Bax entraîne une accumulation d'ATP, provoquant au final le relargage du cytochrome c. Dans ce contexte, Shimizu et coll. ont montré que le domaine BH4 était impliqué dans l'interaction et l'inhibition du VDAC par Bcl-x_L, empêchant la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial et le relargage du cytochrome c induit par la protéine pro-apoptotique Bax (Shimizu et coll., 2000). En effet, des oligopeptides BH4 de Bcl-2 ou Bcl-x_L, mais non des peptides mutants, sont capables d'inhiber l'activité du VDAC dans des liposomes ou d'inhiber la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial dans des mitochondries isolées. De plus, il a été observé que Bax et Bcl-2 peuvent agir sur l'ANT et réguler, de manière opposée, son potentiel à former des pores. Bax et l'ANT forment, dans des bicouches lipidiques artificielles, un canal qui possède des propriétés électrophysiologiques quantitativement et qualitativement différentes des canaux formés par Bax ou l'ANT seuls (Scorrano et coll., 2003). L'apparition du canal coopératif formé par Bax et l'ANT est stimulée par l'Atr (ANT ligand atractyloside). Au contraire, l'ANT ne peut pas former des canaux actifs avec Bcl-2, lorsqu'il est incorporé avec Bcl-2 dans des membranes. Ainsi, Bax augmente la capacité de l'ANT à former des pores en présence d'Atr, alors que Bcl-2 la diminue. Brenner et coll. ont donc défini ce modèle de régulation de la phase mitochondriale de l'apoptose comme un « ménage à 3 » où l'ANT interagit ou non avec Bax ou Bcl-2, eux-mêmes influençant sa capacité à former des pores (Brenner et coll., 2000).

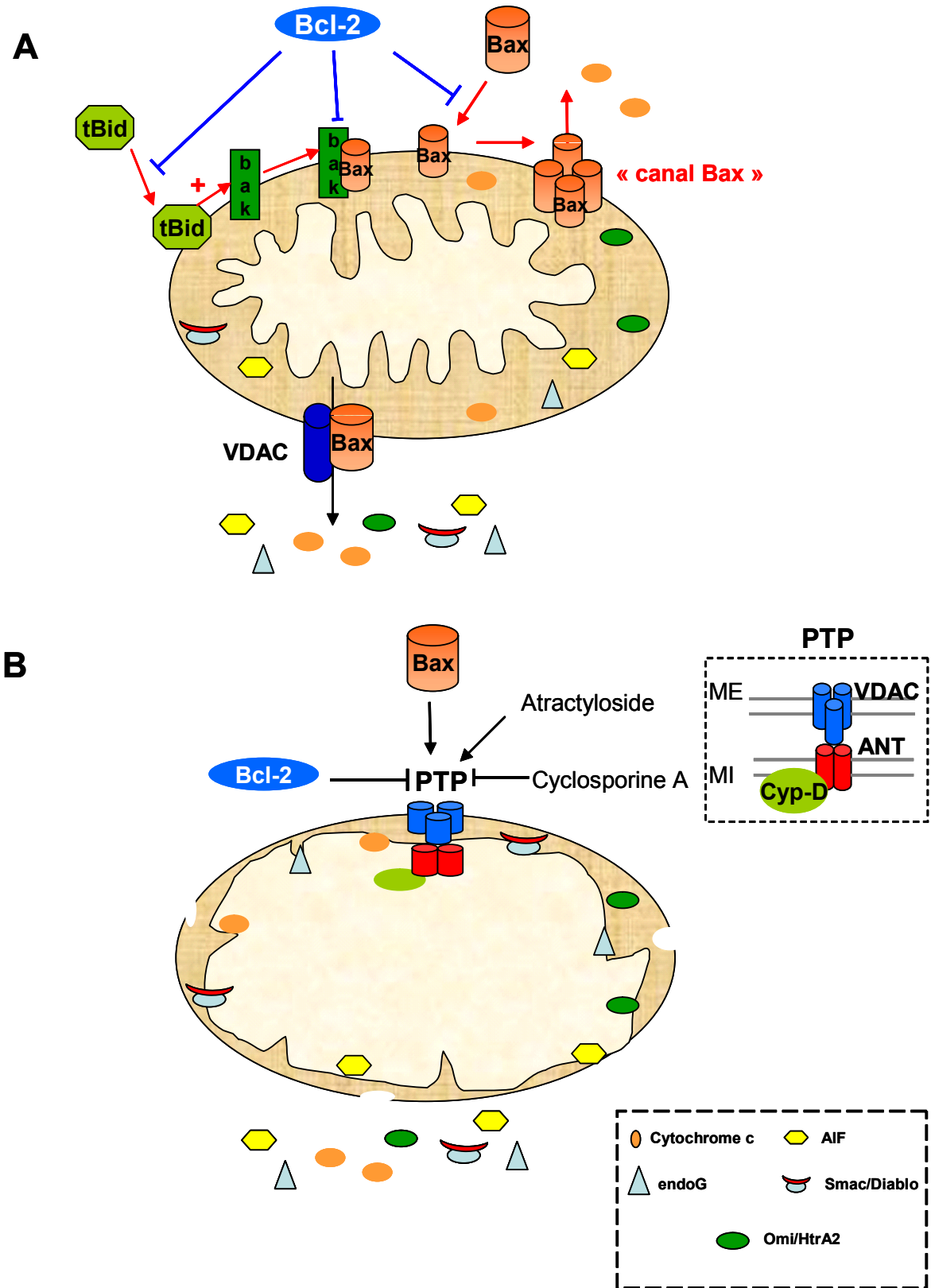


Figure 12 : Deux modèles possibles expliquant le rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans la perméabilisation membranaire mitochondriale (Adapté de Donovan et Cotter., 2004).

Des travaux récents mettent en évidence le rôle joué par d'autres organites, comme le réticulum endoplasmique (RE), le noyau, les lysosomes ou encore l'appareil de Golgi dans la mort cellulaire programmée (Ferri et Kroemer., 2001). Le relargage du calcium du réticulum endoplasmique dans le cytosol est notamment un processus déclenchant l'apoptose. De nombreuses enzymes cytoplasmiques impliquées dans l'apoptose sont calcium-dépendantes comme les endonucléases, la calpaïne et la calcineurine. De plus, la propagation du calcium vers la mitochondrie, organite lui aussi de réserve du calcium, stimule la production d'ATP par l'activation des déshydrogénases calcium-dépendantes ; au final, cette quantité excessive de calcium mitochondrial provoque l'apoptose en stimulant le relargage de molécules apoptogènes et la production d'espèces oxygénées réactives (Smaili et coll., 2003). Le rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans la signalisation calcique n'est pas clairement établi mais il semblerait qu'elles agiraient comme des modulateurs. En effet, leur surexpression pourrait changer les concentrations de Ca^{2+} intracellulaire. Par exemple, la surexpression de Bcl-2 favorise la retenue du Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique en réponse à un inducteur apoptotique type thapsigargine (connu pour dépléter les stocks Ca^{2+} à partir de ce compartiment) (Baffy et coll., 1993) alors que la surexpression de Bax entraîne une perte complète du contenu en Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (Pan et coll., 2001).

En conclusion, les membres de la famille Bcl-2 exercent deux fonctions essentielles : ils participent d'une part à la formation de pores régulant le passage d'ions et de certains facteurs activateurs de l'apoptose, et modulent d'autre part la fonction des molécules régulatrices de l'apoptose par l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine.

VI- Les protéines inhibitrices de l'apoptose

Les IAP ont été décrites pour la première fois à partir de génomes de baculovirus, par l'équipe de Miller en 1993 (Crook et coll. 1993). Cette découverte a permis d'identifier deux motifs conservés dans les IAP : un domaine (répété 1 à 3 fois) appelé BIR (Baculovirus IAP Repeat) et un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de zinc nommé RING (« RING finger »). Toutes les IAPs possèdent le domaine BIR et il est essentiel à leurs propriétés anti-apoptotiques (Hinds et coll., 1999 ; Miller., 1999) alors que seules quelques-unes des IAPs possèdent un domaine RING. On a identifié 8 IAPs chez l'Homme et seulement 5 contiennent le domaine RING. XIAP (« X-linked IAP ») est le membre le mieux caractérisé. Les IAPs agissent soit en bloquant l'activation des pro-caspases, soit en inhibant l'activité des caspases matures. Enfin, l'activité des IAPs ne semble pas se limiter à l'inhibition des caspases car elles interviendraient dans la régulation du cycle cellulaire et dans des cascades de signalisation caspases-indépendantes (Levkau et coll., 2001 ; Silke et Vaux., 2001).

Partie 2 : Signalisation du BCR, dualité fonctionnelle et apoptose

La présence des récepteurs à l'antigène des cellules B, ou BCR (B cell receptor), est nécessaire tout au long de l'ontogenèse du lymphocyte B, avant même sa rencontre avec l'antigène. De plus, il participe au maintien de l'homéostasie lymphocytaire B en périphérie. Ce rôle décisif du BCR dans la survie des cellules B a été clairement démontré notamment par des expériences de déplétion du récepteur (réalisées chez la souris) soit dans les lymphocytes B matures, soit au niveau des lymphocytes B immatures. La suppression du BCR aboutit à la mort des cellules avec une disparition du pool de lymphocytes B matures, dans le premier cas, et des lymphocytes B immatures dans le deuxième cas (Lam et Rajewsky., 1998).

En fait, le BCR a 2 fonctions principales :

- la première est de transmettre un signal qui régule le devenir (survie/anergie/mort) de la cellule B,
- la seconde est de permettre, par le « traitement » de l'antigène et sa présentation aux lymphocytes T, l'activation complète des cellules B pour la phase effectrice des réponses immunitaires.

Bien que ces 2 fonctions semblent liées, leurs régulations génétiques seraient distinctes (Niino et Clark., 2002 ; Pierce., 2002).

I- Le récepteur à l'antigène des cellules B ou BCR

Identifié pour la première fois en 1970 (Raff et coll., 1970), le récepteur à l'antigène des cellules B ou BCR est un complexe multimérique composé d'une immunoglobuline Ig membranaire - impliquée dans la reconnaissance de l'antigène – associée de façon non covalente à un hétérodimère $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ - responsable de la transduction du signal (Figure 13). La structure des Ig, qu'elles soient exprimées à la surface des lymphocytes B ou excrétées par les plasmocytes, repose sur l'assemblage de 2 chaînes lourdes identiques, associées par des ponts di-disulfures à 2 chaînes légères également identiques. Il existe des liaisons covalentes (S-S) entre les 2 chaînes lourdes. L'ensemble forme un tétramère d'environ 150 kDa

(Edelman., 1970 ; Porter., 1973). Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'antigène tandis que les domaines constants des chaînes lourdes confèrent ses propriétés effectrices à l'immunoglobuline. On distingue chez l'homme 2 types de chaînes légères (κ et λ) et 5 isotypes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , α , et ϵ) définissant respectivement les 5 classes d'Ig : IgM, IgD, IgG, IgA et IgE.

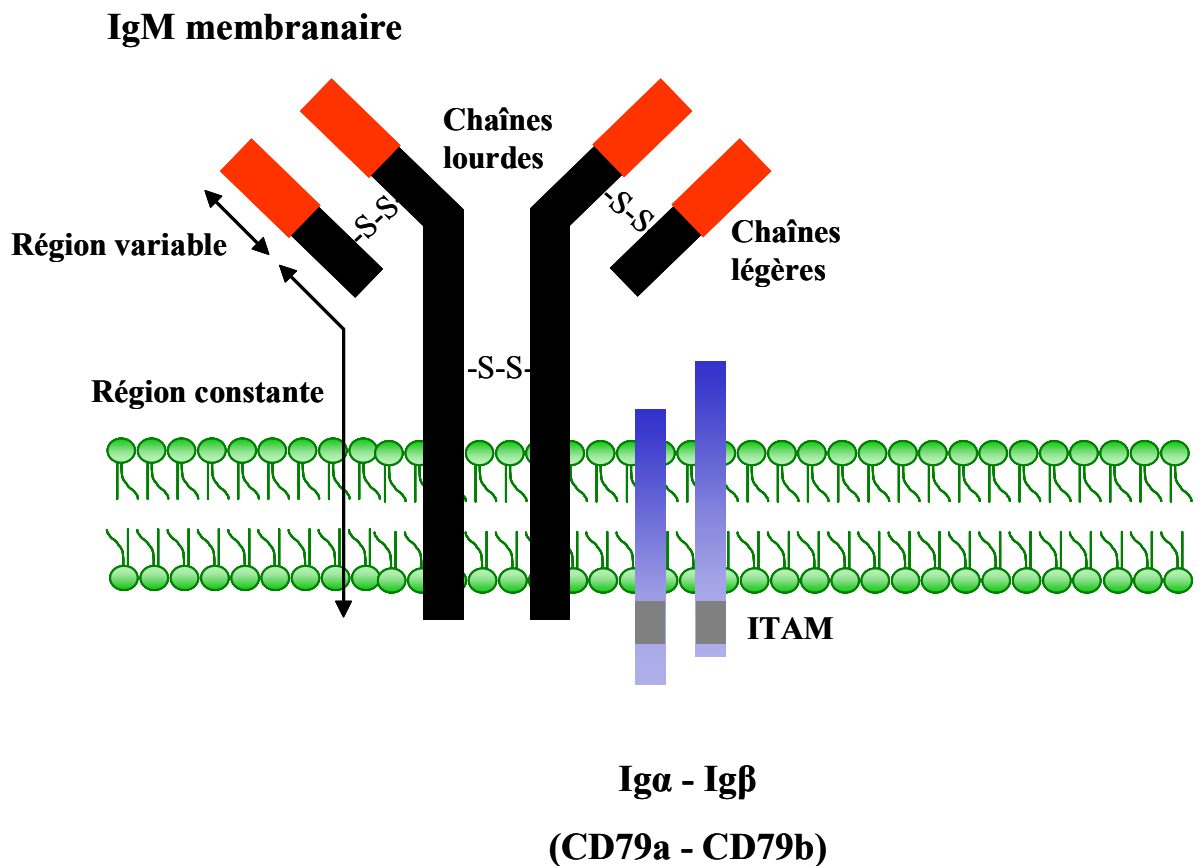


Figure 13 : Structure du récepteur à l'antigène des lymphocytes B.

S-S : ponts disulfure ; ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif.

Bien que toutes les cellules B produisent dès le stade de cellules B immatures la forme transmembranaire d'IgM (associée à l'IgD membranaire dans les cellules B matures naïves), les cellules B mémoires expriment, après la commutation de classe, des immunoglobulines de surface d'un nouvel isotype. Ces cellules convertiront cet isotype membranaire en sa forme sécrétée après une stimulation adéquate. Tous les isotypes de l'Ig membranaire ont des queues cytoplasmiques très courtes :

- 3 acides aminés pour les IgM et IgD membranaires,
- 14 acides aminés pour les IgA membranaires,
- 28 acides aminés pour les IgG et IgE membranaires.

Ces domaines sont trop courts pour avoir la capacité d'induire une signalisation.

En effet, si la reconnaissance de l'antigène est effectivement assurée par l'Ig membranaire, différents travaux ont permis de montrer que la transduction du signal était conditionnée par la présence de l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ et son interaction avec l'Ig membranaire. Des études mutationnelles réalisées par plusieurs équipes ont permis de comprendre le rôle de chacun des domaines (extracellulaire, transmembranaire, intracytoplasmique) du BCR. Par exemple, différents mutants de mIgM ont été produits, où des substitutions et délétions ont été introduites dans les domaines transmembranaires ou cytoplasmiques de la chaîne lourde μ (Mitchell et coll., 1991 ; Grupp et coll., 1993). Dans ces études, on distingue les mutants :

- « cyto: Δ » dans lesquels les 3 acides aminés du domaine cytoplasmique ont été entièrement délétés,
- « YS/VV » où le dipeptide polaire Tyr⁵⁸⁷ et Ser⁵⁸⁸ du domaine transmembranaire a été remplacé par 2 Val apolaires.

L'étude du mutant « cyto: Δ » a permis de mettre en évidence que la délétion totale du domaine cytoplasmique de l'IgM était responsable d'une perte de sa fonction de signalisation et de présentation de l'antigène. L'étude à la fois des mutants « YS/VV » et « cyto: Δ » révèle une incapacité à transmettre le signal mais aussi à s'associer à $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. Tous ces résultats démontrent qu'une réelle concordance entre la capacité de signalisation de l'IgM et la liaison aux $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ est nécessaire pour le bon fonctionnement du BCR. Pour comprendre l'importance fonctionnelle de la chaîne lourde μ , l'équipe de DeFranco et coll. a réalisé une construction dans laquelle les 41 acides aminés C-terminaux correspondants à la partie transmembranaire de μ sont remplacés par les domaines transmembranaires et cytoplasmiques de CD8 α . Ce polypeptide chimérique, une fois exprimé dans les cellules 2PK-3 en

combinaison avec une chaîne légère κ , est retrouvé à la surface de la cellule de manière comparable à l'IgM membranaire sauvage. En revanche, le pontage de mIgMCD8 par un antigène n'induit pas de signalisation. Aucune phosphorylation sur résidus tyrosine et aucune hydrolyse de phospholipides ne sont détectées (Blum et coll., 1993). Les auteurs expliquent cette défaillance par le fait que le BCR chimérique n'a pas la capacité de s'associer à l'hétérodimère $Ig\alpha$ - $Ig\beta$. La construction d'un BCR chimérique, par l'équipe de Hombach et coll., analogue à mIgMCD8 où les domaines transmembranaires et cytosoliques de μ ont été remplacés par des domaines de molécules de classe 1 du CMH démontre que ce BCR chimérique est incapable de se lier à $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ (Hombach et coll., 1990). Collectivement, ces observations montrent que la région transmembranaire de μ possède des sites critiques à l'association avec $Ig\alpha$ - $Ig\beta$, et par conséquent, joue un rôle indirect mais essentiel au recrutement de molécules accessoires, nécessaires à la signalisation en aval du BCR.

La transduction du signal du BCR est donc assurée par l'hétérodimère $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ sont des glycoprotéines de 22 kDa et de 26 kDa respectivement, appartenant à la superfamille des immunoglobulines et composées chacune d'un domaine extracellulaire (111 et 129 acides aminés pour $Ig\alpha$ et $Ig\beta$), d'un domaine transmembranaire (22 acides aminés pour $Ig\alpha$ et $Ig\beta$) et d'un domaine cytoplasmique (61 et 48 acides aminés pour $Ig\alpha$ et $Ig\beta$) (Yankee et Clark., 2000). Les régions transmembranaires d' $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ n'ont pas de caractéristique particulière, à l'exception pour $Ig\beta$, où il y a une partie polaire probablement associée au domaine transmembranaire de la chaîne lourde de l'immunoglobuline du BCR. Les régions cytoplasmiques d' $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ ont des caractéristiques spécifiques et nécessaires pour initier les voies de signalisation intracellulaires. Les capacités de signalisation d' $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ sont dépendantes d'un motif spécifique, retrouvé dans chacun des domaines cytoplasmiques appelés ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif).

Décrit pour la première fois en 1989 (Reth., 1989), le motif $(D/E(X)_7D/EXXYXXI/L(X)_7YXXI/L)$ comprend 2 tyrosines séparées par 11 résidus et suivies chacune par une leucine ou isoleucine en position +3. D'autres immuno-récepteurs impliqués dans la réponse antigénique comme le récepteur à l'antigène des cellules T (TCR) possèdent ces motifs ITAM. Des expériences de mutagenèses dirigées ont permis d'expliquer que les tyrosines, les 11 acides aminés placés entre et les résidus leucine/isoleucine en position +3, sont tous requis pour l'initiation de la signalisation induite par le BCR (Sanchez et coll., 1993 ; Flaswinkel et Reth., 1994). A travers leur motif ITAM, $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ ne

contribuent pas de manière équivalente à la signalisation du BCR et présentent des activités biologiques distinctes *in vivo*. Il a été montré que si le domaine cytoplasmique d'Ig α est tronqué, la progression du stade pro-B à pre-B est altérée alors que dans le même cas pour Ig β , les cellules B progressent mais s'arrêtent définitivement au stade immature (Reichlin et coll., 2001). Différentes protéines peuvent s'associer préférentiellement avec Ig α et/ou Ig β . Ainsi, il a été suggéré un rôle plus spécifique à Ig β pour réguler l'expression du BCR à la surface de la cellule, tandis que Ig α aurait un rôle prédominant dans l'activation des protéines tyrosine kinases et porterait une autre fonction de type négative (Torres et Hafen., 1999). En effet, des mutations des motifs tyrosine sur les ITAM d'Ig α augmenteraient la signalisation constitutive du BCR et accentueraient la délétion des cellules B entrant au stade B immature (Kraus et coll., 2001).

II- Signalisation du BCR (B mature)

II.1- Initiation du signal

L'agrégation des BCR suite à la reconnaissance de l'antigène entraîne leur translocation dans des micro-domaines membranaires spécifiques appelés rafts et la phosphorylation des ITAM d'Ig α et Ig β par des protéines tyrosine kinases, appartenant à la famille des kinases Src comme Lyn et Fyn. Initialement, le BCR est exclu des rafts où ces kinases sont concentrées, ancrées à la membrane plasmique via leur acétylation (Pleiman et coll., 1994). Lyn joue un rôle unique dans l'initiation du signal en exerçant à la fois des effets activateurs et répresseurs. Elle est reconnue comme la première kinase responsable de la phosphorylation des ITAM d'Ig α /Ig β à la fois pendant le développement B et lors du pontage du BCR par l'antigène. Sa fonction négative a été suggérée au cours de l'analyse de souris déficientes pour Lyn. En effet, ces souris présentaient, au niveau des lymphocytes B périphériques, une réponse immunitaire exacerbée caractérisée par : une activation accrue d'effecteurs de la signalisation, une augmentation de la concentration cellulaire calcique et une réponse proliférative *in vitro* accentuée. De façon surprenante, le développement dans la moelle osseuse des lymphocytes B était normal, suggérant qu'en l'absence de Lyn, sa fonction soit assurée par d'autres kinases de la famille Src (Hibbs et coll., 1995 ; Chan et coll., 1997). Ainsi, contrairement à sa fonction positive, le rôle négatif de Lyn semble indispensable

à la signalisation du BCR. Par ailleurs, il dépendrait de sa capacité à phosphoryler et donc à activer 2 régulateurs négatifs de la signalisation du BCR : Fc γ RIIB et CD22 (pour détail voir Partie 2 ; paragraphe II-5).

L'initiation du signal (Figure 14) induit par le BCR est indirectement régulée par deux molécules, CD45 et Csk. La kinase Csk (C-terminal src tyrosine kinase) a pour fonction de phosphoryler les kinases Src, comme Lyn, sur le résidu tyrosine « inhibiteur » C-terminal (Y-508 pour Lyn), aboutissant à leur conformation inactive (phosphorylée). Au contraire, la glycoprotéine CD45 est une tyrosine phosphatase transmembranaire (appelée également marqueur B220 des cellules B) dont la fonction principale est d'établir la « sensibilité » du BCR à la stimulation. En effet, CD45 est impliquée dans la déphosphorylation du résidu tyrosine « inhibiteur » des kinases Src, permettant le passage de ces effecteurs à une conformation active (déphosphorylée). Ce rôle important de CD45 est apparu lors d'études de surexpression ou de déficience en CD45 ; ainsi, l'expression d'un mutant CD45 hyper-actif provoque une hyperactivité des lymphocytes B, menant à l'auto-immunité et à la formation de tumeurs. Au contraire, dans des cellules B déficientes en CD45, Lyn est hyper-phosphorylée sur le résidu tyrosine Y508, et n'est donc retrouvée que sous sa forme réprimée, inactive (Pao et coll., 1997 ; Majeti et coll., 2000). Finalement, l'absence de Csk a été corrélée à un état hypo-phosphorylé de la tyrosine 508 de Lyn et à une baisse du seuil d'activation des cellules B (Hata et coll., 1994).

Ainsi, CD45 participe avec Csk à la régulation du statut de phosphorylation des kinases Src. L'équilibre qui en résulte maintient un pool de kinases Src sous forme phosphorylées, inactives, compatibles avec leur activation éventuelle (par déphosphorylation) lors du pontage du BCR.

La phosphorylation des tyrosines contenues dans les ITAM est suffisante à l'initiation de la signalisation et crée des sites de liaison spécifiques de type SH2 (Src-Homology 2) qui permettent notamment le recrutement et l'activation de la tyrosine kinase Syk. Il a été montré que le recrutement et l'activation de Syk ne sont possibles que dans le cas où 2 tyrosines sont phosphorylées ; des Ig α et Ig β chimériques où une des tyrosines est absente se lient avec une très faible affinité à Syk et ne peuvent pas l'activer (Pao et coll., 1998). Syk est un élément indispensable à la transmission du signal aux effecteurs secondaires. Des cellules déficientes en Syk présentent une défaillance dans la signalisation du BCR, malgré une activation des

kinases de la famille Src et des phosphorylations d' Ig α et Ig β relativement intactes (Takata et coll., 1994).

Ainsi, l'activation séquentielle de 3 tyrosine kinases (Lyn, Syk et Btk) est nécessaire à la propagation du signal et à la régulation d'effecteurs en aval de la signalisation du BCR. Ces kinases participent à la constitution du « signalosome ». En effet, des déficiences de ces PTKs aboutissent toutes à une défaillance ou à une aberration dans le développement et la fonction des cellules B.

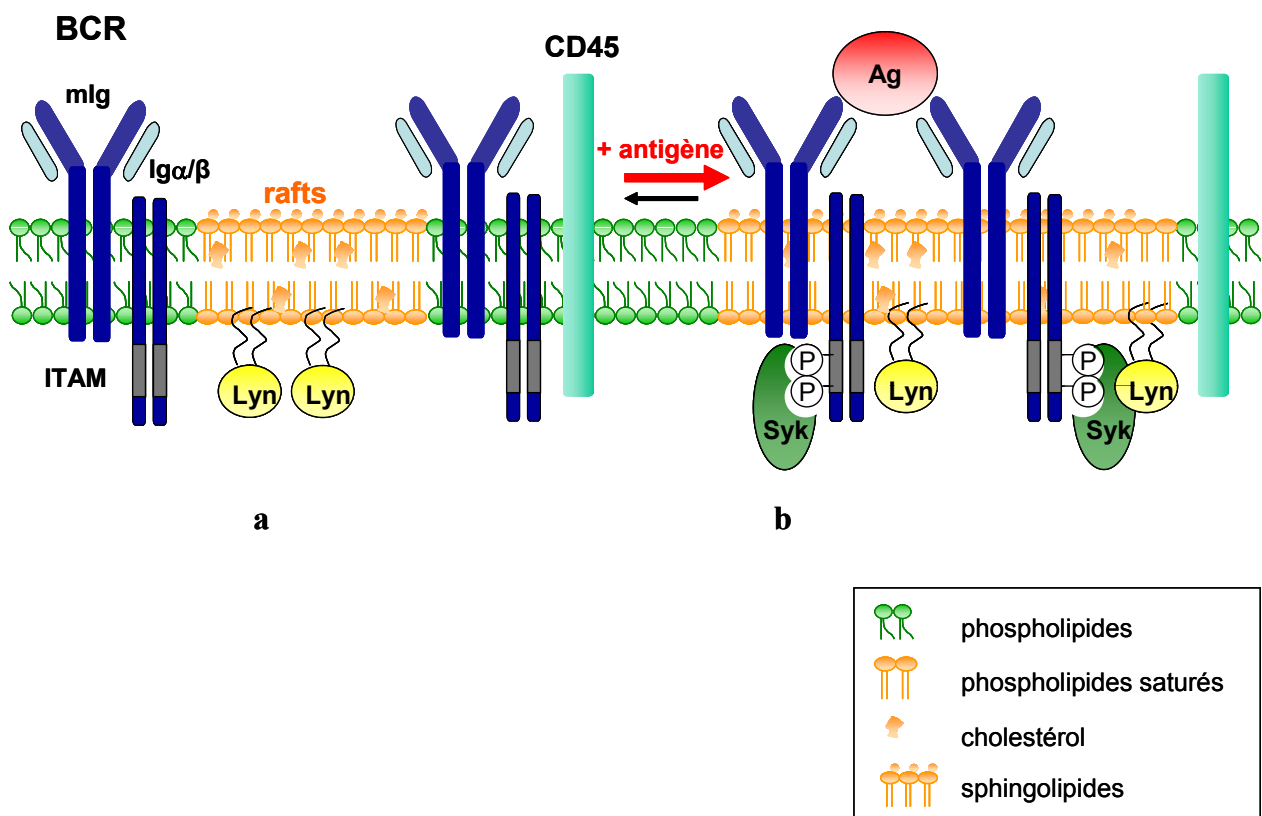


Figure 14 : Initiation de la signalisation du BCR

(Adapté de Pierce et coll., 2002).

a- En absence de l'antigène, le BCR est exclu des rafts, où est concentrée la protéine kinase de la famille Src, Lyn. CD45 est aussi exclu de cette structure. b- Le pontage du BCR par l'antigène provoque l'oligomérisation du BCR, augmentant son affinité pour les rafts. Le BCR est alors stabilisé et s'associe avec Lyn, qui phosphoryle les ITAM d'Ig α et Ig β . Syk est, à son tour, recrutée et peut initier la cascade de signalisation.

II.2- Propagation du signal

Le BCR active 3 voies de signalisation : voie de la PI3-K (phosphoinositide 3-kinase), voie de la PLC- γ 2 (phospholipase C- γ 2) et la voie des MAP-K (mitogen-activated protein kinase). Un des points clé de la voie d'activation du BCR est le recrutement à la face cytoplasmique de la membrane plasmique d'effecteurs enzymatiques responsables de la propagation du signal vers le noyau.

Ce recrutement est réalisé par la formation de complexes impliquant :

- des interactions de type protéines/protéines (par exemple, via des domaines SH2 ou SH3),
- des interactions de type protéines/lipides (par exemple, via des domaines PH (Plestrin Homology), impliquant dans ce cas les phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate [PtdIns(3,4,5) P_3] membranaires).

Ces interactions reliant le BCR aux effecteurs cytosoliques se font soit directement, soit le plus souvent indirectement par l'intermédiaire de molécules adaptatrices. Le rôle déterminant des ces « adaptateurs » dans la signalisation des immuno-récepteurs est apparu ces dernières années, et plus récemment pour le BCR. Il a contribué à l'émergence du concept de « plateforme » de signalisation où ces molécules adaptatrices constituent avec les rafts, les acteurs centraux. En effet, ce concept correspond à l'assemblage inductible et dynamique de différents complexes moléculaires amenant à proximité les substrats de leurs effecteurs, et facilitant les changements conformationnels ou les modifications post-traductionnelles, nécessaires à leur activation optimale (pour revue, Kurosaki., 2002).

II.2.1- La voie de la PI3-K

La famille des PI3-K est divisée en 3 groupes : classe I, II et III. La classe I est elle-même divisée en 2 sous-groupes : IA et IB. Les kinases de la classe IA sont activées par des tyrosines kinases, associées à des récepteurs antigéniques (comme le BCR) ou des récepteurs cytokiniques. Ce sont des enzymes composées d'une sous-unité régulatrice : p85 α , p85 β ou p55 γ et d'une sous-unité catalytique : p110 α , p110 β ou p100 δ . Chacune des sous-unités catalytiques peut s'associer à toutes les sous-unités régulatrices. Les kinases de la classe IB peuvent être activées par des récepteurs couplés aux protéines G comme les récepteurs aux

chimiokines. Elles sont composées d'une sous-unité catalytique unique p110 γ associée à une sous-unité régulatrice unique p101 (Okkenhaug et Vanhaesebroeck., 2003).

La PI3K est impliquée dans de nombreux processus biologiques cellulaires comme la croissance cellulaire, la différenciation, la survie, la migration ou le métabolisme. Dans le système immunitaire, des dérèglements de la signalisation de la PI3-K entraînent des immunodéficiences ou des leucémies et maladies auto-immunes dans le cas d'une « hyper-activation » de la PI3-K. La PI3-K régule le développement et la différenciation des précurseurs de la moelle osseuse, ainsi que l'activation et la prolifération des cellules B matures. Les études phénotypiques des souris déficientes pour 2 gènes de la PI3-K fortement exprimés dans les lymphocytes - la sous-unité régulatrice p85 α et la sous-unité catalytique p110 δ - ont permis de comprendre leurs différents rôles. Par exemple, des souris déficientes pour la sous-unité p85 α présentent des défauts profonds dans le fonctionnement des cellules B : la réponse prolifératrice est diminuée et la survie est altérée. Le passage du stade pro-B à pre-B est anormal et le nombre de cellules B matures diminue à la périphérie (Fruman et coll., 1999 ; Suzuki et coll., 2003).

La PI3-K est activée suite à l'engagement du BCR. Le mécanisme d'activation le mieux connu implique le co-récepteur CD19 (pour détails voir Partie 2, paragraphe II-5). Suite au pontage du BCR, les tyrosines, contenues dans le domaine cytoplasmique de CD19, sont phosphorylées par Lyn, créant un site de liaison de type SH2 pour la sous-unité p85 de la PI3-K. L'association de la PI3-K avec CD19 « rapproche » la PI3-K de ses substrats lipidiques à la membrane plasmique et augmente l'activité de la sous-unité catalytique p110 de la PI3-K. Une fois activée, la PI3-K va phosphoryler en position 3' les phosphatidylinositol 4,5-biphosphate [PtdIns(4,5)P₂] pour générer des [PtdIns(3,4,5)P₃]. La production des [PtdIns(3,4,5)P₃] par la PI3-K est un élément central dans la signalisation du BCR car beaucoup d'effecteurs impliqués dans la cascade contiennent des domaines PH pouvant se lier aux [PtdIns(3,4,5)P₃]. Parmi ces molécules, on distingue les protéines adaptatrices Gab1 et Gab2. Après leur recrutement à la membrane, Gab1 et Gab2 vont être phosphorylées par les tyrosine kinases associées au BCR (Lyn, Syk), amplifiant le recrutement de molécules PI3-K (via des interactions de type SH2) et par conséquent le signal initial (Marshall et coll., 2000 ; Ingham et coll., 2001 ; Koncz et coll., 2002) (Figure 15-A).

Dans la signalisation du BCR, une des cibles de la PI3-K activée est la sérine/thréonine kinase Akt (appelée aussi protéine kinase B, PKB). L'Akt favorise la survie cellulaire en régulant par phosphorylation des facteurs de transcription et des protéines impliquées dans l'apoptose. L'Akt contient des domaines PH et peut donc se lier aux [PtdIns(3,4,5)P₃], générés par la PI3-K, ce qui détermine son recrutement à la membrane plasmique. Ce recrutement entraîne des changements conformationnels qui facilitent sa phosphorylation à la fois sur résidus sérine et thréonine – les deux étant nécessaires à son activation complète. Une fois recrutée et activée, Akt est transloquée dans le cytoplasme puis au noyau où elle peut interagir avec de nombreux substrats. Ainsi, Akt favorise l'activation de plusieurs facteurs de transcription « de survie » comme NF-κB, E2F ; par ailleurs, elle peut aussi transmettre un signal anti-apoptotique et de survie en phosphorylant Bad, protéine de la famille Bcl-2 (Datta et coll., 1997 ; Kandel et Hay., 1999 ; Kane et coll., 1999). En effet, la phosphorylation de Bad neutralise son activité pro-apoptotique (pour détails voir Partie 3).

Enfin, le pontage du BCR mène également à l'inhibition Akt-dépendante de la GSK-3 (glycogen synthase kinase-3). La GSK-3 est une enzyme connue pour ses effets anabolisants dans la signalisation insulinique et elle est constitutivement active dans les cellules B. GSK-3 phosphoryle et déstabilise MYC et la cycline D, protéines nécessaires à la progression des cellules dans le cycle. Ainsi, l'activation d'Akt, dans la signalisation du BCR, participe aussi à l'initiation de la prolifération cellulaire, en plus de son rôle dans la survie des cellules (Beals et coll., 1997).

II.2.2- La voie de la PLC-γ2

Un acteur clé dans l'activation de PLC-γ2 est BLNK (B-cell linker protein), une protéine adaptatrice portant des domaines SH2. A la suite de l'engagement du BCR, BLNK se lie, via ses domaines SH2, à Iγα. Syk phosphoryle ensuite BLNK, créant ainsi un site de liaison possible à la PLC-γ2. Une fois liée à BLNK, la PLC-γ2 est activée à la fois par Syk et la protéine kinase Btk - elle-même recrutée à la membrane plasmique par sa liaison aux [PtdIns(3,4,5)P₃] via ses domaines PH (Figure 15-B). Btk peut être aussi directement associée au complexe BLNK- PLC-γ2, car elle peut se lier, par ses domaines SH2, aux résidus tyrosine phosphorylés de BLNK. Dans ce cas, BLNK, par l'accrochage à la fois de la PLC-γ2 et de la Btk, favorise leur rapprochement et la phosphorylation de PLC-γ2 par Btk. La PLC-

$\gamma 2$, une fois activée, va agir en produisant, à partir des phospholipides membranaires, des inositol (1,4,5)-triphosphate [$\text{Ins}(1,4,5)P_3$] et du DAG (diacylglycérol). L' $[\text{Ins}(1,4,5)P_3]$ produit entraîne le relargage de Ca^{2+} des différents lieux de stockage intracellulaires. L'augmentation du niveau de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} est nécessaire à l'activation de facteurs de transcription comme NF- κ B et NF-AT, eux-mêmes respectivement sous la dépendance de la PKC et de la calmoduline Ca^{2+} -dépendante (Engels et coll., 2001 ; Kabak et coll., 2002). Le DAG, autre second messenger dérivé de la PLC- $\gamma 2$, active différentes enzymes comme les multiples isoformes de la PKC. La PKC, dans ce contexte, contribue à l'activation de NF- κ B et de la voie des MAP-Kinases (Krappmann et coll., 2001).

II.2.3- Voie des MAP-Kinases

La signalisation du BCR induit l'activation de la voie MAP-kinase regroupant 3 membres : ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK/SAPK (c-Jun NH2-terminal kinase) et p38 MAPK (Johnson et Lapadat., 2002). Après leur activation en cascade, ces kinases vont jouer leur rôle dans la signalisation en phosphorylant différents groupes de facteurs de transcriptions : Elk-1 et c-Myc – pour ERK, c-Jun et ATF-2 – pour JNK et ATF-2 et MAX pour p38 MAPK. Des enzymes GTPases comme Ras et Rac1 vont intervenir en amont dans l'activation d'ERK, JNK et p38 MAPK. Par exemple, Ras contrôle la cascade Raf-1/MEK/ERK. L'activation de cette voie est essentielle au développement des cellules B et à la prolifération des cellules B matures (Iritani et coll., 1997). La phosphorylation des ITAM permet le recrutement indirect de la molécule adaptatrice Shc qui va former un complexe avec les molécules adaptatrices Grb2 et SOS. SOS, membre de la famille Ras-GEF (Ras guanyl nucleotide-exchange factor), est un facteur d'échange de nucléotides qui va permettre, en favorisant l'échange GDP/GTP, l'activation de Ras et l'initiation de la cascade Ras/Raf-1/MEK/ERK (Tognon et coll., 1998 ; Gold et coll., 2000) (Figure 15-C).

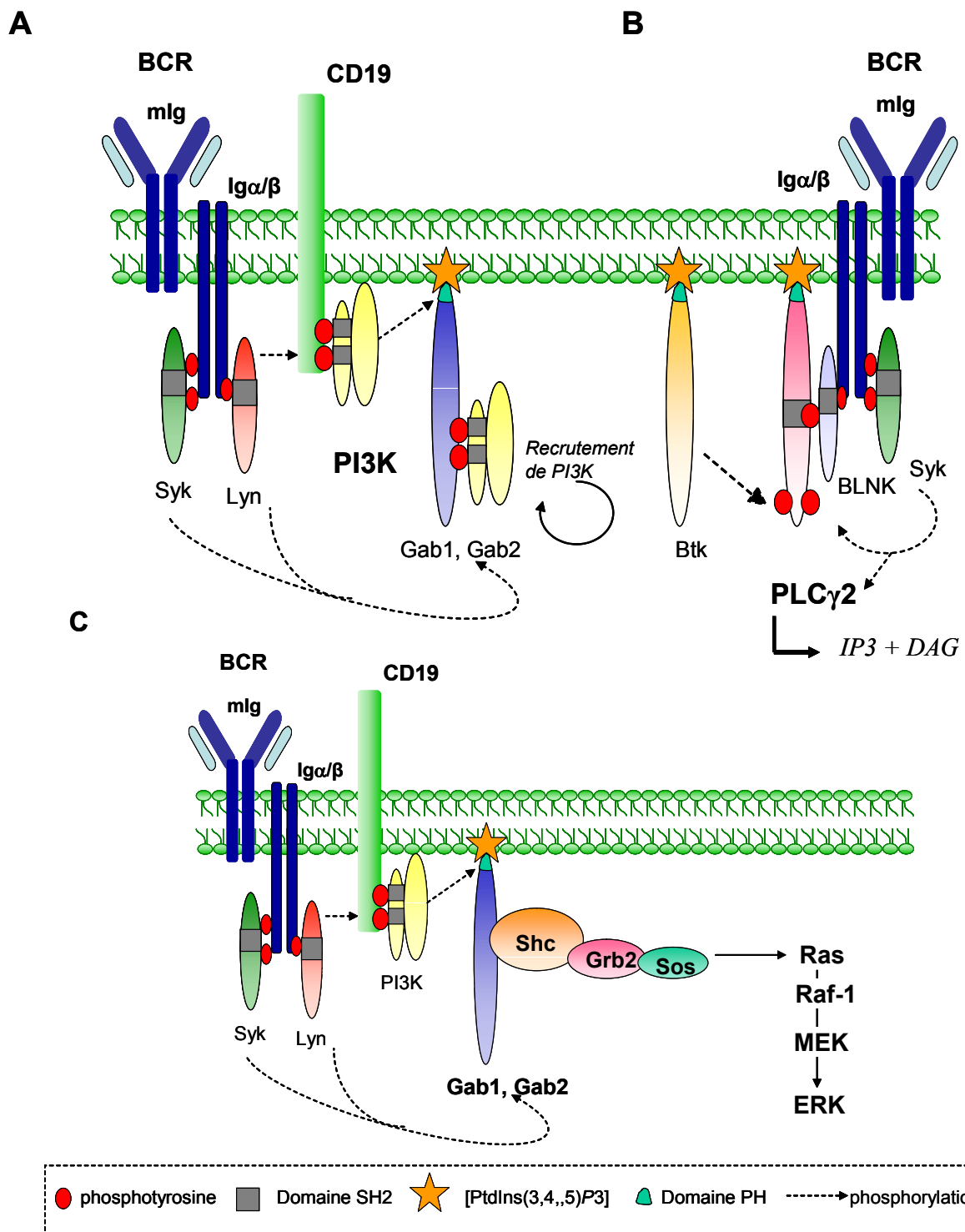


Figure 15 : Les différentes voies de signalisation du BCR (Adapté de Gold et coll., 2002).

A- La PI3K est activée suite à l'engagement du BCR et phosphoryle les [PtdIns(4,5)P₂] pour générer des [PtdIns(3,4,5)P₃]. Après leur recrutement à la membrane par les [PtdIns(3,4,5)P₃], Gab1 et Gab2 sont phosphorylées par Lyn, conduisant à un recrutement accru de PI3K, amplifiant le signal initial. B - Syk phosphoryle BLNK, créant ainsi un site de liaison possible à la PLC-γ2. Une fois liée à BLNK, la PLC-γ2 est activée à la fois par Syk et la Btk. La PLC-γ2 active va agir en produisant des [Ins(1,4,5)P₃] et du DAG. C- La cascade Raf-1/MEK/ERK est initiée, suite à l'activation de Ras via Sos.

II.3- Intégration du signal

Les différentes voies de signalisation induites par le BCR aboutissent à la régulation de plusieurs facteurs de transcription. Le BCR active notamment NF- κ B de manière dépendante de la PKC (Krappmann et coll., 2001). L'activation rapide et transitoire de NF- κ B en réponse à tout type de stimuli implique généralement la phosphorylation de I κ B par le complexe kinase IKK (**I** κ **B kinase**) composé de 2 sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une sous-unité régulatrice IKK γ /NEMO. I κ B maintient NF- κ B dans le cytosol. Ainsi, une fois phosphorylé, I κ B est dégradé par la voie de l'ubiquitine et cette dégradation libère NF- κ B qui peut alors être transloqué au noyau et initier la transcription. NF- κ B favorise notamment la resynthèse de I κ B, créant une boucle d'autorégulation mettant fin au processus d'activation (Kucharczak et coll., 2003). Dans le cas des lymphocytes B, des études montrent que NF- κ B est impliqué dans la survie des lymphocytes B matures, puisque la suppression de l'activité endogène de NF- κ B mène ces cellules B stimulées par un anti-IgM vers l'apoptose (Wu et coll., 1996). De plus, l'inactivation de IKK β et IKK γ /NEMO après l'engagement du BCR, entraîne une inhibition dramatique de la stimulation de NF- κ B et la mort cellulaire (Petro et coll., 2000 ; Pasparakis et coll., 2002). NF- κ B favorise la survie en agissant sur le cycle et en prévenant de l'apoptose puisqu'il a pour cible les gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-x_L ou Bfl-1/A1. Le BCR régule aussi la translocation nucléaire de NF-AT. La calcineurine (Ser/Thr phosphatase, PP2B) activée par le complexe Ca²⁺/calmoduline va déphosphoryler NF-AT, conduisant à un changement conformationnel mettant en évidence un domaine-signal de localisation nucléaire. NF-AT, une fois dans le noyau, peut favoriser la transcription (Gold., 2000).

Les kinases ERK, JNK et p38 MAPK lient aussi le BCR à des facteurs de transcription. Quand elles sont activées, ces kinases entrent dans le noyau et phosphorylent plusieurs facteurs de transcription comme Elk-1, c-Jun, ATF-2 (**a**ctivating **t**ranscription **f**actor **2**) et MEF2C (**m**yoocyte **e**nhancer **b**inding **f**actor **2C**). L'activation, induite par la signalisation du BCR, de ces facteurs de transcription pré-existants dans la cellule aboutit aussi à l'augmentation de l'expression d'autres facteurs de transcription (c-Myc, c-Fos) qui activent eux-mêmes des gènes contribuant à la prolifération cellulaire et la survie.

II.4- Importance des rafts dans la signalisation du BCR

La découverte récente de microdomaines glycosphingolipidiques (généralement désignés par le terme de radeaux lipidiques, « lipid rafts ») dans une grande variété de types cellulaires a bouleversé la représentation de la membrane plasmique. Ceci a notamment permis de comprendre comment le BCR une fois engagé pouvait interagir avec différentes enzymes de signalisation. Les rafts agissent comme une plate forme de signalisation et de trafic ; en fait, ils correspondent à une structure rigide qui évolue dans la « mozaïque fluide », qu'est la membrane plasmique (Simons et Toomre., 2000). Ils sont riches en sphingolipides et cholestérol. Bien que leur taille et leur durée de vie dans les membranes de cellules non stimulées restent encore incertaines, des travaux montrent que ce serait de petites structures d'environ 26 à 70 nm de diamètre contenant quelques milliers de molécules. Leur demie-vie serait estimée de quelques millisecondes à quelques minutes (Friedrichson et Kurzchalia., 1998 ; Brown et Jacobson., 2001).

Les rafts concentrent de nombreuses protéines de la famille des kinases Src et concentrent également l'actine et l'ezrine. Mais d'autres protéines membranaires comme la tyrosine phosphatase CD45 et le récepteur CD22 sont exclus des rafts. Après isolement des rafts par solubilisation des membranes avec des détergents non ioniques, il a été montré que le BCR de cellules B au repos était exclu des rafts (Cheng et coll., 1999). Dans les cellules B matures, suite à la liaison de l'antigène, le BCR est immédiatement associé aux rafts. Cette translocation est stable jusqu'à 30 minutes après l'activation. Une fois à proximité de Lyn, il est phosphorylé et d'autres molécules impliquées dans la cascade de signalisation du BCR vont être recrutées : Syk, Btk, SHIP, PLC- γ 2 et BLNK, PI3K (Aman et Ravichandran., 2000 ; Petrie et coll., 2000). Le pontage du BCR a pour conséquence d'augmenter l'affinité du BCR pour les rafts, ce qui favorise la stabilisation spatiale du récepteur dans les rafts. De plus, les études s'intéressant aux mécanismes moléculaires de l'association entre le BCR et les rafts montrent que la phosphorylation du récepteur et son association à l'actine (suite à la liaison avec l'antigène) ne sont pas requises pour son association aux rafts. En effet, Cheng et coll ont montré par exemple que le traitement des cellules avec des inhibiteurs de l'actine ne bloque pas la translocation du BCR aux rafts (Cheng et coll., 2001). Cependant, bien que le BCR soit localisé aux rafts en l'absence de phosphorylation ou d'actine, l'association du récepteur aux rafts semble néanmoins moins stable. Dans les cellules B matures, la

stabilisation de tous les complexes enzymes-ligands, précédemment cités, favorise la formation d'une boucle d'amplification du signal contribuant à la survie et la prolifération des cellules.

II.5- Modulation de la signalisation du BCR

La signalisation du BCR est une voie régulée :

- par la concentration de l'antigène et la force de liaison entre l'antigène et le récepteur (Casola et coll., 2004),
- par auto-régulation du BCR lui-même. La phosphorylation d'Ig α -Ig β peut dicter la qualité et la quantité du signal. Choquet et coll. ont montré par exemple que même si Ig α -Ig β étaient capables tous les 2 d'induire un signal calcique, Ig α induit le relargage et l'influx extracellulaire du Ca²⁺ et au contraire, Ig β n'induit que la formation de pics de concentration intracellulaire de Ca²⁺ courts et répétés (Choquet et coll., 1994). De plus, Ig β régule Ig α , il favorise et augmente la phosphorylation d'Ig α (Luisiri et coll., 1996),
- par des co-récepteurs (Tsubata., 1999) (Figure 16). La qualité du signal et son intensité peuvent être en effet modulées par l'association de co-récepteurs au complexe formé par le BCR.

La molécule CD19 associée au BCR favorise son entrée dans les rafts et contribue positivement à la signalisation induite par Ig α /Ig β en favorisant le recrutement et l'activation de Lyn, de la PI3K et de Btk (Bulh et Cambier., 1999 ; Cherukuri et coll., 2001). Des expériences *in vitro* sur des cellules déficientes en CD19 montrent une diminution des événements de phosphorylation sur résidus tyrosine et une diminution de la réponse proliférative (Engel et coll., 1995). Différents travaux suggèrent que CD19 est recrutée soit directement au BCR, soit en formant un complexe moléculaire avec la molécule CD81 et le récepteur au C3d du complément, CD21. CD81 se comporte comme une molécule chaperonne, favorisant la propre propagation du complexe associé au BCR pendant la signalisation (Carter et coll., 1997 ; Cherukuri et coll., 2004).

A l'inverse, le co-récepteur CD22 régule négativement le signal du BCR en déclenchant une boucle de rétrocontrôle. CD22 appartient à la superfamille des immunoglobulines, pouvant se lier à des ligands contenant des acides sialiques. CD22 contient, dans sa partie cytoplasmique, des motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) phosphorylés par Lyn

après ligation du BCR. Des sites de liaison de type SH2 sont ainsi créés et CD22 va exercer son effet négatif en recrutant, par ces domaines, la tyrosine phosphatase SHP-1 (SH2 containing tyrosine phosphatase-1) (Nitschke et coll., 2001). Les substrats de SHP-1 regroupent entre autre Syk, BLNK et CD22 lui-même (Mizumo et coll., 2000). Par exemple, la déphosphorylation de BLNK par SHP-1 empêche le recrutement de PLC- γ 2 tandis que la déphosphorylation de Syk et des kinases Src diminue leur activité et donc empêche la phosphorylation supplémentaire des ITAM du BCR. Ainsi, l'activation de Lyn contribue d'une part à l'initiation du signal BCR par phosphorylation des motifs ITAM et d'autre part à sa régulation négative par phosphorylation des motifs ITIM de CD22. CD19 participerait à l'induction des signaux inhibiteurs de CD22 en favorisant l'activation de Lyn, pouvant elle-même phosphoryler CD22 et donc favoriser le recrutement de SHP-1.

Le récepteur de faible affinité pour les fragments Fc des IgG, appelé Fc γ RIIB (Fc γ RIIB) ou CD32 exerce un effet négatif sur la signalisation du BCR et inhibe la prolifération. De façon similaire à CD22, le signal inhibiteur de Fc γ RIIB est assuré par la phosphorylation par Lyn de motifs ITIM contenus dans sa partie cytoplasmique, favorisant le recrutement et l'activation de tyrosine phosphatases comme SHP-1 et SHP-2. Ces dernières agissent directement en hydrolysant les [PtdIns(3,4,5) P_3] en [PtdIns(3,4) P_2] ou indirectement en déphosphorylant CD19, bloquant ainsi le recrutement et l'activation de la PI3K (Hippen et coll., 1997 ; Fong et coll., 2000).

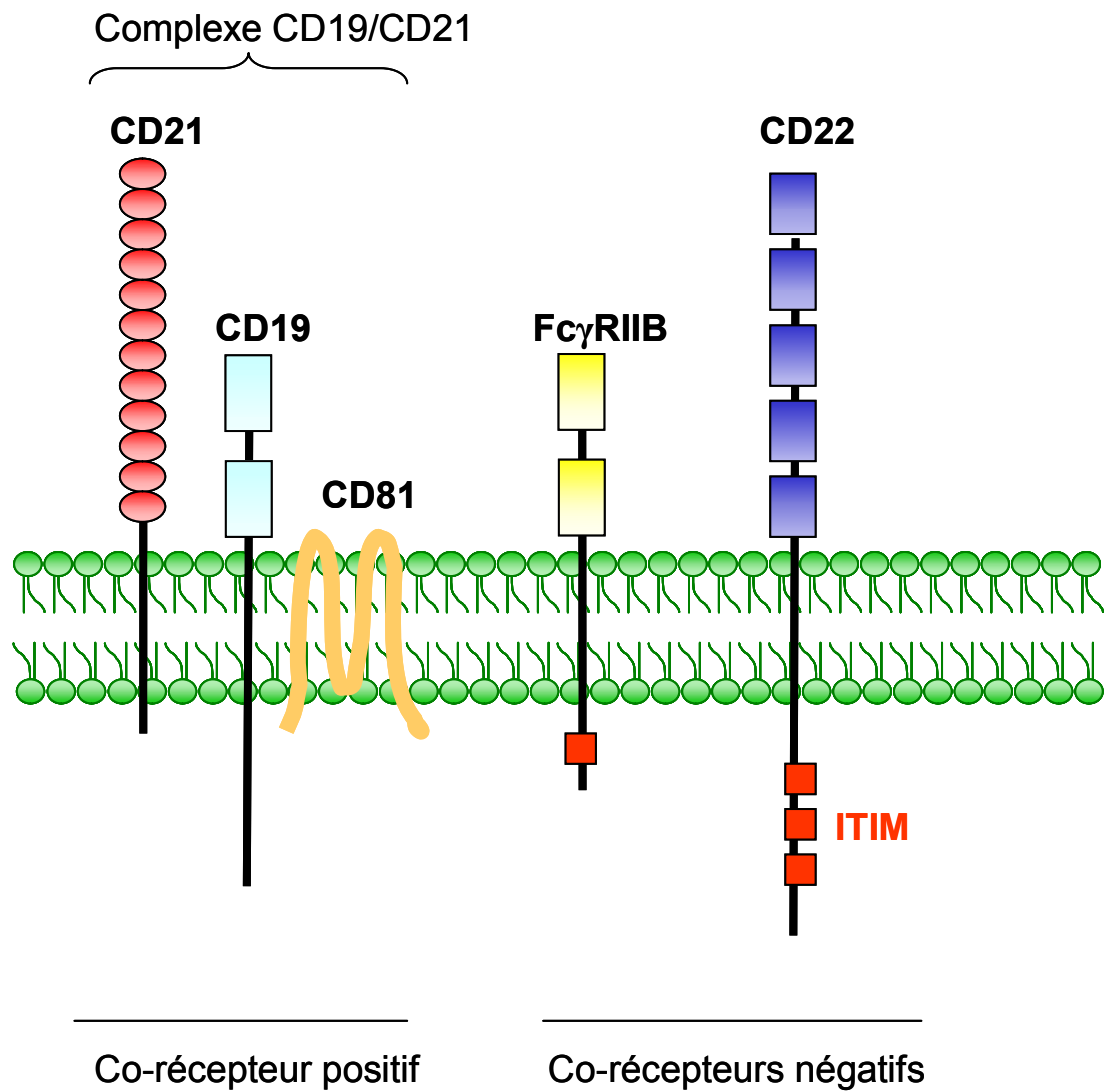


Figure 16 : Représentation schématique des co-récepteurs du BCR
(Adapté de Kurosaki et coll., 2002).

ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif.

II.6- Apoptose et ontogenèse B : dualité fonctionnelle du BCR

Au niveau du système immunitaire, la mort cellulaire programmée est essentielle à l'établissement du répertoire de lymphocytes et au maintien du pool de cellules lymphoïdes pendant toute la vie. Au cours de leur développement, les lymphocytes T et B ré-arrangent au hasard leur récepteur, générant de multiples clones, exprimant chacun un récepteur unique et spécifique. L'obtention de cette diversité requiert des mécanismes empêchant les reconnaissances d'auto-antigènes. L'élimination des cellules auto-réactives (sélection négative) est un point critique à la prévention de l'auto-immunité. Des travaux réalisés sur des souris génétiquement modifiées par la perte ou la surexpression de régulateurs de l'apoptose montrent que l'échec d'apoptose dans les lymphocytes entraîne des maladies auto-immunes. L'inhibition de l'apoptose par l'expression de transgène de Bcl-2 ou la perte de Bim empêche la sélection négative à la fois des lymphocytes T et B et permet donc la survie des cellules potentiellement auto-réactives (Marsden et Strasser., 2003). La sélection négative est imposée dans les cellules B immatures de la moelle osseuse, où le pontage du BCR peut entraîner 3 mécanismes : la délétion (mort par apoptose), l'anergie ou la ré-édition du récepteur (« receptor editing ») (Figure 17).

Les cellules pre-B expriment un pre-BCR, composé d'une chaîne lourde μ et d'une pseudo chaîne légère. Bien qu'il soit très controversé que ce pré-BCR ait un ligand, son expression et la signalisation qu'il induit sont nécessaires à la survie des cellules pre-B, au réarrangement des gènes des immunoglobulines de la chaîne légère et à la différenciation en cellules B immatures. Les cellules B immatures qui reconnaissent avec une forte affinité des auto-antigènes vont être éliminées par apoptose ou éditer un nouveau récepteur (Hertz et Nemazee., 1998 ; Sandel et coll., 1999). La délétion des lymphocytes B immatures auto-réactifs n'implique pas la voie Fas mais utilise une voie pouvant être inhibée par Bcl-2 ou Bcl-x_L (Fang et coll., 1998 ; Nisitani et coll., 1993). De plus, la protéine Bim semble être un inducteur critique de l'apoptose induite par pontage du BCR à ce stade immature ; des déficiences en Bim préviendraient l'élimination des cellules B autoréactives, causant l'accumulation de cellules sécrétrices d'auto-anticorps et favorisant l'apparition de lupus systémique érythémateux (Bouillet et coll., 1999). Les cellules B peuvent aussi induire un second réarrangement de leurs gènes d'immunoglobulines sur le locus de la chaîne légère,

entraînant la synthèse d'un récepteur avec une nouvelle spécificité antigénique. Ce processus appelé « receptor editing » est initié et continue jusqu'à ce qu'un récepteur non auto-réactif soit généré ; si le mécanisme échoue, la cellule est éliminée et meurt par apoptose. Il a été montré que l'extension de la durée de vie des cellules B auto-réactives favorisée par l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L augmentait le processus de ré-édition du récepteur ; ceci « donne plus de temps aux cellules pour produire un nouveau BCR », alors que la mort aurait déjà dû être enclenchée (Lang et coll., 1997).

Les cellules B immatures sélectionnées négativement quittent la moelle osseuse et migrent vers la périphérie, notamment vers la rate où elles passent par le stade de cellules B dites transitionnelles (Wang et Clark., 2003). Les cellules B transitionnelles se différencient en cellules B matures qui peuvent survivre pendant plusieurs semaines. Il a été montré que la survie des cellules B matures nécessitait un signal tonique à « bas bruit » constitutif du BCR (Lam et Rajewsky., 1998). Ainsi, la délétion expérimentale du BCR à la surface des lymphocytes B matures détermine leur mort.

Les cellules B matures circulent dans le corps à travers les organes lymphoïdes où des antigènes étrangers sont retenus. Le devenir d'un lymphocyte B mature, suite à sa rencontre avec l'antigène dont il est spécifique dépend, de la force et de la durée de signalisation ainsi que de la présence ou non de co-sinaux (Healy et coll., 1998). Pour les antigènes solubles qui engagent un nombre modéré de BCR, et entraînent une signalisation modérée, un co-signal est requis pour la prolifération et la différenciation du lymphocyte B en cellules productrices d'anticorps ou plasmocytes. La co-stimulation est assurée par la molécule CD154 (CD40 ligand), présente à la surface des lymphocytes T activés, qui se lie au récepteur CD40, présent sur les cellules B. Les signaux de CD40 s'associent au signal d'activation du BCR et antagonisent les signaux de mort, prévalents en l'absence de co-sinaux. Au contraire, les cellules B qui reçoivent un signal fort et aigu n'ont pas besoin de co-sinaux de stimulation donnés par le lymphocyte T pour se différencier en cellules productrices d'anticorps. Les antigènes qui induisent de forts signaux du BCR (Ag thymo-indépendants), tels que les parois des cellules bactériennes et les particules virales qui contiennent beaucoup de copies du même antigène, déterminent un rassemblement important de la réorganisation des BCRs. Des cellules B matures dans lesquelles un BCR auto-réactif est exprimé sont rapidement délétées *in vivo* ; dans ce système, les cellules ne reçoivent sans doute pas d'informations des cellules T et ainsi, l'absence de la signalisation CD40 prévient la régulation positive de Bcl-2, qui

protège de l'apoptose (Lam et Rajewsky., 1998). Bien que les cellules B auto-réactives reconnaissant des auto-antigènes de surface doivent être éliminées au stade immature et transitionnel, certaines cellules, reconnaissant des antigènes du soi solubles et ne provoquant qu'un signal modéré, sont silencieuses au stade B mature (Cyster et Goodnow., 1995).

L'exposition chronique et prolongée à des auto-antigènes solubles va petit à petit déconnecter le BCR de sa voie de signalisation classique, les cellules deviennent réfractaires à l'activation, elles sont dites anergiques. Les lymphocytes B anergiques ont une durée de vie courte et ne peuvent pas exprimer certaines protéines qui pourraient les protéger de l'induction de l'apoptose par Fas, présent à la surface des cellules B. Ainsi, les cellules B auto-réactives et stimulées chroniquement sont éliminées par des lymphocytes T activés exprimant le Fas-ligand. Au contraire, d'autres lymphocytes B qui reçoivent un signal fort d'un antigène étranger synthétisent les protéines FAIM (Fas apoptosis inhibitory molecule) et c-FLIP [cellular FLICE (FAD-like II-1 β -converting enzyme) inhibitory protein], protéines qui confèrent une résistance à l'apoptose médiée par Fas (Rothstein et coll., 2000). La mort induite par Fas est un autre important mécanisme pour éliminer les cellules B auto-réactives et des mutations de Fas ou de Fas-ligand conduisent à l'apparition de maladies auto-immunes.

Ainsi, comme nous venons de le voir, l'engagement du BCR par l'antigène conduit à de multiples réponses cellulaires (activation, anergie, apoptose, ré-édition) dépendantes de facteurs additionnels comme l'environnement et le stade de développement. Il est particulièrement intéressant de remarquer qu'une forte signalisation du BCR (induite par un antigène étranger) aboutit à la survie, prolifération et différenciation des lymphocytes B matures, alors que la même signalisation produite par un auto-antigène conduit souvent le lymphocyte B immature vers la mort cellulaire programmée ou apoptose. Pour tenter d'expliquer cette dualité fonctionnelle, nous nous proposons maintenant d'analyser les différences de signalisation induite par le BCR entre B matures (décrite dans le paragraphe précédent) et B immatures, pouvant expliquer le devenir différent des cellules B.

Les signaux induits par le BCR sont quantitativement et qualitativement différents entre les lymphocytes B matures et immatures. Bien que les profils électrophorétiques des protéines phosphorylées sur résidus tyrosine soient similaires dans les 2 cas, l'analyse de la phosphorylation et la composition de complexes multiprotéiques associés plus

particulièrement avec Gab1/2 démontrent des différences. Gab1/2 régule l'activité PI3K et PLC- γ 2 ; par ailleurs, en s'associant à la phosphatase SHP-2, elle contrôle aussi l'activité de Erk1/2 (Craddock et coll., 2001). Il a été montré que le niveau de phosphorylation de Gab1 diffère significativement entre des cellules B matures et immatures. Gab1 est partiellement phosphorylée dans les B immatures et le pontage du BCR ne provoque pas de phosphorylation supplémentaire. Ainsi, comme l'association de Gab1/2 avec d'autres molécules est dépendante de sa phosphorylation, les possibilités de former des complexes sont plus restreintes dans les cellules B immatures. La perte de phosphorylation de Gab1/2 doit donc réguler négativement les activités de la PI3K et de la PLC- γ 2, ce qui pourrait expliquer l'absence relative d'hydrolyse des [PtdIns(4,5)P₂] dans les lymphocytes B immatures (Yellen et coll., 1991).

La phosphorylation de Erk est indispensable à l'induction du signal prolifératif dans les cellules B matures. Or, dans les lymphocytes B immatures, l'activation d'Erk1/2 est réprimée. Koncz et coll. ont ainsi observé une différence dans la cinétique de phosphorylation de Erk1/2 entre les cellules B matures et immatures. Dans les cellules B matures, Erk est phosphorylé dès la stimulation et ce signal est maintenu, alors qu'on observe une phosphorylation transitoire disparaissant au bout de 2h dans les cellules B immatures. Ainsi, la phosphorylation insuffisante de Gab1/2, associée à la perte d'activation de Erk 1/2 entraînent la suppression de la transcription de facteurs nécessaires à la survie et prédisposent les cellules B immatures à l'apoptose (Koncz et coll., 2002). Tous ces résultats montrent que la protéine adaptatrice Gab1/2 a un rôle décisif dans la dualité fonctionnelle de la signalisation du BCR.

La différence de séquestration du BCR dans les rafts a été également proposée comme pouvant contribuer à la différence de signalisation intrinsèque entre les cellules B matures et immatures (Figure 18). En effet, le pontage du récepteur dans les cellules B immatures ne détermine pas de colocalisation du BCR avec les rafts comme dans les cellules B matures. Bien qu'un traitement avec un anti-IgM entraîne l'agrégation des récepteurs dans les cellules B immatures, les complexes formés ne sont pas transloqués aux rafts. Une étude comparative de la fraction contenant les rafts a été réalisée à partir de cellules B murines matures (lignées CH27 et A20) et de cellules B murines immatures (lignées WEHI-231) ; elle met en évidence qu'après pontage du BCR, le nombre et l'intensité de phosphorylation des protéines associées aux rafts ont augmenté dans les cellules A20 et CH27 et n'ont pas du tout changé dans les cellules WEHI-231- résultats retrouvés à l'inverse dans la fraction soluble et corrélés à un

signal d'apoptose pour les cellules B immatures (Sproul et coll., 2000). Dans les cellules B matures, la localisation du BCR dans les rafts et sa mise à proximité avec les protéines de la famille Src kinases et la protéine Syk stabilisent et favorisent à la fois la cascade de signalisation délivrée par le BCR. Au contraire, dans les cellules B immatures et anergiques, comme la signalisation et notamment les interactions protéines/protéines se déroulent en dehors des rafts, la boucle d'amplification du signal est restreinte et ceci favoriserait la balance signalétique vers l'apoptose.

Il ressort de ces différents travaux que la co-localisation du BCR avec les rafts semble être corrélée à la signalisation de survie tout au long du développement B (pre-B, B mature après pontage de l'antigène). A l'inverse, l'absence ou le défaut de cette co-localisation est toujours associée à l'anergie/apoptose des cellules B (B immatures, B anergiques) (Figure 18).

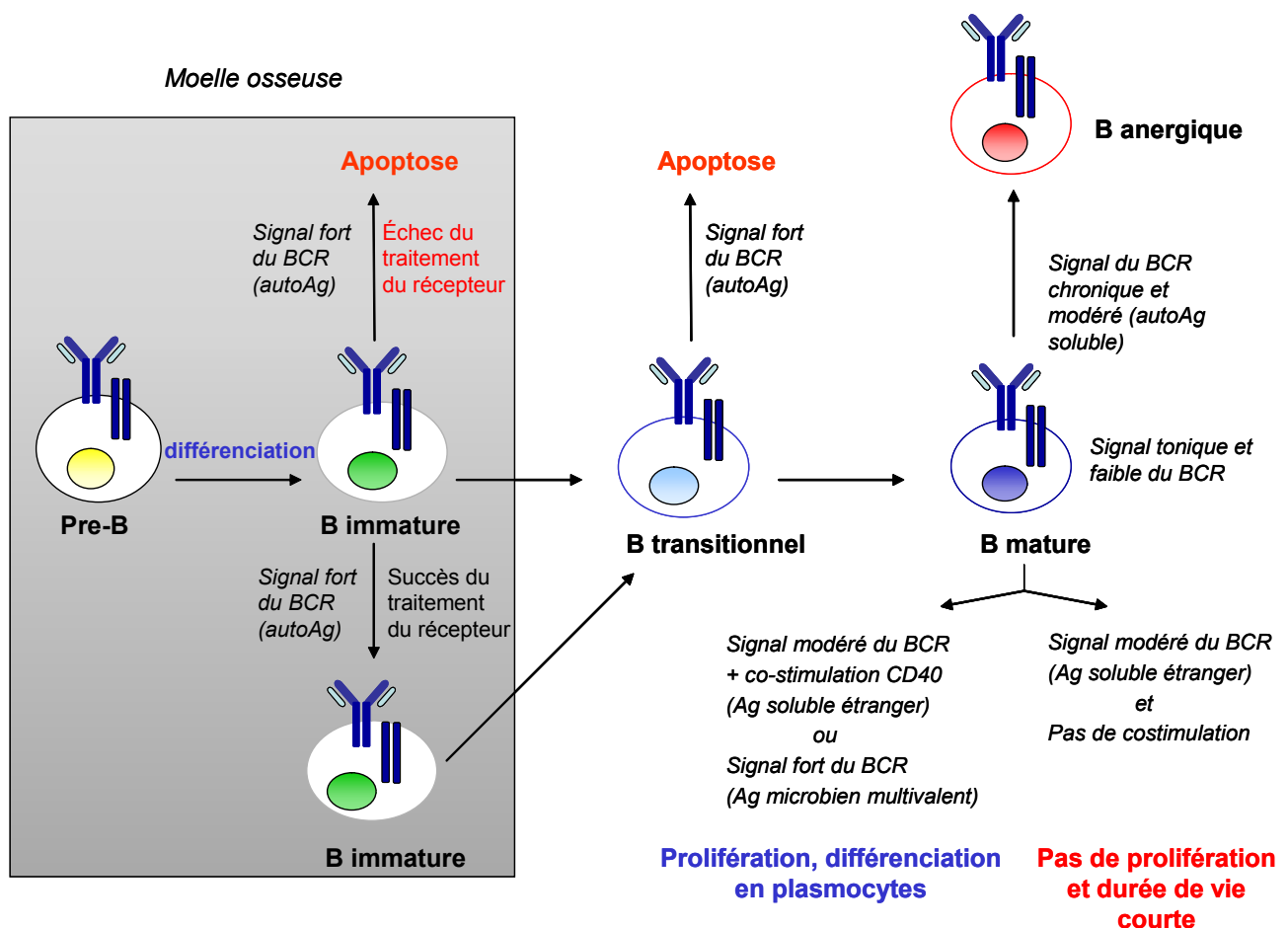


Figure 17: Mécanismes de sélection négative pendant le développement des lymphocytes B (Adapté de Gold., 2002).

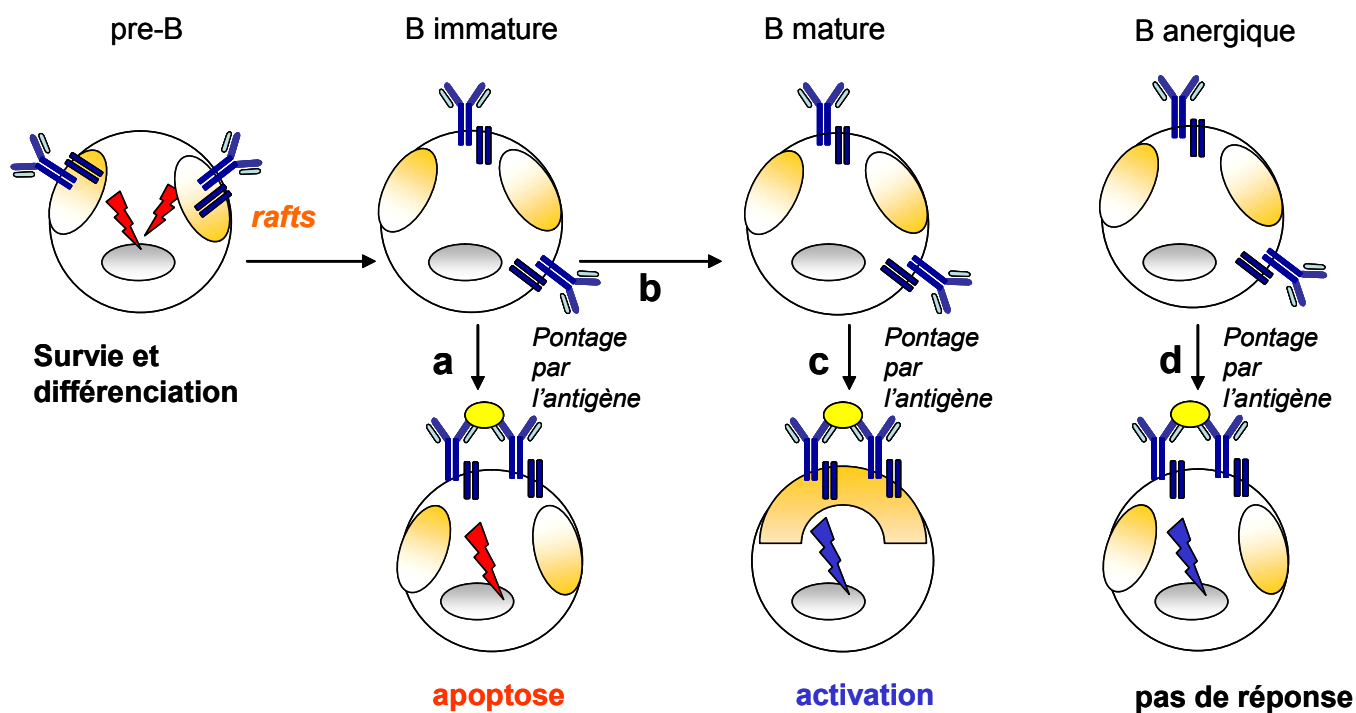


Figure 18 : Le BCR et les rafts dans le développement B (Adapté de Pierce., 2002).

Dans les cellules pre-B, le pre-BCR réside constitutivement dans les rafts et provoque un signal pour le réarrangement de la chaîne légère et pour le passage de la cellule au stade B immature.

a- Dans les cellules B immatures, le BCR est exclu des rafts et après liaison de l'antigène (auto-antigène), le signal entraîne l'apoptose des cellules. b- Si la rencontre antigène-lymphocyte B immature n'a pas lieu, le développement continue et la cellule passe au stade B mature. c- Dans les cellules B matures, la liaison de l'antigène (étranger) au BCR entraîne la translocation du BCR aux rafts et l'activation de la cellule. d- Le BCR, exprimé par des cellules rendues tolérantes ou anergiques suite à l'exposition chronique d'un antigène, est exclu des rafts après liaison de l'antigène et ne permet pas l'activation des cellules.

Partie 3 : Implication de la protéine Bad dans la signalisation du BCR et le devenir du lymphocyte B ?

I- Phosphorylation/Déphosphorylation des protéines de la famille Bcl-2

I.1- Phosphorylation et fonctionnalité des protéines de la famille Bcl-2

Au cours d'un signal apoptotique, de nombreux mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'activité des acteurs pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Parmi les modifications post-traductionnelles, les événements de phosphorylation et déphosphorylation réversibles assurés par des kinases et phosphatases sont considérés comme les plus importants.

Dans le cas de Bcl-2, sa phosphorylation a d'abord été associée à la perte de son activité anti-apoptotique et donc à la mort cellulaire. Par la suite, les travaux de May et coll. et ceux de Ito et coll. ont montré que lors de la stimulation par l'Il-3 de lignées myéloïdes murines, la phosphorylation de Bcl-2 sur le résidu sérine 70 (Ser70) est associée à un signal de survie. Cette phosphorylation n'altère pas la possibilité pour Bcl-2 d'interagir avec Bax et est nécessaire à sa fonction anti-apoptotique (May et coll., 1994 ; Ito et coll., 1997). De plus, des expériences utilisant la bryostatine (agoniste de la PKC) montrent que la phosphorylation de Bcl-2 sur la Ser70 est associée à la survie des cellules alors qu'au contraire les taxanes ou autres agents anti-mitotiques provoquent la phosphorylation de Bcl-2 (sur les résidus Ser70, Ser87 et Thr69) en corrélation avec une induction d'apoptose. L'ensemble de ces résultats indique que le traitement par une drogue conduit soit à une forme hyperphosphorylée de Bcl-2 associée à l'apoptose, soit à une forme, où un seul site de Bcl-2 est phosphorylé (Ser70), associée à la survie (Ruvolo et coll., 2001). Il a été proposé que la boucle flexible contenue dans la structure de Bcl-2 régule négativement la fonction anti-apoptotique de Bcl-2. Sa délétion s'accompagne d'une augmentation de la survie cellulaire. Si le mécanisme reste mal compris, il semble pourtant que la Ser70 de Bcl-2 soit contenue dans cette boucle et sa phosphorylation entraînerait un changement conformationnel de Bcl-2, modifiant ainsi son affinité pour certains partenaires (Chang et coll., 1997).

Dans le cas de Bad, la phosphorylation sur différents résidus sérine inhibe totalement sa fonction pro-apoptotique et influence sa localisation intracellulaire. Différents travaux ont permis d'identifier 4 sites de phosphorylation de Bad (modèle murin) : Ser112, Ser136, Ser155, et Ser170. Zha et coll. ont montré que la stimulation de cellules souches lymphoïdes par l'Il-3 provoquait la phosphorylation de Bad sur les résidus Ser112 et Ser136. Il est généralement admis que Bad phosphorylé est alors séquestré dans le cytosol sous forme d'un complexe avec la protéine chaperonne 14-3-3, ce qui l'empêcherait de se dimériser avec Bcl-2 ou Bcl-x_L et contribuerait à l'inhibition de sa fonction. Bien que ce modèle soit référencé dans la plupart des articles, il n'est sans doute pas généralisable dans la mesure où la mise en évidence de l'interaction Bad/14-3-3 est souvent issue d'expériences de surexpression de l'une ou des deux protéines (Zha et coll., 1996 ; Datta et coll., 2000 ; Masters et coll., 2001). Ces surexpressions ont pu favoriser des interactions qui, dans des conditions d'expression physiologique, ne se seraient pas exprimées. Ainsi, cela peut expliquer que dans certains modèles biologiques, comme des lignées T cytokines-dépendantes (Il-2, Il-4), Bad phosphorylé n'est pas retrouvé associé à la 14-3-3 (Ayllon et coll., 2001 ; Ayllon et coll., 2002). D'autres travaux ont permis de mettre en évidence un autre site de phosphorylation, sur le résidu Ser155 ; les auteurs ont cherché à comprendre quel rôle pouvait avoir ce nouveau site de phosphorylation. Tan et coll. ont montré que la phosphorylation sur Ser155 ne conduit pas à la liaison de Bad à la 14-3-3 mais bloque la dimérisation Bad/Bcl-x_L (Tan et coll., 2000). Ces travaux sont complémentaires de ceux de Datta et coll. qui démontrent, par des expériences de mutations (sérines remplacées par des alanines), que la Ser155 n'est pas impliquée dans le motif de liaison à la 14-3-3 (Datta et coll., 2000). En fait, la phosphorylation de Bad sur ces différents résidus Ser a des conséquences mécanistiques. La phosphorylation sur la Ser155 prévient directement l'hétérodimérisation de Bad avec Bcl-x_L en diminuant l'affinité du domaine BH3 de Bad pour Bcl-x_L, tandis que les phosphorylations sur les Ser112 et Ser136 localisées en dehors du domaine BH3 ne peuvent inhiber que de façon indirecte la dimérisation avec Bcl-x_L (Figure 19). La phosphorylation sur la Ser170 bloquerait l'activité pro-apoptotique de Bad mais n'aurait pas d'implication dans l'interaction Bad/Bcl-x_L (Dramsi et coll., 2002).

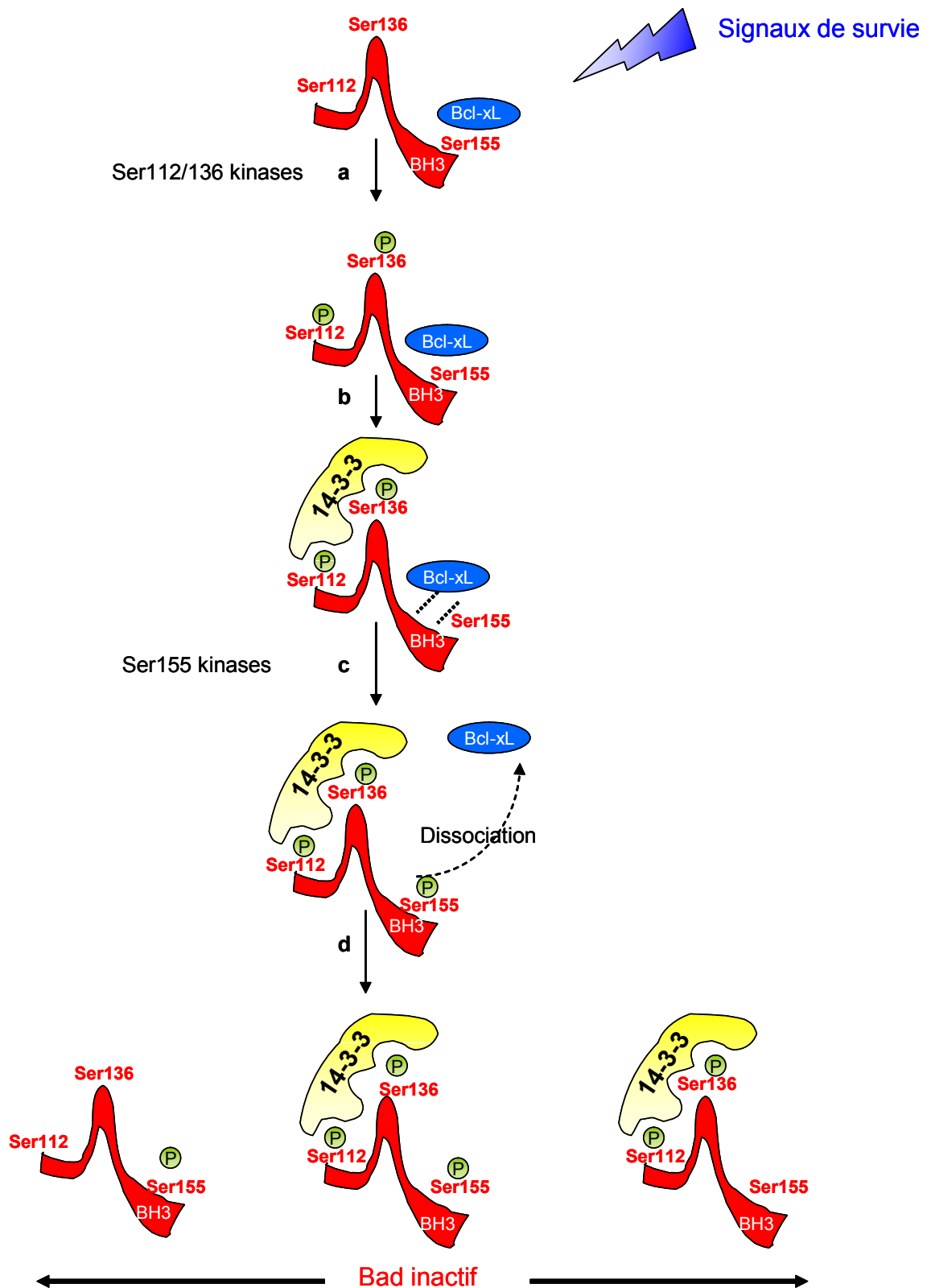


Figure 19 : Modèle schématique de l'inactivation de Bad

(Adapté de Datta et coll., 2000 et Rosenquist., 2003).

a- Des signaux de survie activent les Ser112/136 kinases : phosphorylation de Bad sur les Ser112 et Ser136. b- La 14-3-3 peut alors se lier au phospho-Bad (P-Ser136 et P-Ser112) ; à ce stade, la liaison à la 14-3-3 diminue l'interaction Bad/Bcl-xL et favorise l'accès des Ser155 kinases. c- Phosphorylation de Bad sur la Ser155 : Bad et Bcl-xL se dissocient et Bad est inactivé. d- Formes inactives de Bad.

Si la plupart des auteurs s'accordent sur le rôle négatif de la phosphorylation de Bad, des résultats récents sur l'apoptose neuronale induite par la protéine kinase cdc2 mettent en évidence, de façon inattendue, que la phosphorylation sur la Ser128 n'est pas associée à un signal de survie, mais de mort. En effet, cette phosphorylation, en empêchant l'interaction entre la protéine 14-3-3 et Bad, favoriserait l'activité pro-apoptotique de Bad. De plus, il a été montré, dans des cultures primaires de neurones (issus de cerveaux de rat), que la kinase JNK peut phosphoryler Bad sur la Ser128. Cette phosphorylation favoriserait également l'effet pro-apoptotique de Bad, en antagonisant la capacité des facteurs de croissance à inhiber l'apoptose induite par Bad (Donovan et coll., 2002 ; Konishi et coll., 2002).

D'autres travaux récents ont permis d'identifier pour la première fois les rafts comme compartiment de séquestration de Bad (pour revue, Garcia (a) et coll., 2003). Ayllon et coll. montrent par microscopie confocale et fractionnement subcellulaire, sur des lignées T dépendantes aux interleukines -2, -4 et -9, que Bad est attaché aux rafts dans les cellules stimulées alors qu'il est transloqué à la mitochondrie après déprivation cytokinique, en corrélation avec l'induction d'apoptose (Ayllon et coll., 2002).

En conclusion, Bad est présent sous différentes formes dans la cellule, déterminant sa localisation et son action physiologique. La balance de ces différentes formes ajoutée à la balance générale entre acteurs pro et anti-apoptotiques contribue au devenir de la cellule (apoptose ou survie). Sous sa forme inactive, Bad serait soit séquestré dans le cytosol, phosphorylé et lié à la 14-3-3, soit ancré aux rafts et non phosphorylé. Sous sa forme active, Bad ne serait pas phosphorylé, il est alors retrouvé préférentiellement à la mitochondrie où il peut former des hétérodimères avec Bcl-2 ou Bcl-x_L et bloquer ainsi leurs activités anti-apoptotiques.

I.2- Les kinases et les phosphatases impliquées dans les phosphorylations /déphosphorylations de Bad et Bcl-2

Bcl-2 peut être phosphorylé par différentes kinases impliquées dans de nombreuses voies de signalisation connues. La protéine kinase C α est considérée comme la plus importante. Le traitement à la bryostatine de cellules REH provoque la translocation de la PKC α à la mitochondrie et favorise ainsi la phosphorylation de Bcl-2 (Ser70), qui est à proximité (Ruvolo et coll., 1998). Les kinases Erk1/2 sont impliquées dans la phosphorylation de Bcl-2 spécifiquement sur les résidus Thr69 et Ser87. De plus, d'autres études utilisant des céramides ont révélé une corrélation entre la déphosphorylation de Bcl-2 et l'activation de la PP2A, mettant à jour son rôle de phosphatase majeure de Bcl-2 (Deng et coll., 1998 ; Ruvolo et coll., 1999).

Concernant Bad, 4 kinases majeures ont été identifiées comme responsables de la phosphorylation : Akt/PKB, PKA, Rsk et PKC (Datta et coll., 1997 ; Datta et coll., 2000 ; Zhou et coll., 2000). La kinase Akt/PKB est impliquée dans la phosphorylation sur la Ser136, et les kinases PKC, PKA et Rsk sont responsables de la phosphorylation de Bad sur les Ser112 et Ser155. Trois phosphatases sont impliquées dans la déphosphorylation de Bad : PP1, PP2A et PP2B (Wang et coll., 1999 ; Ayllon et coll., 2000 ; Chiang et coll., 2001) (Figure 20).

L'importance des événements de phosphorylation/déphosphorylation dans les voies de signalisation intracellulaires est reconnue depuis longtemps à travers les études très nombreuses des kinases. Des travaux récents ont souligné le rôle également important des phosphatases dans la transduction du signal de nombreux processus physiologiques, incluant l'apoptose. Les protéines phosphatases sont divisées en 3 familles : les phospho-protéines phosphatases (PPP), les protéines phosphatases magnésium-dépendantes (PPM) et les protéines tyrosines phosphatases (PTP). Les PPP et PPM incluent les phospho-sérine et phospho-thréonine phosphatases, tandis que les PTP regroupent les phosphatases qui peuvent déphosphoryler sur 3 résidus : tyrosine, sérine, et thréonine (Wera et Hemmings., 1995 ; Tonks et Neel., 1996 ; Keyse., 2000).

mBad	Ser 112	Ser 136	Ser 155	Ser 170	Ser 128
Kinases	Rsk - PKA - PKC	Akt - PKA	Rsk - PKA	?	?
Phosphatases	PP1, PP2A et PP2B	PP1 et PP2B	PP2B ?	?	?
Liaison à la 14-3-3	oui	oui	non	?	?
Dissociation de Bcl-xL	non	non	oui	non	?
Conséquence de la phosphorylation	survie	survie	survie	survie	apoptose

Figure 20 : Résumé des différents sites de phosphorylation identifiés à partir de la protéine Bad murine (mBad) (Adapté de Klumpp et Krieglstein., 2002).

La famille des PPP est la plus importante des trois familles. Les protéines phosphatases les plus représentées dans cette famille sont PP1, PP2A et PP2B. A l'inverse de PP2B, les phosphatases de Type 1 et 2A sont spécifiquement inhibées par des toxines naturelles, comme l'acide okadaïque (Dounay et Forsyth., 2002). *In vivo*, l'association des sous-unités catalytiques de PP1 (PP1c) ou de PP2A (PP2Ac), avec différentes sous-unités régulatrices, conduit à la formation d'une famille de protéines appelées holoenzymes, d'expression ubiquiste. PP1c peut former des complexes avec plus de 60 sous-unités régulatrices (pour revue Garcia (b) et coll., 2003). Le génome eucaryote contient entre 1 et 8 gènes codant les différentes isoformes de PP1c. Les 4 isoformes mammifères identifiées ont été désignées PP1 α , PP1 β , PP1 γ_1 et PP1 γ_2 . Ces isoformes de PP1c ont des localisations sub-cellulaires différentes. La structure de base de PP2A est dimérique comprenant une sous-unité catalytique de 36 kDa (PP2Ac) et une sous-unité structurale de 65 kDa appelée A. Une troisième sous-unité régulatrice B peut s'associer avec la structure de base de l'enzyme. Ces sous-unités régulatrices sont codées par 3 familles de gènes : B/PR55, B'/PR61 et B''/PR72 (Janssens et Goris., 2001).

Ayllon et coll. ont montré sur des lignées T murines dépendantes d'Il2, d'Il-4 ou Il-9, que la déprivation cytokinique aboutissait à l'activation de PP1 α (via Ras). Cette activation s'accompagne de la déphosphorylation de Bad sur les Ser112 et Ser136 en corrélation avec le signal d'apoptose (Ayllon et coll., 2000). Ces résultats suggèrent que Bad est un nouveau substrat de PP1 α . De plus, par différentes approches expérimentales (double hybride dans le système levure, co-immunoprécipitation), cette même équipe a montré que PP1 α interagit également avec Bcl-2 (Ayllon et coll., 2001), suggérant un rôle nouveau de sous-unité régulatrice de PP1 α pour Bcl-2. Cette interaction a été précisée dans un premier temps par des études structurales (cristallographie aux rayons X), mettant en évidence que PP1 α interagit avec des protéines contenant un motif consensus : [RK]-x(0.1)-V-x-F (Egloff et coll., 1997). Par la suite, des expériences biochimiques (synthèse de peptides et études d'interactions protéiques par compétition) ont permis de caractériser un autre motif : F-x-x-[RK]-x-[RK] (Ayllon et coll., 2001). Le premier motif est d'ailleurs présent dans le domaine BH1 des protéines de la famille Bcl-2 et il est nécessaire à l'association et au ciblage de PP1 α sur Bad. Le deuxième motif est retrouvé dans le domaine BH3 de Bad et dans les domaines BH1 et BH3 de Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w (Ayllon et coll., 2002 ; Garcia et coll., 2003).

Ainsi, selon le modèle proposé par le groupe de Garcia et coll., les protéines PP1 α et Bcl-2 formeraient une holoenzyme avec une activité phosphatase, appelée « Bad phosphatase » (Garcia et coll., 2003). Dans ce complexe, Bcl-2 agirait comme sous-unité régulatrice de PP1 α , contrôlant directement ou indirectement son activité enzymatique et provoquant la formation du complexe trimérique Bad/PP1 α /Bcl-2, en amenant Bad à PP1 α (Figure 21). De plus, plusieurs travaux indiquent que la phosphatase PP2A peut réguler Bcl-2. En effet, Deng et coll. ont montré que la phosphorylation de Bcl-2 sur la Ser70 est requise pour l'interaction entre Bcl-2 et PP2A, qui peut ensuite la déphosphoryler (Deng et coll., 1998). Ainsi, dans le modèle de la « Bad phosphatase », PP2A se révélerait une enzyme clé dans le contrôle positif du complexe, via son interaction avec Bcl-2 et/ou PP1.

II- Mécanisme de l'apoptose induite par le BCR : implication du statut de phosphorylation de Bad ?

L'engagement du BCR induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans les lymphocytes B immatures, indépendamment de la voie de signalisation du récepteur de mort Fas/CD95 (Berard et coll., 1999). Les mécanismes initiateurs et régulateurs de cette apoptose via le BCR restent encore largement inconnus ; cependant, le rôle clef de la mitochondrie dans le processus de mort a orienté rapidement les recherches vers l'implication de cet organelle. En effet, l'implication d'évènements mitochondriaux a été aussi suggérée par le rôle protecteur de la surexpression de protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-x_L) (Merino et coll., 1995). Ainsi, le pontage du BCR par un anti-IgM dans les cellules B immatures (lignée cellulaire WEHI-231) est associé à une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$), indépendant d'une activation de caspases initiateurs connues (Doi et coll., 1999).

Katz et coll., ont apporté une première explication pour relier le BCR à la mitochondrie. En effet, lors du pontage du BCR dans les cellules WEHI-231, ces auteurs ont observé une régulation positive de l'expression cytosolique de la phospholipase A2. Cette expression est associée à une induction de sa fonction mitochondriale et à la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, consécutif à la formation d'acides arachidoniques et à la perte d'ATP. Tous ces évènements sont indépendants de l'activation de caspases car le signal apoptotique n'induit pas l'activation de la caspase 3 et la dissipation du $\Delta\psi_m$ a lieu même en présence d'inhibiteurs de caspases. De plus, tous ces signaux peuvent être prévenus par co-stimulation avec le CD40 ou par action de stabilisateurs du $\Delta\psi_m$ comme l'antimycine ou

l'oligomycine. Par ailleurs, ce même signal induit par le BCR provoque l'activation de la cathepsine B et peut être bloqué par un inhibiteur de la cathepsine, suggérant un rôle important de cette protéase dans la phase mitochondriale exécutive de l'apoptose induite par le BCR dans les cellules WEHI-231 (Katz et coll., 2001). Ces résultats sont à l'inverse d'autres études montrant que l'apoptose de cellules B humaines issues des centres germinatifs met en jeu à la fois l'activation de caspases et de cathepsines ; la caspase 3 provoque l'activation de la cathepsine et est responsable de son action d'exonucléase, provoquant au final la mort cellulaire (Van Eijk et de Groot., 1999).

Ainsi, bien que toutes ces études suggèrent que la mitochondrie puisse être le lien entre la cascade de signalisation du BCR et la machinerie apoptotique, il n'est pas encore clairement établi comment la mitochondrie est altérée. Dans ce contexte, il nous a alors paru intéressant d'analyser le rôle et l'implication des protéines de la famille Bcl-2.

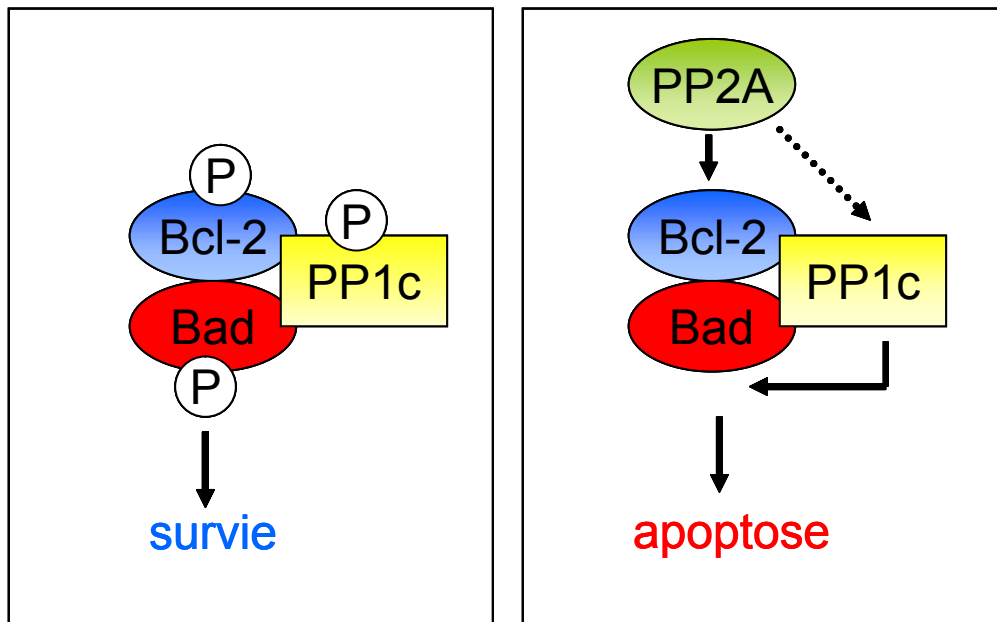


Figure 21 : Modèle hypothétique du fonctionnement de la « Bad phosphatase »

(Adapté de Garcia et coll., 2003).

L'holoenzyme Bcl-2/PP1 α pourrait former un complexe tri-moléculaire avec Bad. Dans le cas par exemple de la déprivation cytokinique associée à un signal de mort, l'activité phosphatase de PP1 α augmenterait menant à la déphosphorylation de Bad. PP2A participerait fortement à ce signal puisque l'interaction PP2A/Bcl-2 modulerait positivement l'activité phosphatase de Bcl-2/PP1 α et favoriserait l'activation de la « Bad phosphatase ».

Nous avons vu dans la Partie 2 que l'activation différentielle des voies PI3K/Akt, PKC et Erk1/2 dans les cellules B matures et immatures, pouvait définir une base moléculaire expliquant la dualité de signalisation du BCR. En effet, une baisse d'activation de ces kinases a été corrélée à l'apoptose des lymphocytes B immatures ; la régulation négative de la voie PI3K/Akt observée suite au pontage du BCR est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose des cellules B immatures. De façon similaire, le blocage de l'activité de la voie PI3K, par des inhibiteurs spécifiques, induit l'arrêt du cycle cellulaire suivi d'un signal d'apoptose, reproduisant les effets de l'anti-IgM (utilisé pour « ponter » le BCR) (Banerji et coll., 2001 ; Carey et Scott., 2001). Or, toutes ces kinases PI3K/Akt, Erk1/2, PKC sont des kinases également impliquées dans la phosphorylation de la protéine Bad. Ainsi, la régulation de la phosphorylation des protéines de la famille Bcl-2 comme Bad pourrait constituer un lien entre la signalisation du BCR, et la phase mitochondriale initiatrice du processus apoptotique, notamment dans le cas des cellules B immatures. Par ailleurs, si l'implication de modifications d'expression des protéines de la famille Bcl-2 a été montrée à partir de lignées cellulaires murines, aucune étude, au démarrage de cette thèse, ne mentionnait le rôle éventuel de Bad, ni la possible régulation de sa phosphorylation en corrélation avec le devenir (survie/apoptose) du lymphocyte B.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc souhaité apporter une contribution à la compréhension des acteurs moléculaires reliant la signalisation du BCR aux événements mitochondriaux de l'apoptose, dans les lymphocytes B immatures. Nous avons choisi comme modèle biologique la lignée B immature murine, WEHI-231, classiquement utilisée pour étudier, *in vitro*, le processus de sélection négative des lymphocytes B. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés aux mécanismes régulateurs de la fonction pro-apoptotique de Bad (phosphorylation/déphosphorylation, trafic, compartiments de séquestration) pouvant établir une connexion entre la signalisation du BCR en amont et la phase mitochondriale initiatrice de mort en aval. Notre hypothèse de travail a fait l'objet d'une revue publiée (Voir Annexe 1).

RESULTATS

Partie 1 : Etat de phosphorylation de Bad et apoptose induite par le BCR dans la lignée murine B immature WEHI-231

L'objectif de ce premier travail était de suivre et de corréler l'état de phosphorylation de la protéine pro-apoptique Bad à l'apoptose induite par le BCR, en utilisant comme modèle la lignée murine B immature WEHI-231 (IgM^{high}, IgD^{low}). L'apoptose a été induite par le pontage du BCR par des anti-IgM. L'analyse de l'apoptose a été réalisée par cytométrie en flux en suivant, au cours du temps, la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) et la translocation des phosphatidylsérines. L'analyse de l'expression de Bad et de ses formes phosphorylées a été réalisée par immunoprécipitation et Western Blot.

De plus, comme des kinases cellulaires (ex : voie de la PI3K/Akt) sont impliquées à la fois dans la signalisation du BCR et dans la phosphorylation de Bad sur différents résidus sérines, il était intéressant de rechercher si le blocage pharmacologique de certaines de ces voies reproduisait l'apoptose des lymphocytes, en corrélation à une baisse de la phosphorylation de Bad. Nous avons ainsi montré, dans les cultures WEHI-231 contrôles, l'expression constitutive de Bad phosphorylé sur 3 résidus sérines : Ser136, Ser155 et Ser112. L'engagement des cellules B vers l'apoptose est corrélé à une déphosphorylation de Bad sur ces 3 sites. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (LY294002 et H89) de kinases impliquées dans la phosphorylation de Bad (PI3K et PKA respectivement) bloque ou réduit la phosphorylation de Bad sur les 3 sérines et agit en synergie avec l'anti-IgM pour mimer et/ou augmenter l'apoptose induite par le pontage du BCR.

L'article 1 (publié) décrit la méthodologie, les résultats et discussions de cette étude. Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une présentation (poster) lors du congrès « FEBS 2003 : meeting on signal transduction » (Bruxelles), en juillet 2003 (voir Annexe 3).

En amont de ce travail, nous avons finalisé, suite à nos résultats préliminaires de DEA, le protocole d'induction de l'apoptose des cellules WEHI-231. Nous avons choisi de synchroniser les cellules en culture dans le but d'homogénéiser davantage la « vague

apoptotique » induite lors du pontage du BCR ; et par la même, « d'optimiser » l'analyse biochimique faite en aval sur les lysats cellulaires totaux.

Enfin, parallèlement aux résultats de l'article 1, une étude plus approfondie de l'évolution du potentiel mitochondrial a été entreprise. L'objectif de ce travail était de préciser l'origine de l'effondrement de ce potentiel observé au cours de la réponse apoptotique induite par la signalisation du BCR.

I- Mise en place d'un modèle de synchronisation des cellules WEHI-231 en culture pour l'étude de la réponse apoptotique induite par le BCR

Des études préliminaires ont été réalisées sur des cellules WEHI-231 en phase exponentielle de croissance, obtenues après une pré-culture de 48h à 10^5 cellules/ml. Dans ces conditions, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, après pontage du BCR (anti-IgM : 10 µg/ml), sont observés à partir de 24h de stimulation. Ces résultats sont conformes à ceux déjà publiés sur la cinétique d'apparition de l'apoptose induite par le BCR dans cette lignée (Doi et coll., 1999 ; Banerji et coll., 2001 ; Gauld et coll., 2002). Cependant, même après 24 h d'induction, une faible proportion de cellules en apoptose est détectée (~10 à 15 %). De plus, l'analyse de la distribution des cellules dans le cycle cellulaire nous a montré qu'avant la stimulation, les cellules étaient désynchronisées. Ainsi, dans le but d'améliorer nos conditions d'induction de l'apoptose (notamment augmenter le nombre de cellules entrant en apoptose), nous avons choisi de mettre en place un modèle de synchronisation des cellules WEHI-231 (par enrichissement de cellules dans une phase du cycle), sans utiliser de traitement chimique.

Différentes méthodes de synchronisation sont connues comme l'utilisation d'agents pharmacologiques (mimosine, thymidine, nocodazole qui bloquent respectivement les cellules en phase G1, S et M), la déprivation en sérum, l'inhibition de contact ou l'élutration par centrifugation (Davis et coll., 2001). Dans notre cas, nous provoquons la synchronisation des cellules et leur blocage dans la phase G0/G1 du cycle, en favorisant très lentement l'épuisement du milieu de culture.

Les résultats de cette étude ont été présentés sous forme d'un poster à l'occasion du 8^{ème} congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie (Bordeaux), en octobre 2002 (voir Annexe 2).

I.1-Protocole expérimental

Les cellules WEHI-231 ont été maintenues en culture à différentes concentrations cellulaires (2.10^4 , 4.10^4 et 8.10^4 cellules/ml). L'étude du cycle cellulaire a été réalisée par le marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (IP, intercalant des acides nucléiques) de 24h à 144h afin de sélectionner les conditions de culture permettant une synchronisation maximale des cellules tout en préservant leur viabilité.

10^6 cellules en culture sont récoltées et lavées 2 fois (1200 rpm, 10 minutes) dans du PBS froid. Les culots cellulaires sont ensuite repris dans 300 μ l de PBS et fixés avec 700 μ l d'éthanol. Les cellules sont conservées à -20°C jusqu'à l'analyse. Le jour de l'analyse, les cellules sont lavées 2 fois (1200 rpm, 10 minutes) dans du PBS froid puis incubées avec 60 μ l de RNase (10mg/ml) dans 1 ml de PBS, pendant 20 minutes à température ambiante. Le traitement des cellules par la RNase assure l'élimination des molécules d'ARN avec lesquelles l'iodure de propidium interagit, afin que la fluorescence émise soit directement proportionnelle à la quantité d'ADN. On place ensuite les suspensions à 4°C de façon à stopper la réaction enzymatique. 50 μ L d'IP (SM : 1mg/ml) sont ajoutés juste avant l'analyse au cytomètre. L'iodure de propidium est excité par la raie à 488 nm du laser Argon et la fluorescence orange-rouge émise est collectée à l'aide d'un filtre « passe-haut » de 600 nm. La cytométrie en flux permet une mesure relative du contenu individuel en ADN des cellules et de leur distribution dans les différentes phases du cycle. La répartition des cellules dans les phases G₀/G₁, S et G₂/M est estimée après une analyse mathématique des histogrammes de fluorescence par un algorithme spécifique (Cell fit™) du cytomètre FACS Vantage (Beckton Dickinson, USA).

I.2- Résultats/Discussion

I.2.1- Choix des conditions de pré-culture

La condition 8.10^4 cellules/ml à 120h a été retenue ; en effet, dans ce cas, après 5 jours de culture, $80\% \pm 10$ des cellules (moyenne de 3 essais) sont synchronisées en phase G₀/G₁ et celles-ci, une fois remises en milieu frais, passent à nouveau ensemble toutes les phases du cycle (voir Annexe 2). La figure 22 correspond aux analyses mathématiques des cycles cellulaires obtenus après une pré-culture de 48h à la concentration cellulaire de 10^5 cellules/ml (Figure 22-A) et une pré-culture de 120h à la concentration cellulaire de 8.10^4 cellules/ml (Figure 22-B). Le tableau 1 montre la répartition des cellules dans les phases du cycle dans les 2 conditions de pré-culture.

I.2.2- Comparaison modèle synchronisé et non synchronisé

L'apoptose induite par le BCR a été étudiée dans le cas des cellules non synchronisées et synchronisées, enrichies dans la phase G0/G1. La quantification de l'apoptose a été réalisée : (i) par l'étude de la translocation des phosphatidylsérines membranaires à l'aide du double marquage à l'Annexine-V-FITC/IP et (ii) par la mesure du potentiel membranaire mitochondrial à l'aide de la sonde DiOC₆(3) selon les protocoles décrits dans l'Article 1.

Nous avons ainsi remarqué que, suite à la synchronisation des cellules, l'apoptose était détectée plus tôt dans la cinétique pour une dose d'anti-IgM 10 fois plus faible (1 µg/ml contre 10 µg/ml). Ainsi, comme le montre la figure 23 (A) et (B), le pourcentage de cellules en apoptose précoce (cellules Annexine⁺/IP⁻) après 8 heures de stimulation dans le cas des cellules synchronisées est équivalent à celui obtenu après 48h dans le cas des cellules non synchronisées. Ces résultats ont aussi été confirmés par l'analyse du potentiel membranaire mitochondrial (voir Annexe 2). Cette méthode de synchronisation nous a donc permis d'améliorer la réponse apoptotique, sans utiliser de traitement chimique qui présente souvent des effets toxiques pour les cellules.

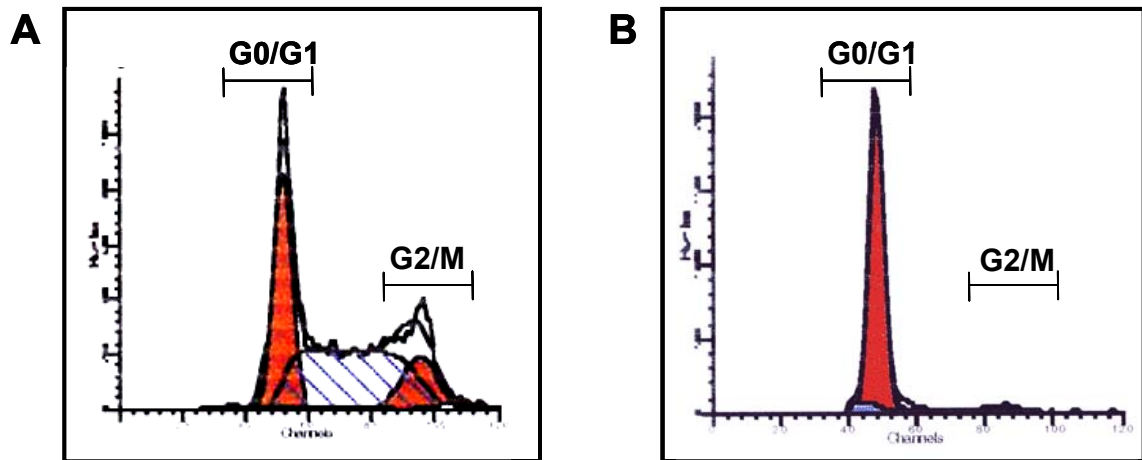


Figure 22 : Analyse mathématique des cycles cellulaires correspondants aux 2 conditions de pré-culture testées pour les cellules WEHI-231.

L'aire (zone hachurée) comprise entre les pics G0/G1 et G2/M correspond aux cellules en phase S.

A- Pré-culture de 48h de cellules WEHI-231 à la concentration cellulaire de 10^5 cellules/ml.

B- Pré-culture de 120h de cellules WEHI-231 à la concentration cellulaire de 8.10^4 cellules/ml.

	G0/G1	S	G2/M
A	32.5 % ± 2.5	50 % ± 2	17 % ± 5
B	80 % ± 10	10.3 % ± 6.1	9.3 % ± 4

Tableau 1 : Répartition du nombre de cellules dans chaque phase du cycle pour les 2 conditions de pré-culture testées pour les cellules WEHI-231.

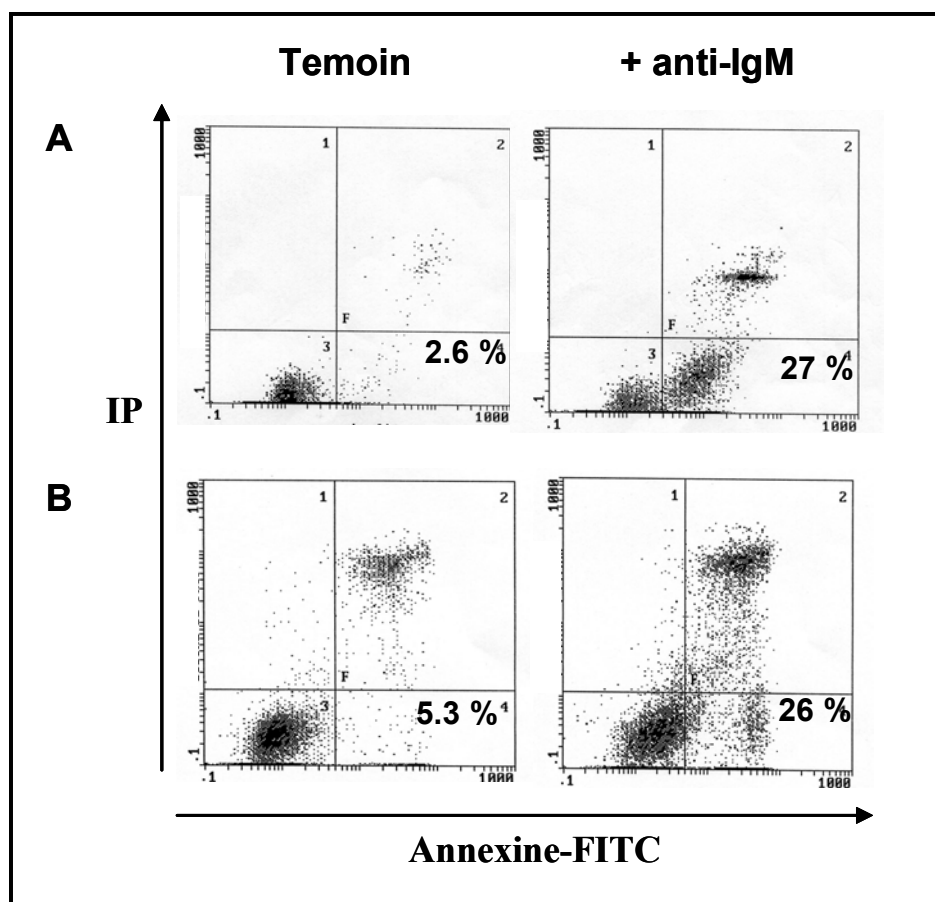


Figure 23 : Analyse, par le double marquage Annexine-V-FITC/IP, de l'apoptose suite au pontage du BCR, dans les cellules WEHI-231.

- A- dans les cellules WEHI-231 non synchronisées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-IgM à 48h de culture ;
- B- dans les cellules WEHI-231 synchronisées avec 1 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-IgM à 8h de culture.

II- ARTICLE 1

Changes in Bad phosphorylation are correlated with BCR-induced apoptosis of WEHI-231 immature B cells.

Emilie Malissein, Mireille Verdier, Marie-Hélène Ratinaud et Danielle Troutaud.

Biochimie 85 (2003) 85 : 733-740.

III- Etude de la baisse du potentiel membranaire mitochondrial au cours de l'apoptose induite par la signalisation du BCR dans les cellules WEHI-231.

La mesure précise du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) est essentielle pour évaluer son rôle dans le processus apoptotique. Cette approche a été facilitée par le développement de sondes cationiques fluorescentes (ex : Rhodamine-123, DiOC₆(3)) dont l'incorporation dans la mitochondrie est potentiel dépendant. Cependant, les résultats obtenus par l'utilisation de ces sondes doivent être interprétés avec précaution.

En effet, la baisse du $\Delta\Psi_m$ observée est parfois due à une sensibilisation de la mitochondrie causée par la toxicité de la sonde (concentrations trop fortes). Par exemple, il est connu que pour des concentrations de l'ordre du micromolaire, la pénétration de la DiOC₆(3) ou de la Rhodamine-123 dans les cellules est toxique. La sonde DiOC₆(3) peut altérer à forte concentration la conductivité membranaire et inhiber le métabolisme énergétique de la cellule, et par conséquent, perturber directement le $\Delta\Psi_m$. De plus, dans ces conditions, l'incorporation de ces sondes s'est avérée corrélée aux changements à la fois du potentiel membranaire mitochondrial et du potentiel membranaire plasmique. Par ailleurs, la mesure par cytométrie en flux de l'intensité de fluorescence de la DiOC₆(3) serait aussi dépendante de la taille des cellules, leur viabilité et la présence de débris cellulaires ou corps apoptotiques (Shapiro., 1994 ; Rottenberg et Wu., 1998 ; pour revue, voir Ly et coll., 2003). Par conséquent tous ces effets peuvent être la source d'interprétations erronées de la baisse du potentiel.

Pour étudier les changements du $\Delta\Psi_m$ dans notre modèle biologique, nous avons utilisé la sonde DiOC₆(3), mais à la dose de 2 nM et en combinaison avec l'iodure de propidium afin de pouvoir éliminer de l'analyse les cellules en apoptose tardive et en nécrose (IP⁺). En effet, il a été démontré qu'à ces faibles concentrations, la fluorescence des cellules était corrélée de façon quasi spécifique avec l'amplitude du potentiel membranaire mitochondrial (Rottenberg et Wu., 1998). Ceci a pu être vérifié notamment par l'utilisation d'agents découplants du potentiel comme le FCCP (carbonyl cyanide p-(tri-fluoromethoxy) phenylhydrazone) qui dépoliarise la mitochondrie.

Cette technique nous a permis de mettre en évidence la baisse du $\Delta\Psi_m$ des cellules WEHI-231 associée aux évènements membranaires (translocation des PS) de l'apoptose induite par le pontage du BCR.

Afin d'aborder la compréhension des mécanismes responsables de cette altération mitochondriale dans les cellules B immatures, nous avons recherché si cette baisse reflétait l'activation du pore de transition de perméabilité membranaire mitochondriale (PTP). Cette étude a été réalisée en utilisant un inhibiteur spécifique du pore : la cyclosporine A (CsA, 5 μ M). En effet, la CsA provoque la fermeture du PTP en formant un complexe avec la Cyp-D qui se lie à l'ANT et le bloque en conformation fermée (voir Partie 1 ; paragraphe III-1 de l'introduction). Ainsi si l'ouverture du PTP est impliquée dans la chute du $\Delta\Psi_m$, et que le phénomène soit encore réversible (phase très précoce de l'apoptose), l'utilisation de la CsA doit pouvoir réverser le processus, et restaurer le potentiel mitochondrial de certaines cellules. Cette étude a donc été réalisée à l'occasion du marquage par la sonde DiOC₆(3) après pontage du BCR des cellules WEHI-231. Cependant, tous les essais réalisés (avec notamment plusieurs concentrations testées de CsA) ne nous ont jamais permis de mettre en évidence un effet de la CsA ; nous n'avons pas pu observer de restauration, même partielle, du potentiel mitochondrial.

Avant de conclure définitivement sur cette apparente insensibilité à la CsA de la phase mitochondriale de l'apoptose dans notre modèle biologique, nous avons souhaité la confirmer en utilisant une autre sonde pour suivre le $\Delta\Psi_m$: le fluorochrome 5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazol-carbocyanine iodide (JC1).

En effet, ces dernières années, un certain nombre de travaux ont abouti à proposer l'utilisation de cette autre sonde cationique fluorescente pour analyser de façon plus spécifique et plus précise la fonctionnalité mitochondriale au cours de l'apoptose (Salvioli et coll., 1997 ; Ly et coll., 2003 ; Zuliani et coll., 2003). Le JC-1 est incorporé de façon sélective dans la mitochondrie et se comporte comme un « potentiomètre ». Ainsi, en fonction du niveau du $\Delta\Psi_m$, cette sonde présente 2 formes : une forme agrégée dans les mitochondries présentant un haut potentiel (cellules saines) et une forme monomérique dans les mitochondries de bas potentiel (cellules en apoptose). L'intérêt de son utilisation réside dans le fait que les 2 formes sont détectables en cytométrie de flux et en microscopie à fluorescence : à 585 nm (fluorescence rouge des agrégats) et 530 nm (fluorescence verte des monomères) après excitation du fluorochrome à 488 nm.

En conséquence, la chute du $\Delta\Psi_m$ lors de la réponse apoptotique s'accompagnera de la dissipation des formes agrégées sous forme de monomères, et sera visualisée au niveau des cellules par un « shift » de la fluorescence rouge vers une fluorescence verte.

III.1- Protocole expérimental

Les cellules WEHI-231 induites ou non en apoptose suite au pontage du BCR par l'anti-IgM (1 µg/ml) sont récoltées après 48h de culture. Les suspensions cellulaires sont ajustées à une concentration cellulaire de 10^6 cellules/ml dans du RPMI 1640 avec 1% de SVF et marquées pendant 10 minutes à 37°C avec le JC-1 seul (5µg/ml) (Molecular Probes) puis pendant 10 minutes supplémentaires en présence ou non de la CsA (5µM) (Sigma).

L'analyse des cellules a été réalisée par microscopie confocale (Zeiss LSM 510 META) et par cytométrie en flux (FACS Vantage (Becton Dickinson, USA)).

III.2- Résultats/Discussion

Les images en contraste de phase de la figure 24 (A), obtenues par microscopie confocale, illustrent, en comparaison aux cellules WEHI-231 « témoin », l'apoptose dans les cellules après 48h de pontage du BCR. Ces images mettent en évidence la baisse de la taille des cellules et l'apparition de corps apoptotiques.

Les images de la figure 24 (B), obtenues par microscopie confocale, illustrent le marquage avec la sonde JC-1 dans les cultures témoin et induites au temps 48h. Ces images mettent en évidence un marquage mitochondrial (orange) dans les cellules saines où le $\Delta\Psi_m$ est haut et un marquage plus diffus (vert) dans les mitochondries des cellules en apoptose, de bas potentiel.

La figure 25 montre les résultats obtenus par l'analyse en cytométrie de flux. Les régions R2 et R3 des cytogrammes correspondent respectivement aux populations cellulaires saines de haut potentiel membranaire mitochondrial (fluorescence orange) et les populations cellulaires en apoptose de bas potentiel membranaire mitochondrial (fluorescence verte). Après 48h de traitement (anti-IgM 1 µg/ml), on observe 41% de cellules en apoptose contre 2% dans les cultures témoins (Tableau 2). Ces résultats ne changent pas en présence de CsA, qui ne produit aucun effet significatif sur la baisse du $\Delta\Psi_m$.

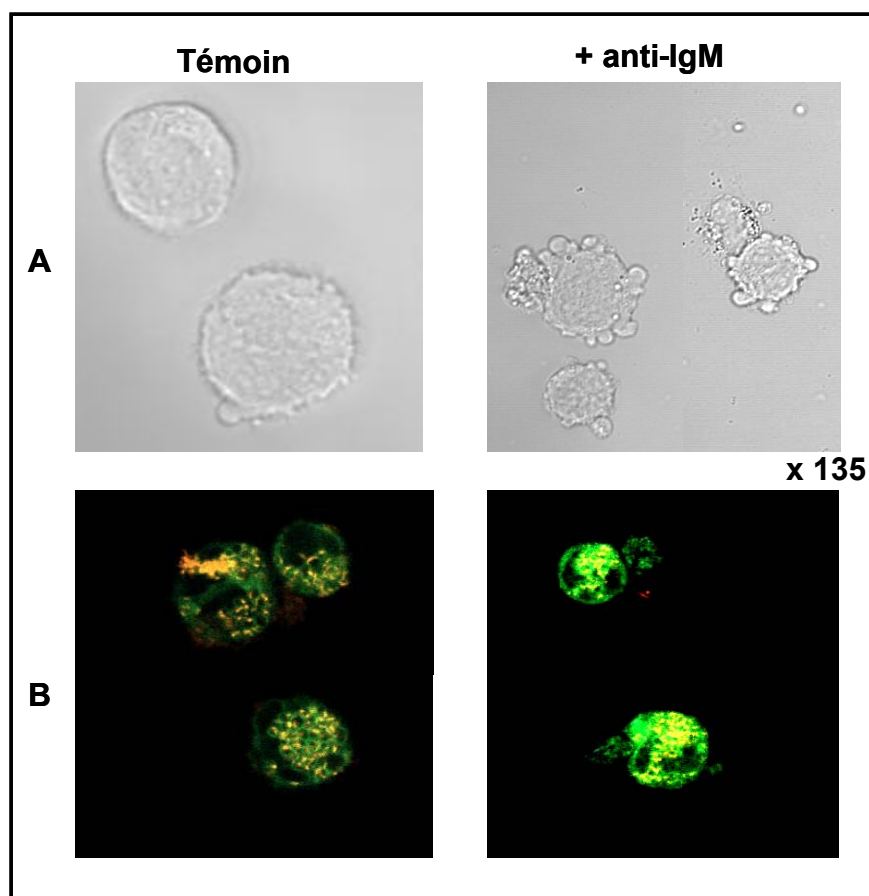


Figure 24 : Mise en évidence, par microscopie confocale, d'altérations liées à l'apoptose induite par leBCR.

A- Images (contraste de phase) de cellules WEHI-231 induites ou non avec 1 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-IgM pendant 48h de culture.

B- Images de marquage avec la sonde JC1 dans les cellules WEHI-231 induites ou non avec 1 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-IgM pendant 48h de culture.

Les images sont représentatives de 3 tests indépendants.

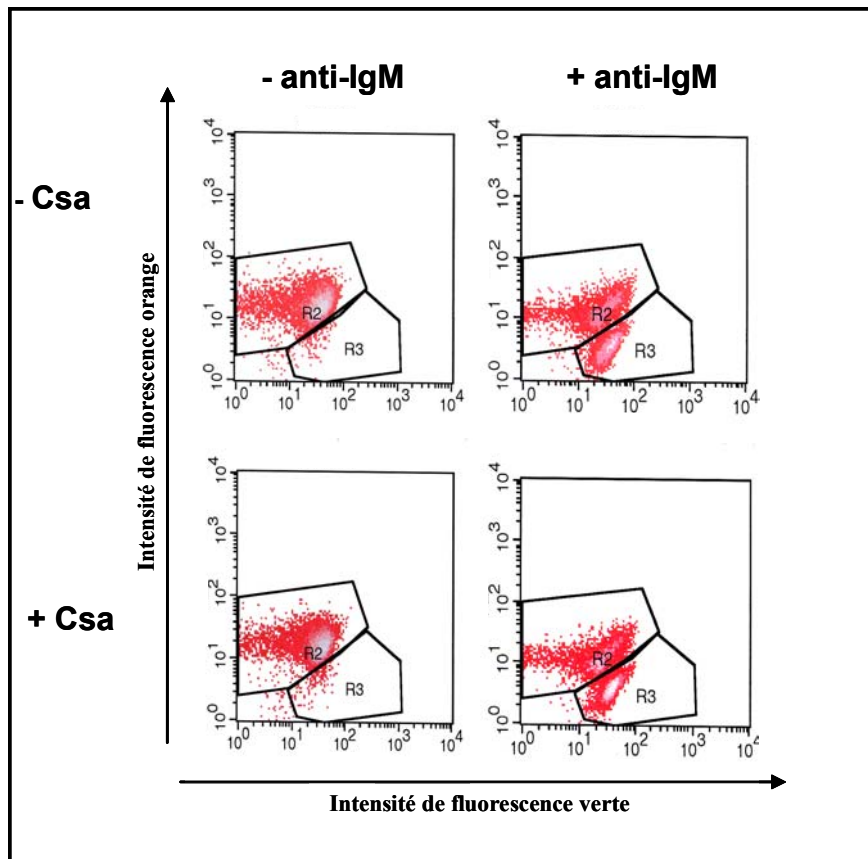


Figure 25 : Mesure de la baisse du potentiel membranaire mitochondrial par le marquage à la sonde JC1, lors de l'apoptose induite par le BCR chez les cellules WEHI-231 (48h).

R2 : population cellulaire saine, de haut potentiel. R3 : population cellulaire en apoptose, de bas potentiel. Les résultats sont représentatifs de 3 tests indépendants.

	R2	R3
- anti-IgM	98 %	2 %
(- Csa)	98.5 %	1.5 %
+ anti-IgM	59 %	41 %
(+ Csa)	59 %	41 %

Tableau 2 : Pourcentages de cellules WEHI-231 en apoptose (baisse du potentiel membranaire mitochondrial révélée par le marquage à la sonde JC1) après 48h de stimulation par des anti-IgM.

Les résultats sont représentatifs de 3 tests indépendants.

En conclusion, l'étude du $\Delta\Psi_m$ à l'aide de la sonde JC-1 confirme les résultats obtenus avec la DiOC₆(3). On observe :

- une chute du $\Delta\Psi_m$, suite au pontage du BCR, avec cependant une meilleure discrimination des cellules en apoptose au sein des cultures (grâce à la fluorescence distincte des 2 formes agrégées et monomériques du JC-1),
- l'insensibilité de cette phase mitochondriale à l'effet de la CsA.

IV- Conclusion

Nos résultats montrent collectivement que la déphosphorylation de la molécule pro-apoptotique Bad pourrait jouer un rôle décisif dans l'engagement des cellules B immatures vers l'apoptose, suite à l'activation du BCR. L'étude pharmacologique ciblant des kinases (PI3K/Akt, PKA) et phosphatases (PP1) impliquées dans les événements de phosphorylation / déphosphorylation de Bad semble accréditer la thèse d'une inhibition des kinases lors du pontage du BCR, plutôt que l'activation de phosphatases. Cependant l'approche concernant le rôle des phosphatases n'est que préliminaire et doit être confirmée (voir Résultats-Partie 2). Il reste clair qu'un déséquilibre fonctionnel entre kinases/phosphatases apparaît après engagement du BCR, favorisant le rôle des phosphatases de Bad et par-là même sa déphosphorylation et son effet pro-apoptotique.

Ainsi ces effecteurs enzymatiques, dont certains sont recrutés et impliqués dans la signalisation du BCR, pourraient constituer un lien entre les événements membranaires de cette voie et les altérations mitochondriales de l'apoptose, dans les lymphocytes B immatures. Par ailleurs, l'implication de Bad suggère la modulation d'autres régulateurs de la perméabilité mitochondriale (comme Bax, Bcl-2/Bcl-x_L ou Bid) plutôt qu'un effet direct sur le PTP. Ce dernier point pourrait expliquer, en partie, que la phase mitochondriale de la réponse apoptotique soit insensible à l'action de la cyclosporine A ; en effet, cette apparente insensibilité semble indiquer que l'ouverture du PTP ne serait pas impliquée dans la chute du $\Delta\Psi_m$ observée au cours de cette réponse.

Finalement la déphosphorylation de Bad doit contribuer à sa délocalisation à partir de compartiments cellulaires de séquestration. Bad pourrait alors être « transloqué » à la mitochondrie où il exercerait son rôle pro-apoptotique. Cette hypothèse nous a conduit à réaliser, dans un deuxième temps, une étude sur la localisation de Bad, ses partenaires moléculaires et son éventuel trafic intracellulaire, au cours de la réponse apoptotique des cellules WEHI-231.

Partie 2 : Trafic intracellulaire de Bad et apoptose induite par le BCR dans la lignée murine B immature WEHI-231

L'objectif de ce deuxième travail était d'étudier le trafic intracellulaire de Bad et son association avec différents partenaires dans les cellules WEHI-231, suite à la stimulation du BCR. Cette étude a été réalisée par microscopie confocale et Western Blot. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux interactions possibles de Bad avec la protéine 14-3-3 et avec des compartiments de séquestration comme les rafts ou les mitochondries. Nos résultats montrent que Bad interagit avec la protéine 14-3-3 dans les cellules WEHI-231 en croissance. Suite au pontage du BCR, on observe une dissociation du complexe Bad/14-3-3, corrélée à la translocation de Bad à la mitochondrie et au signal d'apoptose. De plus, comme l'activation de phosphatases pouvait être impliquée dans la déphosphorylation de Bad suite à l'engagement du BCR - résultat que nous avons précédemment mis en évidence (voir Article 1) – nous avons recherché dans notre modèle expérimental la réalité du concept de la « Bad phosphatase », décrit récemment (Ayllon et coll., 2002 ; Garcia et coll., 2003). Des expériences de co-immunoprécipitations réciproques montrent que PP1 α interagit avec Bcl-2 et Bad dans les cellules WEHI-231, la présence de Bcl-2 semblant décisive dans l'assemblage de ce complexe. Par ailleurs nous observons une dissociation de ce complexe tri-moléculaire au cours de la réponse apoptotique induite par l'engagement du BCR des cellules WEHI-231.

Enfin, des études préliminaires ont été initiées chez la souris afin de rechercher la signification physiologique des résultats obtenus sur la lignée WEHI-231, au cours du développement des lymphocytes B. Les premiers résultats montrent que la déphosphorylation de Bad (Ser155 et Ser136) est aussi observée dans les cultures primaires de lymphocytes B immatures lors de la stimulation du BCR, contrairement aux cultures primaires de cellules B matures. De plus, l'analyse en microscopie confocale de lymphocytes B fraîchement isolés révèle qu'une partie de Bad serait localisée dans les rafts des cellules B matures, cette co-localisation Bad/rafts n'étant pas retrouvée dans les lymphocytes B immatures, ni les cellules WEHI-231.

L'article 2 décrit la méthodologie, les résultats et discussions de cette étude. Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une présentation (poster) lors du 12^{ème} Congrès International d'Immunologie (Montréal), en juillet 2004 (voir Annexe 4). Ce travail a été complété par une étude plus approfondie de la translocation de Bad du cytosol à la mitochondrie lors de la stimulation du BCR.

I - ARTICLE 2

Subcellular redistribution of Bad : a dynamic process in BCR-induced apoptosis of immature B cells.

Emilie Malissein, Mireille Verdier, Marie-Hélène Ratinaud et Danielle Troutaud.

En préparation

II- Complément d'étude de la translocation cytosol/mitochondrie de la protéine Bad au cours de l'apoptose induite par le BCR dans les cellules WEHI-231

Les résultats obtenus par microscopie confocale, présentés dans l'Article 2, montrent une re-localisation de Bad à la mitochondrie pendant l'apoptose induite par le BCR dans les cellules WEHI-231. Ainsi, il nous a semblé important de les confirmer par une autre approche méthodologique nous permettant par ailleurs, ultérieurement, d'analyser le statut de phosphorylation de Bad en relation avec sa localisation cellulaire. Nous avons choisi de réaliser un fractionnement subcellulaire, afin de séparer les fractions cytosoliques et mitochondriales issues de lysats totaux de cellules WEHI-231 stimulées ou non par l'anti-IgM. Ce fractionnement a été entrepris après avoir vérifié l'induction d'apoptose par cytométrie en flux (marquage Annexine-V-FITC/IP). L'analyse de l'expression de Bad a été finalement réalisée par Western Blot sur chacune des fractions.

II.1- Protocole expérimental

Nous avons testé 2 protocoles de fractionnement subcellulaire. La première méthode utilisée (appelée ici protocole A) a été décrite par Bourgeron et coll., (Bourgeron et coll., 1992). Un tampon spécifique appelé Tampon A (EGTA 1 mM, MOPS 20 mM, BSA 1 mg/ml, pH 7,4 ajusté avec du Na₂HPO₄ 20 mM) va servir à la composition des autres tampons nécessaires dans ce protocole. Chacun des tampons est complété par des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Protease-Phosphatase cocktail inhibitor (Sigma)). 15.10⁶ cellules sont récoltées et lavées deux fois dans du tampon 1 (Sucrose 100 mM dans Tampon A). Elles sont resuspendues dans 0.5 ml de tampon 2 (Triethanolamine 10 mM, Percoll 5% et digitonin 0.1 mg/ml dans Tampon 1). Après 5 minutes d'incubation à 4°C, les cellules sont broyées avec un homogénéisateur de type Potter. L'homogénat obtenu est dilué au 1/4 avec du tampon B (Sucrose 300 mM dans du Tampon A). Après 2 centrifugations à 2500 g, pendant 5 minutes à 4°C, on obtient un culot correspondant aux noyaux cellulaires ; le surnageant est récupéré et ultracentrifugé 2 fois à 10 000 g, pendant 10 minutes à 4°C pour récupérer les mitochondries. Une ultime ultracentrifugation à 100 000 g pendant 1h à 4°C est réalisée pour obtenir la fraction cytosolique.

La deuxième méthode (appelée ici protocole B) est inspirée d'un protocole décrit par Yang et coll (Yang et coll., 1997). $15 \cdot 10^6$ cellules sont récoltées et lavées dans du PBS froid. Le culot cellulaire est repris dans un tampon spécial (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT and 250 mM sucrose), complété par des inhibiteurs de protéases et de phosphatases ((Protease-Phosphatase cocktail inhibitor (Sigma)). Les cellules sont broyées avec un homogénéisateur de type Potter. Les noyaux sont récupérés après une centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est à nouveau centrifugé à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot obtenu correspond aux mitochondries et le surnageant est ultracentrifugé à 100 000g pendant 1h à 4°C pour finalement obtenir la fraction cytosolique.

Les noyaux et les mitochondries, ainsi obtenus par les 2 méthodes, sont ensuite lysés sur glace pendant 20 minutes dans le tampon de lyse (20 mM TrisHCl (pH 7.5), 1% Nonidet P40, 150 mM NaCl - complété par des inhibiteurs de protéases et de phosphatases) et conservés à -20°C.

II.2-Résultats/Discussion

II.2.1- Comparaison des 2 protocoles de fractionnement subcellulaire

Pour valider chacun des 2 protocoles et faire une comparaison de l'efficacité de l'un et l'autre, nous avons choisi d'analyser par Western Blot l'expression de protéines préalablement choisies pour repérer respectivement le cytosol et les mitochondries : l'actine (ou la 14-3-3) et le VDAC (composant du PTP mitochondrial). Les résultats obtenus (Figure 26) nous ont conduit à choisir la deuxième méthode. En effet, on remarque qu'avec le protocole B, on a une meilleure purification de la fraction cytosolique (actine) et de la fraction mitochondriale (VDAC), avec certes une contamination probable des mitochondries dans la fraction contenant les noyaux cellulaires mais qui semble moins importante en proportion qu'avec le protocole A.

II.2.2- Analyse de l'expression de Bad

L'analyse de l'expression de Bad dans les différentes fractions subcellulaires (après vérification de la pureté de fractionnement - Figure 27-A) a été réalisée après

immunoprécipitation et Western Blot. En effet, au démarrage de cette étude, nous envisagions de corréler l'état de phosphorylation de Bad à son trafic intracellulaire, l'immunoprécipitation étant alors la technique la mieux appropriée. De plus dans notre modèle, nous obtenons, par cette approche, une meilleure détection de Bad.

Nos résultats (Figure 27-B) ne mettent pas en évidence une translocation de Bad du cytosol à la mitochondrie, après 24h de stimulation par l'anti-IgM dans les cellules WEHI-231. Par ailleurs, il semblerait qu'il y ait un pool important de Bad exprimé à la mitochondrie dans les cellules WEHI-231 en culture. Ce résultat est quantitativement différent de celui donné par l'approche en microscopie confocale (voir Article 2, Figure 2) qui ne laissait apparaître qu'une faible quantité de Bad à la mitochondrie, dans les cellules saines. Enfin, si cette observation se confirme, il serait intéressant d'étudier le statut (phosphorylé ou déphosphorylé) de Bad, résidant à la mitochondrie.

II.2.3- Analyse de la translocation de l'AIF

Aucune étude n'a été faite sur l'implication de l'AIF dans l'apoptose induite par le BCR des cellules WEHI-231. Par ailleurs, le rôle des caspases effectrices étant controversé, il était intéressant d'analyser l'implication d'un effecteur mitochondrial non caspase dépendant, l'AIF, au cours de la réponse apoptotique induite par le pontage du BCR. Cette étude était accessible en parallèle à celle de la translocation de Bad. Nos résultats préliminaires sembleraient montrer une translocation de l'AIF des mitochondries aux noyaux, dans les cellules WEHI-231 stimulées par l'anti-IgM (Figure 28-B). Nous mettrions alors en évidence, pour la première fois, un signe de l'implication de la phase mitochondriale caspase indépendante dans la réponse apoptotique induite par le BCR. Cependant, comme une contamination de la fraction nucléaire par des mitochondries semble apparaître au cours du fractionnement, l'interprétation des résultats est rendue difficile en l'état actuel du problème :

- soit cette contamination est réelle et nous ne pouvons pas conclure sur la possible translocation de l'AIF de la mitochondrie vers le noyau par cette technique. Une autre approche méthodologique, par microscopie confocale par exemple, est alors à envisager en complément de la finalisation du protocole,

- soit cette contamination est la conséquence éventuelle de modifications morphologiques des mitochondries induites au cours de l'apoptose (gonflement, éclatement), pouvant affecter la qualité du fractionnement,
- soit le VDAC n'est pas un marqueur spécifique de la membrane externe mitochondriale, comme nous le pensions. Il est à noter qu'une telle localisation extra-mitochondriale de cette porine est actuellement envisagée à partir de certains travaux (Bathori et coll., 2000).

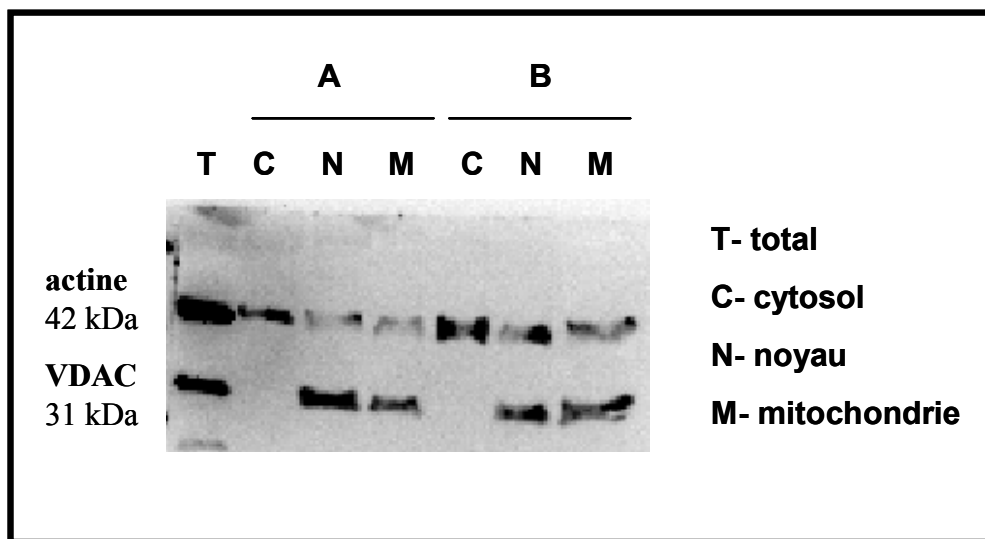


Figure 26 : Analyse comparative des 2 protocoles de fractionnement subcellulaire testés.

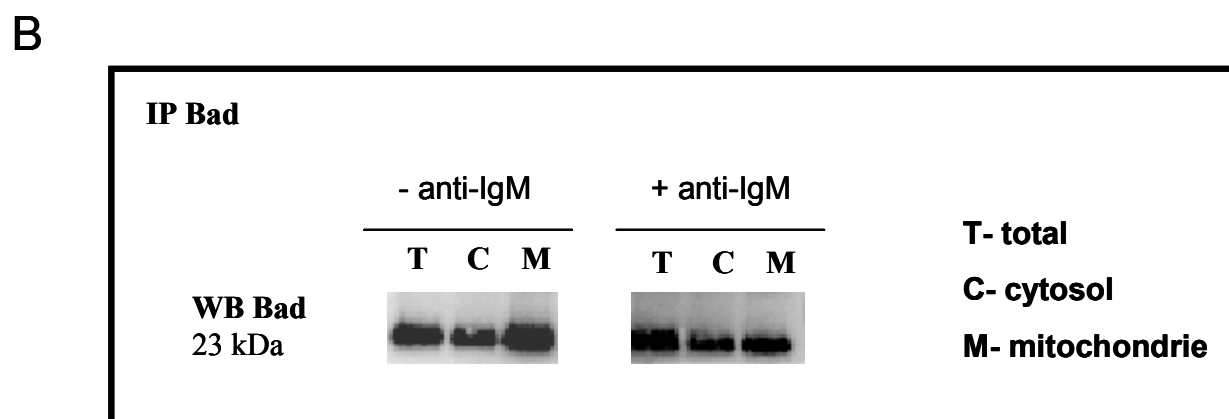
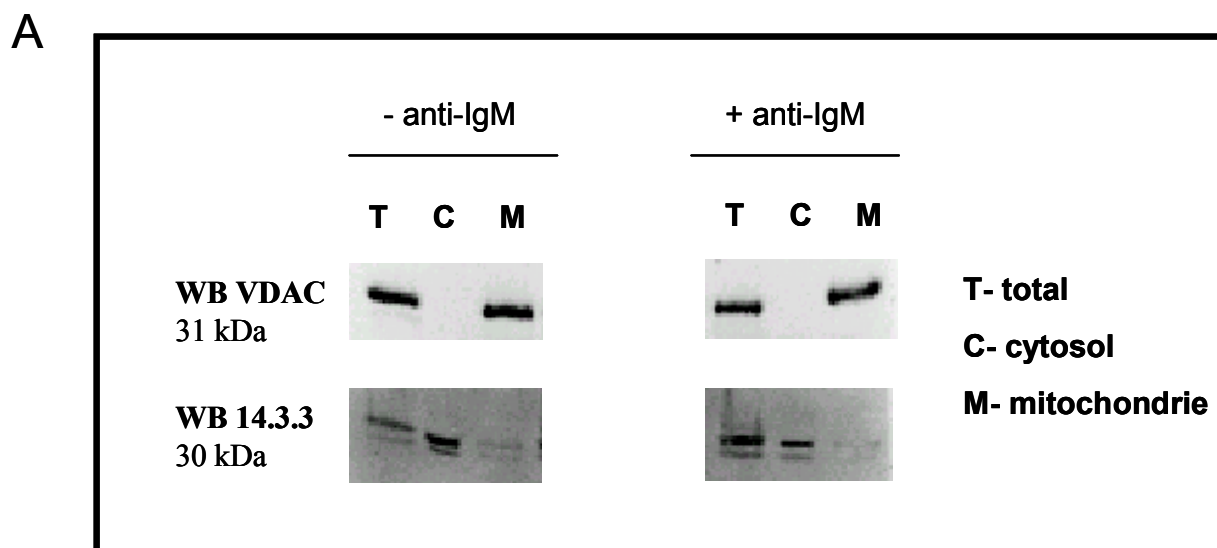


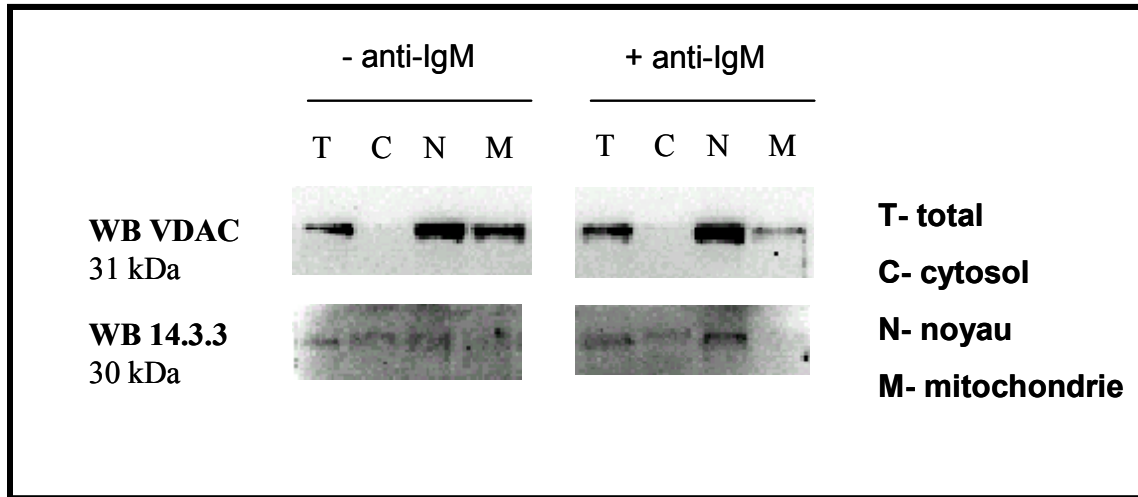
Figure 27 : Analyse par Western Blot de l'expression des protéines VDAC, 14.3.3 et Bad dans différents compartiments cellulaires des cellules WEHI-231 au cours de la stimulation du BCR.

A- Contrôle du fractionnement : expression des protéines 14.3.3 et VDAC dans les différentes fractions subcellulaires (totale, cytosolique et mitochondriale).

B- Expression de Bad dans les cellules WEHI-231 stimulées ou non par l'anti-IgM (1µg/ml) pendant 24h.

Les résultats sont représentatifs de 3 tests indépendants.

A



B

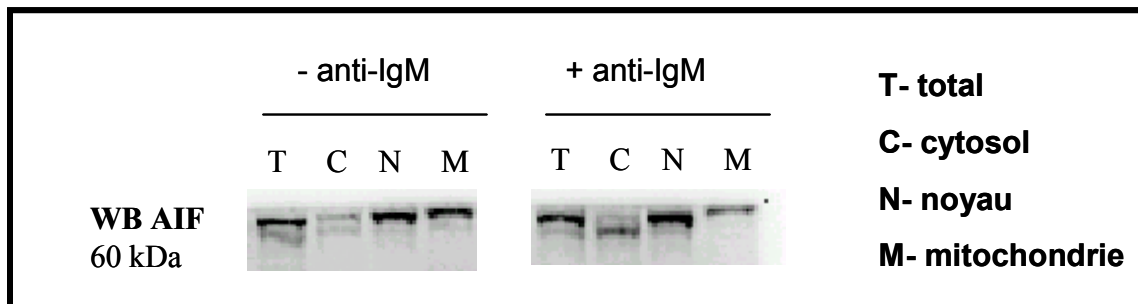


Figure 28 : Analyse par Western Blot de l'expression et de la translocation de l'AIF dans les cellules WEHI-231 stimulées par le pontage du BCR.

A- Contrôle du fractionnement : expression des protéines 14.3.3 et VDAC dans les différentes fractions subcellulaires.

B- Expression de l'AIF dans les cellules WEHI-231 stimulées ou non par l'anti-IgM (1µg/ml) pendant 24h.

Les résultats sont représentatifs de 2 tests indépendants.

III-Conclusion

Collectivement, nous montrons que l'engagement du BCR dans les cellules WEHI-231 provoque, en corrélation avec le signal d'apoptose, la redistribution intracellulaire de Bad, incluant sa dissociation de la 14-3-3 et sa translocation à la mitochondrie. Ces résultats, reflétant l'activation de Bad, sont conformes aux évènements de déphosphorylation que nous avons observés au préalable (Article 1). Par ailleurs nous suggérons l'implication probable d'une activité phosphatase dans ce processus en montrant notamment la présence du complexe Bcl-2/PP1 α /Bad dans notre modèle expérimental. Nos études complémentaires (fractionnement subcellulaire) ne nous permettent pas pour l'instant de confirmer la translocation de Bad du cytosol à la mitochondrie dans les cellules induites. Le protocole de fractionnement reste à optimiser, avant de rechercher l'état de phosphorylation de Bad dans les différentes fractions subcellulaires. De plus, la proportion de cellules en apoptose par rapport aux cellules vivantes dans nos suspensions est peut-être trop faible pour mettre clairement en évidence, à partir de lysats cellulaires totaux, une dé-localisation de Bad dans les cultures induites. Cette discrimination est sans doute favorisée par l'analyse individuelle des cellules permise par la technique de microscopie confocale. En perspective à ce travail, nous pourrions envisager de trier, par cytométrie en flux par exemple, les cellules en apoptose des cellules saines.

Finalement, ces résultats (déphosphorylation de Bad) semblent se confirmer dans le cadre des données préliminaires obtenues à partir des cultures primaires de lymphocytes B (souris BALB/c). Nous proposons par ailleurs que les rafts des lymphocytes B puissent séquestrer différemment Bad en fonction du stade de développement (mature/immature) des cellules.

DISCUSSION GENERALE - PERSPECTIVES

Ce travail est une contribution à l'amélioration de la compréhension des mécanismes à l'origine de la dualité fonctionnelle du BCR, conduisant les lymphocytes B immatures plutôt vers l'apoptose et les lymphocytes B matures vers un signal de survie/prolifération. Plus précisément, il avait pour objectif l'identification d'acteurs moléculaires pouvant permettre de relier la signalisation du BCR en amont à la phase mitochondriale initiatrice de mort en aval.

Nous avons choisi comme modèle biologique principal la lignée murine lymphoblastoïde WEHI-231 car elle présente le phénotype de cellules B immatures (IgM^{high}/IgD^{low}) et qu'elle est classiquement utilisée pour aborder *in vitro* le processus de la sélection négative *in vivo*. Ainsi, elle sert de modèle pour l'étude des mécanismes qui contrôlent la décision de vie ou de mort dans les lymphocytes B immatures (Benhamou et coll., 1990 ; Hasbold and Klaus., 1990 ; Scott., 1993 ; pour revue, voir Gottschalk and Quintans., 1995).

Un certain nombre de travaux ont été réalisés par le passé sur l'apoptose induite par le pontage du BCR dans les lignées cellulaires B immatures issues de lymphoblastomes humains ou murins, comme la lignée WEHI-231. La plupart ont concerné le rôle des kinases (MAPK, PI3K) de la signalisation du BCR en relation avec la régulation du cycle cellulaire, l'arrêt du cycle ayant été décrit précédemment la phase mitochondriale de l'apoptose. Par ailleurs, la majorité des études s'était attachée à préciser les phases effectrices du programme de mort : altérations mitochondriales et recherche de l'implication de caspases effectrices (Ezhevsky et coll., 1996 ; Klaus et coll., 1997 ; Donjerkovic et coll., 1999 ; Doi et coll., 1999 ; Bouchon et coll., 2000 ; Carey et coll., 2001 ; Banerji et coll., 2001 ; Eldering et coll., 2004).

Ainsi il a été montré dans ces lignées que le pontage du BCR par des anti-IgM provoquait le désengagement prolongé de la voie PI3K et la régulation négative de ses effecteurs (p70^{S6K}, Akt/PKB). Ces régulations négatives sont apparues déterminantes dans le devenir du lymphocyte B immature. En effet, le blocage de la voie PI3K par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou l'expression d'un mutant négatif de la PI3K ($\Delta p110^{PI3K}$) mime l'action de l'anti-IgM et augmente son effet apoptotique dans les cellules, en convertissant un signal constitutif de survie en un signal de mort. Inversement la surexpression de la PI3K confère aux cellules B immatures une résistance à l'apoptose induite par des anti-IgM (Carey et coll., 2001 ; Banerji et coll., 2001). Les mécanismes impliqués dans ces effets ont permis d'expliquer l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle, suite à la stimulation du BCR, et

précédant la mort par apoptose (Ezhevsky et coll., 1996 ; Klaus et coll., 1997 ; Donjerkovic et coll., 1999). En effet, la régulation négative de l'activité de la voie PI3K/Akt induite par l'activation du BCR a pu être corrélée notamment à l'activation de p27^{kip1} (inhibiteur des CDK) et à la régulation négative de la cycline D2. Ces événements ont été montrés suffisants, par leurs effets sur la voie pRB/E2F, pour empêcher le passage des cellules en phase S et ainsi déterminer l'arrêt du cycle. Dans ce contexte la mort programmée était interprétée plutôt comme une conséquence de l'arrêt du cycle (Carey et coll., 2001 ; Banerji et coll., 2001).

La seule explication permettant de relier le BCR aux altérations mitochondriales de l'apoptose a été apportée par les travaux du groupe de Harnett et coll. En effet, lors du pontage du BCR dans les cellules WEHI-231, ces auteurs ont établi dans un premier temps une corrélation entre l'activation de la phospholipase A2 mitochondriale (PLA2), la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial associée à la formation d'acides arachidoniques, et la déplétion du contenu cellulaire en ATP en conditions d'apoptose des cellules. Ces modifications n'étaient pas retrouvées en condition de prolifération des cellules ou lors de l'association avec une signalisation de survie apportée par CD40 (Katz et coll., 2001). Le lien direct entre l'activation de la PLA2 mitochondriale et la signalisation du BCR a été démontré ensuite via l'activation de la MAP kinase Erk qui finalement semble pouvoir jouer 2 rôles dans la régulation du devenir des cellules B immatures (WEHI-231) en fonction de la cinétique et du contexte de la stimulation du BCR (associée ou non à la co-stimulation de survie par CD40). Ainsi, le signal de prolifération est possible quand le cycle d'activation d'Erk est restauré par la molécule CD40, qui détourne la signalisation apoptotique (empêchant l'activation de la PLA2 mitochondriale) et ré-orienté la cellule vers la croissance cellulaire et la prolifération (Gauld et coll., 2002). L'apoptose survient lors du pontage du BCR en l'absence de co-signal donné par CD40, où l'activation précoce et furtive d'Erk induit celle de la PLA2 aboutissant aux altérations mitochondriales.

L'activation d'autres MAP kinases pourrait aussi être impliquée dans l'arrêt du cycle et l'apoptose induite par le BCR dans les cellules B immatures. Par exemple, une activation prolongée et soutenue de la JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) semble corrélée à la phase mitochondriale de l'apoptose induite par le BCR (Graves et coll., 1996 ; Takada et coll., 2001).

L'ensemble des données obtenues sur les lignées suggère, comme les études réalisées à partir de cellules B murines purifiées, que la signalisation du BCR des cellules B immatures est défailante en comparaison avec celle des cellules matures. L'incapacité relative à mobiliser

les acteurs (kinases telles que PI3K, PKC, Erk) liés à la survie/prolifération des cellules aboutit à un déséquilibre de l'ensemble de la signalisation favorisant notamment l'activité de kinases liées au stress (ex : JNK) et à la mort cellulaire (King et coll., 1999 ; pour revue, Niirio et coll., 2002).

Les résultats obtenus sur la lignée WEHI-231 dans le cadre de notre thèse apportent un élément nouveau dans la compréhension des mécanismes de l'apoptose induite par le BCR en corrélant les altérations mitochondriales (baisse du $\Delta\Psi_m$) et membranaires (translocation des PS) liées à l'apoptose avec la déphosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad. De plus, ils permettent de relier la régulation négative décrite pour certaines voies de la signalisation du BCR comme la voie de la PI3K et de Erk1/2, à l'incidence de l'apoptose, et non pas uniquement à l'arrêt du cycle comme cela avait été suggéré jusqu'alors. En effet, Bad est un substrat pour les kinases Akt et Rsk, deux effecteurs de PI3K et de Erk1/2 respectivement (Datta et coll., 1997 ; Datta et coll., 2000). Ainsi la régulation négative de ces signalisations lors du pontage du BCR des lymphocytes B immatures aboutit à un défaut de phosphorylation de Bad favorisant son rôle pro-apoptotique. Effectivement nous montrons par microscopie confocale la translocation de Bad à la mitochondrie dans les cellules WEHI-231 stimulées par un anti-IgM. Cette re-localisation de Bad à la mitochondrie est à corrélérer à sa déphosphorylation (Ser136, Ser155 et Ser112) ainsi qu'à sa dissociation de la protéine 14-3-3, autres événements que nous observons lors du pontage du BCR, et qui finalement caractérisent son activation (voir Articles 1 et 2).

Ces résultats semblent en partie se confirmer par notre approche préliminaire réalisée à partir de cultures primaires de cellules B purifiées chez la souris. Ils sont par ailleurs conformes aux données récentes apportées par la réalisation de modèles de souris « knockin » exprimant un Bad actif de façon constitutive, suite à la réalisation de mutations des sérines régulatrices en alanines rendant impossible la phosphorylation de Bad. En effet, l'étude de ces souris a souligné l'importance pour l'organisme à maintenir Bad endogène sous forme phosphorylée dans le cadre notamment du développement et de la survie des lymphocytes (Datta et coll., 2002). Par ailleurs, plus récemment, une étude suggère l'importance du rôle de la phosphorylation de Bad pour les lymphocytes B matures dans la protection vis-à-vis de divers stimuli d'apoptose (arsénate de Na, drogues ou hyperthermie) (Muscarella et Bloom, 2003). Ces résultats sont à corrélérer avec ceux obtenus sur les lignées cellulaires T cytokines-dépendantes montrant que l'apoptose, induite par la déprivation cytokinique, est associée à la

déphosphorylation de Bad et sa translocation à la mitochondrie (Ayllon et coll., 2000 ; Fleischer et coll., 2004).

De façon générale, les études sur la transduction du signal apoptotique dans les cellules se sont focalisées sur le rôle des kinases et peu de recherches ont abordé l'implication des phosphatases. Cependant, un intérêt pour ces enzymes est apparu récemment dans le processus de l'apoptose lié à l'importance d'un équilibre fonctionnel kinases/phosphatases dans la régulation par phosphorylation des protéines de la famille Bcl-2 (Klumpp et Krieglstein., 2002). Aucune corrélation en relation avec l'apoptose n'a été établie entre une dérégulation de l'activité de phosphatases et la dualité fonctionnelle du BCR. Il est vrai que ces enzymes étant exprimées dans de nombreux compartiments subcellulaires et régulant ainsi diverses fonctions (métabolisme, réplication de l'ADN, transcription et traduction, progression du cycle cellulaire...), il n'est pas facile d'établir un rôle bien déterminé à une phosphatase en particulier. De plus, il est généralement difficile d'inhiber spécifiquement une phosphatase cible car pour une même gamme de concentration, les inhibiteurs pharmacologiques bloquent l'activité d'un « panel » de phosphatases. L'implication de l'activation d'une phosphatase dans la déphosphorylation de Bad observée au cours de l'apoptose des cellules WEHI-231 n'étant pas exclue, notre première approche a été de rechercher l'effet de l'inhibition pharmacologique de protéine phosphatases responsables de la déphosphorylation de Bad (PP1 et/ou PP2A). Nous n'avons pas pu mettre clairement en évidence leur rôle car leur inhibition par l'acide okadaïque n'a pas empêché le signal apoptotique déclenché par le pontage du BCR (voir article 1). Une holoenzyme fonctionnelle Bcl-2/PP1 α a été récemment découverte dans des lignées cellulaires de lymphocytes T. Son activation a été corrélée au signal apoptotique induit par la déprivation de facteurs de croissance, en association avec la déphosphorylation de Bad sur les Ser 136 et 112. Ainsi dans ce modèle, Bcl-2 joue le rôle de sous unité régulatrice de PP1 α , amenant PP1 α à sa cible, Bad (Ayllon et coll., 2001 ; Ayllon et coll., 2002 ; Garcia et coll., 2003 (b)). Nous retrouvons l'association Bad/PP1 α /Bcl-2 dans notre modèle cellulaire, et nos résultats suggèrent que l'activation de PP1 α pourrait être dépendante de Bcl-2 et participer au déclenchement du processus apoptotique médié par le BCR. Ces dernières données, ajoutées à nos résultats sur la voie PI3K/Akt, suggèrent que l'engagement du BCR déclencherait un signal de mort dans les lymphocytes B immatures, à la fois par la régulation négative de voies de survie (PI3K/Akt) et par l'activation de PP1 α . Ces deux mécanismes régulant la fonctionnalité de

Bad favoriseraient ainsi la formation d'un pool intracellulaire de Bad actif (déphosphorylé), responsable de l'apparition de l'apoptose dans les cellules B immatures.

De plus l'étude que nous avons réalisée en microscopie confocale sur la localisation de Bad dans des cellules B murines fraîchement isolées et purifiées suggère une capacité différente des rafts à séquestrer Bad en fonction de l'état de maturation des lymphocytes B. En effet, nous observons une co-localisation de Bad aux rafts dans les cellules B matures, et pas dans les cellules B immatures, comme d'ailleurs pour les cellules WEHI-231. Nous proposons que cette relative incapacité à séquestrer Bad, sans doute sous forme active non phosphorylée, pourrait contribuer à une plus grande susceptibilité des lymphocytes B immatures à l'apoptose. A l'inverse, Bad actif serait moins disponible dans les lymphocytes B matures, ces microdomaines lipidiques membranaires (rafts) ayant été proposés comme nouveau compartiment de séquestration de Bad sous sa forme active non phosphorylée (Ayllon et coll., 2002). La question qui se pose maintenant est de savoir s'il s'agit d'une modification structurale des rafts, intrinsèque aux lymphocytes B immatures, qui modifierait leurs propriétés de plateforme de signalisation et/ou de trafic membranaire ? En effet une altération des rafts a été mise en évidence lors de la déprivation cytokinique de lignées T H4-dépendantes. Elle a été par ailleurs corrélée à la ségrégation de Bad depuis les rafts vers la mitochondrie et finalement à la réponse apoptotique (Fleischer et coll., 2004). Concernant le modèle des lymphocytes B, l'hypothèse d'une modification structurale des rafts liée au développement est séduisante pour expliquer l'incapacité du BCR à accéder aux rafts dans les lymphocytes B immatures, contrairement aux cellules matures (Sproul et coll., 2000 ; Chung et coll., 2001, Cheng et coll. 2001). Finalement, cette hypothèse permettrait de rendre compte, par la double fonction des rafts dans le « signalosome B » et la machinerie apoptotique, de la dualité fonctionnelle du BCR déterminant selon les cas la survie ou l'apoptose des lymphocytes.

Concernant les mécanismes de la phase mitochondriale de l'apoptose dans les cellules WEHI-231, nos résultats suggèrent que la baisse du $\Delta\Psi_m$ n'est pas due à une activation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP). L'hypothèse la plus probable est la régulation directe de la perméabilité mitochondriale par des molécules de la famille Bcl-2 : soit par l'inhibition du rôle protecteur de Bcl-2, suite à la translocation de Bad à la mitochondrie, soit par la formation de pores liée par exemple à la translocation de Bax. En effet, comme nous avons vu dans l'introduction, les membres de la famille Bcl-2 comme Bax

peuvent former eux-mêmes des canaux dans la membrane externe mitochondriale ou réguler directement l'ouverture/fermeture du PTP. Ainsi, le rôle central de Bad que nous suggérons par ce travail n'exclue pas la participation d'autres régulateurs mitochondriaux comme d'autres protéines de la famille Bcl-2. En effet, bien que la modulation de l'expression de Bax et Bcl-2 reste incertaine lors de la stimulation du BCR (anti-IgM) dans les cellules WEHI-231 (Wang et coll., 1995), les études ont clairement démontré le rôle protecteur de la surexpression d'acteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-x_L vis-à-vis de l'apoptose induite par le BCR. De plus, il faut rappeler ici que la caractéristique des membres « BH3-only » de la famille Bcl-2, comme Bad, est de faire le lien entre des stimuli membranaires d'apoptose et la machinerie apoptotique de la cellule. Finalement l'implication de caspases dans l'apoptose induite par le BCR des lymphocytes B immatures reste controversée. En effet, si certains auteurs (Chen et coll., 1998 ; Bras et coll., 1999 ; Doi et coll., 1999 ; Herold et coll., 2002) mettent en évidence l'activation de caspases (3, 7 et 9) dans le signal d'apoptose, d'autres travaux ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de caspases ne bloquait pas l'entrée en apoptose des cellules et que la mort induite par le BCR serait dépendante d'autres types de protéases comme les cathepsines ou calpaines (Ruiz-Vela et coll., 1999 ; Banerji et coll., 2001). L'ensemble de ces observations suggère que les caspases, cathepsines et calpaines doivent interagir ensemble pour déclencher une induction efficace et complète de l'apoptose des cellules WEHI-231. Par ailleurs, aucune corrélation entre les altérations de la mitochondrie et la libération d'un effecteur mitochondrial caspase-indépendant de l'apoptose n'avait été mise en évidence jusqu'alors dans les cellules WEHI-231. Il nous a paru intéressant d'étudier l'implication de l'AIF dans ce contexte. En effet, suite à la perméabilisation mitochondriale lors d'un stimulus apoptotique, l'AIF peut être relargué dans le cytoplasme provoquant un signal de mort indépendant de l'activation de caspases. Il est alors « transloqué » au noyau où il participe au clivage de l'ADN (Susin et coll., 1999). Bien que nos premiers résultats soient à interpréter avec précaution (qualité du fractionnement subcellulaire) et doivent être confirmés, la translocation de l'AIF pourrait être impliquée dans la réponse apoptotique médiée par le BCR. Ainsi, ces résultats ouvrent une nouvelle voie de recherche dans la compréhension des mécanismes effecteurs en aval de la phase mitochondriale lors de l'apoptose induite par la signalisation du BCR.

Enfin, nos études complémentaires sur la translocation cytosol/mitochondrie de Bad au cours de l'apoptose induite par le BCR semblent indiquer qu'un pool de Bad serait fortement exprimé à la mitochondrie dans les cellules WEHI-231 en croissance. Cette localisation de Bad classiquement associée à son rôle pro-apoptotique peut apparaître contradictoire pour des cellules saines. Or il est connu qu'une kinase de Bad, la PKA, est localisée à la mitochondrie (ancrée par une AKAP) et nous avons vu dans notre modèle la participation de cette voie. En effet, son inhibition potentialise la réponse apoptotique induite par le BCR, en corrélation avec une déphosphorylation de Bad (Ser155) (voir Article 1). Il n'est donc pas improbable que cette fraction mitochondriale de Bad soit sous forme phosphorylée (inactif), résultat récemment suggéré par les travaux de l'équipe de Korsmeyer. De façon intéressante, ces auteurs montrent la présence de PKA et de PP1c, toutes deux associées à Bad, à la mitochondrie. On comprend alors que si les acteurs de la phosphorylation et déphosphorylation de Bad sont localisés à proximité de Bad à la mitochondrie, les deux statuts de Bad, phosphorylé (inactif) et déphosphorylé (actif), pourraient coexister dans cet organite. Ces auteurs sont allés plus loin dans l'étude du complexe PKA/Bad/PP1c et ils montrent en fait qu'il s'agit d'une holoenzyme fonctionnelle mitochondriale : PKA/Bad/PP1c/glucokinase, où Bad constituerait la molécule limitante à la formation du complexe. Le rôle physiologique de Bad à la mitochondrie est alors apparu double : un rôle lié à l'apoptose, et de façon originale un rôle de survie lié au métabolisme du glucose. En effet, les souris Bad^{-/-} ou possédant un mutant Bad constitutivement actif présentent une homéostasie glucidique anormale. Bad favoriserait l'activité de la glucokinase mitochondriale et sa phosphorylation serait nécessaire à l'activité maximale de l'enzyme. Ainsi la phosphorylation de Bad est un facteur de survie cellulaire à double titre : en empêchant son rôle pro-apoptotique mitochondrial et en favorisant le métabolisme glucidique. (Danial et coll., 2003).

En conclusion, il apparaît aujourd'hui que Bad serait un acteur majeur de la physiologie mitochondriale régulant à la fois son rôle dans le métabolisme énergétique de la cellule (glycolyse) et dans le processus apoptotique.

A l'issue de l'analyse de nos résultats, un certain nombre de perspectives sont donc envisagées dans la continuité de notre travail de thèse :

1) Sur la lignée WEHI-231 :

- la confirmation de la translocation de Bad à la mitochondrie après fractionnement subcellulaire et western-blotting associée à son statut de phosphorylation (voir discussion/conclusion Article 2). Par ailleurs, afin d'approfondir les mécanismes impliqués dans la baisse du $\Delta\psi_m$ au cours de la stimulation du BCR, il serait intéressant de rechercher, en plus de la translocation de l'AIF au noyau, celle de Bax du cytosol à la mitochondrie, et la possible co-localisation de cette protéine avec des composants du pore (PTP) comme le VDAC.
- la mise en évidence de l'importance (activation constitutive) de la voie PI3K/Akt dans notre modèle biologique par l'inhibition transitoire de la synthèse de l'Akt. Ce travail est actuellement en cours par une approche par ARN interférence.
- la mise en corrélation de la présence du complexe Bcl-2/Bad/PP1 α dans les cellules WEHI-231 avec l'identification d'une activité phosphatase dans les différents immunoprécipités, ce qui permettrait d'envisager la fonctionnalité de l'holoenzyme Bcl2/ PP1 α sur son substrat Bad.
- enfin, la confirmation du rôle sans doute critique de l'activation de PP1 α lors de réponse apoptotique induite par la stimulation du BCR des cellules WEHI-231. Cette étude est rendue possible par la collaboration que nous avons initiée avec le groupe d'A. Garcia qui est à l'origine d'un concept technologique prometteur, la DPT (Drug Phosphatase Technology). Ce concept devrait permettre d'élaborer une nouvelle stratégie thérapeutique pour bloquer spécifiquement des voies de signalisation impliquant PP1 ou PP2A et ainsi induire la mort par apoptose de cellules tumorales (Garcia et coll., 2004). Ainsi, la détermination de séquences consensus servant de sites de liaison et d'activation pour les protéines phosphatases PP1 notamment, séquences retrouvées en particulier dans la molécule Bad, ont abouti à la synthèse de bio-peptides « pénétrants » capables d'activer spécifiquement la sous-unité catalytique de PP1 (PP1c). Nous allons donc tester certains de ces peptides dans les cellules WEHI-231, et analyser leur capacité à mimer le signal induit par le BCR en terme d'apoptose corrélée à des événements de déphosphorylation de Bad

2) Sur le modèle *ex-vivo* (souris BALB/c) :

- la recherche de la signification physiologique des résultats obtenus sur la lignée WEHI-231 nous amène à poursuivre les études préliminaires réalisées à partir des cultures primaires de lymphocytes B purifiés chez la souris (rate, moelle osseuse). En particulier, nous souhaitons pouvoir corrélérer par une étude cinétique la déphosphorylation de Bad aux altérations morphologiques et fonctionnelles de l'apoptose, après stimulation des lymphocytes B immatures par des anti-IgM.
- par ailleurs, l'isolement des rafts à partir de lysats cellulaires sera envisagé pour vérifier par une approche biochimique et immunologique la localisation de Bad dans ces domaines membranaires. Cette localisation sera aussi analysée en fonction du statut de phosphorylation (probablement non phosphorylé) de Bad. Le nombre important de cellules inhérent à la technique d'étude des rafts nous engage à démarrer cette approche sur une lignée cellulaire B mature. Il sera alors intéressant de suivre le trafic intracellulaire de Bad, et éventuellement d'observer sa ségrégation des rafts vers la mitochondrie lors d'un signal d'apoptose en relation ou non avec la signalisation du BCR (par exemple comme suite à une activation chronique du BCR, dans le cadre de l'apoptose induite par l'Ag, Berard et coll., 1999).

3) En relation avec des applications thérapeutiques en cancérologie :

- le contrôle de l'équilibre survie/apoptose prend une dimension particulièrement importante dans la survenue du processus tumoral. Dans ce contexte, le rôle de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-x_L est apparu central notamment dans les lymphomes B, à l'origine de la découverte du premier membre de cette famille. Ces protéines sont souvent surexprimées dans les lymphomes et leur expression est un facteur de mauvais pronostic dans leur malignité. Inversement les protéines pro-apoptotiques comme Bad pourraient fonctionner comme des suppresseurs tumoraux et la perte de leur fonction (déficience ou phosphorylation par exemple) pourrait contribuer à l'apparition de tumeurs malignes. Une étude réalisée chez l'homme reporte l'analyse de l'expression quantitative de divers régulateurs de l'apoptose parmi lesquels Bad dans plusieurs types de lymphomes B non-Hodgkiniens (Xerri et coll., 1999). Il ressort de ce travail qu'un niveau particulièrement élevé de Bad est associé de façon surprenante au lymphome diffus à grandes cellules (LDLC) comparativement aux autres types étudiés. Au vue de ces données, il nous a paru intéressant de rechercher si une expression différentielle de Bad pouvait être corrélée à des stades

différents en terme de malignité de ce type de lymphome. En effet ce lymphome est caractérisé par sa grande hétérogénéité en terme de profils cellulaires B concernés (phénotype : cellule B mature activée) en plus de sa forte prévalence parmi la totalité des lymphomes B non-Hodgkiniens (Rossi et Gaidano., 2002). Ainsi, afin de valoriser nos résultats dans un cadre plus appliqué nous rechercherons si l'expression de Bad associée à son statut de phosphorylation (prédictif de son activité pro-apoptotique) peut servir d'outil dans le diagnostic et/ou le traitement de ce type de lymphome. Cette analyse sera corrélée à celle de l'expression de PP1alpha et à des marqueurs mitochondriaux de l'apoptose, comme la protéine AIF. L'expression de la protéine Bcl-2 sera utilisée comme référence. Ce travail est actuellement en cours sur 10 cas de lymphomes B à grandes cellules dans le cadre d'une collaboration avec les services d'Anatomie Pathologique et d'Hématologie clinique du CHRU de Limoges (financement de La Ligne Régionale contre le Cancer).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams JM and Cory S. The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. *Science*. 1998. 281 : 1322-6.

Algeciras-Schimnich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK and Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol*. 2002. 22 : 207-20.

Aman MJ and Ravichandran KS. A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca(2+) flux. *Curr Biol*. 2000. 10 : 393-6.

Ameisen JC. La Sculpture du vivant. Le suicide cellulaire ou la mort créatrice. 1999, 2nd ed. 2000. Paris : Editions du Seuil.

Ameisen JC. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death : a timeline of four billion years. *Cell Death Differ*. 2002. 9 : 367-93.

Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, and Martinou JC. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*. 1997. 277 : 370-2.

Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R and Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J*. 2000. 345. 2 : 271-8.

Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res*. 2001. 306 : 347-61.

Ayllon V, Cayla X, Garcia A, Roncal F, Fernandez R, Albar J.P, Martinez-A C and Rebollo A. Bcl-2 targets protein phosphatase 1 alpha to Bad. *J Immunol*. 2001. 166 : 7345-52.

Ayllon V, Fleischer A, Cayla X, Garcia A and Rebollo A. Segregation of Bad from lipid rafts is implicated in the induction of apoptosis. *J Immunol*. 2002. 168 : 3387-93.

Ayllon V, Martinez-A C, Garcia A, Cayla X, and Rebollo A. Protein phosphatase 1 alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *EMBO J*. 2000. 19 : 2237-46.

Baffy G, Miyashita T, Williamson JR and Reed JC. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem.* 1993. 268 : 6511-9.

Banerji L, Glassford J, Lea N.C, Thomas NS, Klaus GG and Lam EW. BCR signals target p27^(kip1) and cyclin D2 via the PI3K signalling pathway to mediate cell cycle arrest and apoptosis of WEHI 231 B cells. *Oncogene.* 2001. 20 : 7352-67.

Basanez G, Zhang J, Chau BN, Maksaev GI, Frolov VA, Brandt TA, Burch J, Hardwick JM and Zimmerberg J. Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem.* 2001. 276 : 31083-91.

Bathori G, Parolini I, Szabo I, Tombola F, Messina A, Oliva M, Sargiacomo M, De Pinto V and Zoratti M. Extramitochondrial porin: facts and hypotheses. *J Bioenerg Biomembr.* 2000. 32 : 79-89.

Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P and Crabtree GR. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science.* 1997. 275 : 1930-4.

Benhamou LE, Cazenave P, Sarthou P. Anti-immunoglobulins induce death by apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur J Immunol.* 1990. 20 : 1405-1407.

Berard M, Casamayor-Palleja M, Billian G, Bella C, Mondière P and Defrance T. Activation sensitizes human memory B cells to B cell receptor induced apoptosis. *Immunology.* 1999. 98 : 47-54.

Berard M, Mondière P, Casamayor-Palleja M, Hennino A, Bella C and Defrance T. Mitochondria connects the antigen receptor to effector caspases during B cell receptor-induced apoptosis in normal human B cells. *J Immunol.* 1999. 163 : 4655-62.

Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I and Zoratti M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem.* 1992. 267 : 2934-9.

Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, Tayber OV, Errada PR, Grant JR, Keilty JJ, Gosselin ML, Robison KE, Wong GH, Glucksmann MA and DiStefano PS. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem.* 1999. 274 : 12955-8.

Beutner G, Ruck A, Riede B and Brdiczka D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1998. 1368 : 7-18.

Blum JH, Stevens TL and Defranco AL. Role of the mu immunoglobulin heavy chain transmembrane and cytoplasmic domains in B-cell antigen receptor expression and signal transduction. *J Biol Chem.* 1993. 268 : 27236-45.

Borner C. The Bcl-2 protein family : sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 2003. 39 : 615-47.

Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD and Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 1998. 17 : 37-49.

Bouchon A, Krammer PH and Walczak H. Critical role for mitochondria in B cell receptor-mediated apoptosis. *Eur J Immunol.* 2000. 30 : 69-77.

Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM and Strasser A. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science.* 1999. 286 : 1735-8.

Bourgeron T, Chretien D, Rotig A, Munnich A and Rustin P. Isolation and characterization of mitochondria from human B lymphoblastoid cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992. 186 : 16-23.

Bras A, Ruiz-Vela A, Gonzalez de Buitrago G and Martinez-AC. Caspase activation by BCR cross-linking in immature B cells : differential effects on growth arrest and apoptosis. *FASEB J.* 1999. 13 : 931-944.

Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclouhier H, Reed JC and Kroemer G. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene*. 2000. 19 : 329-36.

Brown DA and Jacobson K. Microdomains, lipid rafts and caveolae. *Traffic*. 2001. 2 : 668-72.

Buhl AM and Cambier JC. Phosphorylation of CD19 Y484 and Y515, and linked activation of phosphatidylinositol 3-kinase, are required for B cell antigen receptor-mediated activation of Bruton's tyrosine kinase. *J Immunol*. 1999. 162 : 4438-46.

Carey GB and Scott WD. Role of phosphatidylinositol 3 kinase in anti-IgM and anti-IgD induced apoptosis in B cell lymphomas. *J Immunol*. 2001. 166 : 1618-26.

Carter RH, Doody GM, Bolen JB and Fearon DT. Membrane IgM-induced tyrosine phosphorylation of CD19 requires a CD19 domain that mediates association with components of the B cell antigen receptor complex. *J Immunol*. 1997. 158 : 3062-9.

Casola S, Otipoby KL, Alimzhanov M, Humme S, Uyttersprot N, Kutok JL, Carroll MC and Rajewsky K. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol*. 2004. 5 : 317-27.

Cecconi F. Apaf1 and the apoptotic machinery. *Cell Death Differ*. 1999.6 : 1087-98.

Chan VW, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, and Lowell CA. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity*. 1997. 7 : 69-81.

Chang BS, Minn AJ, Muchmore SW, Fesik SW and Thompson CB. Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *EMBO J*. 1997. 16 : 968-77.

Chen L, Kim TJ, Pillai S. Inhibition of caspase activity prevents anti-IgM induced apoptosis but not ceramide generation in WEHI 231 B cells. *Mol Immunol*. 1998. 35 : 195-205.

Cheng P.C, Dykstra M, Mitchell R.N and Pierce S.K. A role for lipid rafts in BCR signaling and antigen targeting. *J Exp Med*. 1999. 190 : 1549-60.

Cheng PC, Brown BK, Song W and Pierce SK. Translocation of the B cell antigen receptor into lipid rafts reveals a novel step in signaling. *J Immunol*. 2001. 166 : 3693-701.

Cherukuri A, Cheng PC, Sohn HW and Pierce SK. The CD19/CD21 complex functions to prolong B cell antigen receptor signaling from lipid rafts. *Immunity*. 2001. 14 : 169-79.

Cherukuri A, Shoham T, Sohn HW, Levy S, Brooks S, Carter R and Pierce SK. The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol*. 2004. 172 : 370-80.

Chiang CW, Harris G, Ellig C, Masters SC, Subramanian R, Shenolikar S, Wadzinski BE and Yang E. Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood*. 2001. 97 : 1289-97.

Choquet D, Ku G, Cassard S, Malissen B, Korn H, Fridman WH and Bonnerot C. Different patterns of calcium signaling triggered through two components of the B lymphocyte antigen receptor. *J Biol Chem*. 1994. 269 : 6491-7.

Chu ZL, Pio F, Xie Z, Welsh K, Krajewska M, Krajewski S, Godzik A and Reed JC. A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2001. 276 : 9239-45.

Chung JB, Baumeister MA and Monroe JG. Cutting edge : differential sequest of plasma membrane-associated B cell antigen receptor in mature and immature B cells into glycosphingolipid-enriched domains. *J Immunol*. 2001. 166 : 736-740.

Couzinet A, Hérincs Z and Hueber AO. Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Medecine/Sciences*. 2002. 18 : 841-52.

Craddock BL, Hobbs J, Edmead CE and Welham MJ. Phosphoinositide 3-kinase-dependent regulation of interleukin-3-induced proliferation: involvement of mitogen-activated protein kinases, SHP2 and Gab2. *J Biol Chem*. 2001. 276 : 24274-83.

Crompton M, McGuinness O and Nazareth W. The involvement of cyclosporin A binding proteins in regulating and uncoupling mitochondrial energy transduction. *Biochim Biophys Acta*. 1992. 1101 : 214-7.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999. 341 : 223-49.

Crook NE, Clem RJ and Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*. 1993. 67 : 2168-74.

Cyster JG and Goodnow CC. Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity*. 1995. 3 : 691-701.

Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP and Korsmeyer SJ. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*. 2003. 424 : 952-6.

Datta S.R, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y and Greenberg M.E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997. 91 : 231-41.

Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB and Greenberg ME. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell*. 2000. 6 : 41-51.

Datta SR, Ranger AM, Lin MZ, Sturgill JF, Ma YC, Cowan CW, Dikkes P, Korsmeyer SJ and Greenberg ME. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev Cell*. 2002. 3: 631-43.

Davis PK, Ho A and Dowdy SF. Biological methods for cell cycle synchronization of mammalian cells. *Biotechniques*. 2001. 6 : 1322-31.

de Alboran IM, Robles MS, Bras A, Baena E, Martinez-A C. Cell death during lymphocyte development and activation. *Semin Immunol*. 2003. 15 : 125-33.

De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ and Ichas F. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J.* 2002. 16 : 607-9.

Deng X, Ito T, Carr R, Mumby M and May WS Jr. Reversible phosphorylation of Bcl-2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 1998. 273 : 34157-163.

Doi T, Motoyama N, Tokunoga A and Watanabe T. Death signals from the B cell antigen receptor target mitochondria, activating necrotic and apoptotic death cascades in a murine B cell line, WEHI 231. *Int Immunol.* 1999. 11: 933-41.

Donjerkovic D, Zhang L and Scott DW. Regulation of p27Kip1 accumulation in murine B-lymphoma cells : role of c-Myc and calcium. *Cell Growth Differ.* 1999. 10 : 695-704.

Donovan M and Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Bioch Biophys Acta.* 2004. 1644 : 133-47.

Donovan N, Becker EB, Konishi Y and Bonni A. JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem.* 2002. 277 : 40944-9.

Dounay AB and Forsyth CJ. Okadaic acid: the archetypal serine/threonine protein phosphatase inhibitor. *Curr Med Chem.* 2002. 9 : 1939-80.

Drams S, Scheid MP, Maiti A, Hojabrpour P, Chen X, Schubert K, Goodlett DR, Aebersold R and Duronio V. Identification of a novel phosphorylation site, Ser-170, as a regulator of bad pro-apoptotic activity. *J Biol Chem.* 2002. 277 : 6399-6405.

Duvall E and Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol. Today.* 1986. 7 : 115-9.

Earnshaw WC, Martins LM and Kaufmann SH. Mammalian caspases : structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999. 68 : 383-474.

Edelman GM. The structure and function of antibodies. *Sci Am.* 1970. 223 : 34-42.

Eggloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P and Barford D. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J.* 1997. 16 : 1876-87.

Eldering E, Mackus WJ, Derks IA, Evers LM, Beuling E, Teeling P, Lens SM, van Oers MH and van Lier RA. Apoptosis via the B cell antigen receptor requires Bax translocation and involves mitochondrial depolarization, cytochrome C release, and caspase-9 activation. *Eur J Immunol.* 2004. 34 :1950-60

Enari M, Hug H and Nagata S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature.* 1995. 375 : 78-81.

Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B and Tedder TF. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity.* 1995. 3 : 39-50.

Engels N, Wollscheid B and Wienands J. Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha. *Eur J Immunol.* 2001. 31 : 2126-34.

Eskes R, Desagher S, Antonsson B and Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 2000. 20 : 929-35.

Ezhevsky SA, Toyoshima H, Hunter T and Scott DW. Role of cyclin A and p27 in anti-IgM induced G1 growth arrest of murine B-cell lymphomas. *Mol Biol Cell.* 1996. 7 : 553-64.

Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV and Zervos AS. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem.* 2000. 275 : 2581-8.

Fang W, Weintraub BC, Dunlap B, Garside P, Pape KA, Jenkins MK, Goodnow CC, Mueller DL and Behrens TW. Self-reactive B lymphocytes overexpressing Bcl-xL escape negative selection and are tolerized by clonal anergy and receptor editing. *Immunity*. 1998. 9 : 35-45.

Ferri KF and Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*. 2001. 3 : E255-63.

Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, Este JA, Zamzami N, Susin SA, Xie Z, Brothers G, Reed JC, Penninger JM and Kroemer G. Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *J Exp Med*. 2000. 192 : 1081-92.

Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*. 1994. 78 : 539-42.

Flaswinkel H and Reth M. Dual role of the tyrosine activation motif of Ig- α protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *EMBO J*. 1994. 13 : 83-9.

Fleischer A, Ghadiri A, Dessauge F, Duhamel M, Cayla X, Garcia A and Rebollo A. Bad-dependent rafts alteration is a consequence of an early intracellular signal triggered by interleukin-4 deprivation. *Mol Cancer Res*. 2004. 2 : 674-84.

Fong DC, Brauweiler A, Minskoff SA, Bruhns P, Tamir I, Mellman I, Dairon M and Cambier JC. Mutational analysis reveals multiple distinct sites within Fc gamma receptor IIB that function in inhibitory signaling. *J Immunol*. 2000. 165 : 4453-62.

Friedrichson T and Kurzchalia TV. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature*. 1998. 394 : 802-5.

Fruman DA, Snapper SB, Yballe CM, Davidson L, Yu JY, Alt FW and Cantley LC. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85 α . *Science*. 1999. 283 : 393-7.

Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, Krammer PH, Peter ME and Debatin KM. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ.* 1998. 5 : 884-93.

Garcia A, Cayla X, Caudron B, Deveaud E, Roncal F and Rebollo A. New insights in protein phosphorylation: a signature for protein phosphatase 1 interacting proteins. *C R Biol.* 2004. 327 : 93-7.

Garcia A, Cayla X, Fleischer A, Guergnon J, Alvarez-Franco Canas F, Rebollo MP, Roncal F, Rebollo A. Rafts: a simple way to control apoptosis by subcellular redistribution. *Biochimie.* 2003. 85 : 727-31 (a).

Garcia A, Cayla X, Guergnon J, Dessauge F, Hospital V, Rebollo MP, Fleischer A and Rebollo A. Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie.* 2003. 85 : 721-6 (b).

Gauld SB, Blair D, Moss CA, Reid SD and Harnett MM. Differential roles for extracellularly regulated kinase-mitogen-activated protein kinase in B cell antigen receptor induced apoptosis and CD40-mediated rescue of WEHI 231 immature B cells. *J Immunol.* 2002. 168 : 3855-3864.

Gold MR, Ingham RJ, McLeod SJ, Christian SL, Scheid MP, Duronio V, Santos L and Matsuuchi L. Targets of B-cell antigen receptor signaling: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway and the Rap1 GTPase. *Immunol Rev.* 2000. 176 : 47-68.

Gold MR. Intermediary signaling effectors coupling the B-cell receptor to the nucleus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000. 245 : 77-134.

Gold MR. To make antibodies or not: signaling by the B-cell antigen receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 2002. 23 : 316-24.

Gottschalk AR and Quintans J. Apoptosis in B lymphocytes: the WEHI-231 perspective. *Immunol Cell Biol.* 1995. 73 : 8-16.

Graves JD, Draves KE, Craxton A, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA. Involvement of stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in mIgM-induced apoptosis of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. 93 : 13814-8.

Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR and Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 1995. 270 : 1189-92.

Groux H, Monte D, Bourrez JM, Capron A and Ameisen JC. Activation of CD4+ T-lymphocytes in asymptomatic HIV infected patients induce the program action of lymphocyte death by apoptosis . *C R Acad Sci III*. 1991. 312 : 599-606.

Grupp SA, Campbell K, Mitchell RN, Cambier JC and Abbas AK. Signaling-defective mutants of the B lymphocyte antigen receptor fail to associate with Ig-alpha and Igbeta/gamma. *J Biol Chem*. 1993. 268 : 25776-9.

Halestrap AP. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp*. 1999. 66 : 181-203.

Harada H, Beknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD and Korsmeyer SJ. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell*. 1999. 3 : 413-22.

Hasbold J and Klaus GG. Anti-immunoglobulin antibodies induce apoptosis in immature B cell lymphomas. *Eur J Immunol*. 1990. 20 : 1685-90.

Hata A, Sabe H, Kurosaki T, Takata M and Hanafusa H. Functional analysis of Csk in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *Mol Cell Biol*. 1994. 14 : 7306-13.

Healy JI, Dolmetsch RE, Lewis RS and Goodnow CC. Quantitative and qualitative control of antigen receptor signalling in tolerant B lymphocytes. *Novartis Found Symp*. 1998. 215 : 137-44.

Hengartner MO and Horvitz HR. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev*. 1994. 4 : 581-6.

Herold MJ, Kuss AW, Kraus C and Berberich I. Mitochondria-dependent caspase-9 is necessary for antigen receptor-mediated effector caspase activation and apoptosis in WEHI 231 lymphoma cells. *J Immunol.* 2002. 168 : 3902-3909.

Hertz M and Nemazee D. Receptor editing and commitment in B lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 1998. 10 : 208-13.

Hibbs ML, Tarlinton DM, Armes J, Grail D, Hodgson G, Maglitta R, Stacker SA and Dunn AR. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell.* 1995. 83 : 301-11.

Hinds MG, Lackmann M, Skea GL, Harrison PJ, Huang DC and Day CL. The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J.* 2003. 22 : 1497-507.

Hinds MG, Norton RS, Vaux DL and Day CL. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol.* 1999. 6 : 648-51.

Hippen KL, Buhl AM, D'Ambrosio D, Nakamura K, Persin C and Cambier JC. Fc gammaRIIB1 inhibition of BCR-mediated phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ mobilization is integrated by CD19 dephosphorylation. *Immunity.* 1997. 7 : 49-58.

Hlaing T, Guo RF, Dilley KA, Loussia JM, Morrish TA, Shi MM, Vincenz C and Ward PA. Molecular cloning and characterization of DEFCAP-L and -S, two isoforms of a novel member of the mammalian Ced-4 family of apoptosis proteins. *J Biol Chem.* 2001. 276 : 9230-8.

Hombach J, Tsubata T, Leclercq L, Stappert H and Reth M. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature.* 1990. 343 : 760-2.

Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K and Yonehara S. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature.* 1999. 398 : 777-85.

Ingham RJ, Santos L, Dang-Lawson M, Holgado-Madruga M, Dudek P, Maroun CR, Wong AJ, Matsuuchi L and Gold MR. The Gab1 docking protein links the B cell antigen receptor to the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and to the SHP2 tyrosine phosphatase. 2001. *J Biol Chem.* 276 : 12257-65.

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J and Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem.* 1999. 274 : 14560-7.

Iritani BM, Forbush KA, Farrar MA and Perlmutter RM. Control of B cell development by Ras-mediated activation of Raf. *EMBO J.* 1997. 16 : 7019-31.

Ito T, Deng X, Carr B and May WS. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem.* 1997. 272 : 11671-673.

Janssens V and Goris J. Protein phosphatase 2A : a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J.* 2001. 353 : 417-39.

Johnson GL and Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002. 298 : 1911-2.

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D and Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95 : 4997-5002.

Kabak S, Skaggs BJ, Gold MR, Affolter M, West KL, Foster MS, Siemasko K, Chan AC, Aebersold R and Clark MR. The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 2002. 22 : 2524-35.

Kamada S, Shimono A, Shinto Y, Tsujimura T, Takahashi T, Noda T, Kitamura Y, Kondoh H and Tsujimoto Y. Bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Res.* 1995. 55 : 354-9.

Kandel ES and Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res.* 1999. 253 : 210-29.

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D and Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol.* 1999. 9 : 601-4.

Katz E, Deehan MR, Seatter S, Lord C, Sturrock RD and Harnett MM. B cell receptor-stimulated mitochondrial phospholipase A2 activation and resultant disruption of mitochondrial membrane potential correlate with the induction of apoptosis in WEHI 231 B cells. *J Immunol.* 2001. 166 : 137-47.

Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, Neubert K, Stein R, Borner C. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol.* 2003. 160 : 53-64.

Keilin D. Cytochrome and intracellular oxidase. *Proc R Soc Lond.* 1930. B 106 : 418-44.

Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972. 26 : 239-57.

Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 2000. 12 : 186-92.

King LB, Norvell A and Monroe JG. Antigen receptor-induced signal transduction imbalances associated with the negative selection of immature B cells. *J Immunol.* 1999. 162 : 2655-62.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, and Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 1995. 14 : 5579-88.

Klaus GG, Choi MS, Lam EW, Johnson-Leger C and Cliff J. CD40: a pivotal receptor in the determination of life/death decisions in B lymphocytes. *Int Rev Immunol.* 1997. 15 : 5-31.

Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT and Ackerman SL. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 2002. 419 : 367-74.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR and Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997. 275 : 1132-6.

Klumpp S and Krieglstein J. Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2002. 2 : 458-62.

Koncz G, Bodor C, Kovesdi D, Gati R and Sarmay G. BCR mediated signal transduction in immature and mature B cells. *Immunol Lett*. 2002. 82 : 41-9.

Konishi Y, Lehtinen M, Donovan N and Bonni A. Cdc2 phosphorylation of BAD links the cell cycle to the cell death machinery. *Mol Cell*. 2002. 9 : 1005-16.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ and Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*. 2000. 7 : 1166-73.

Krappmann D, Patke A, Heissmeyer V and Scheidereit C. B-cell receptor- and phorbol ester-induced NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase activation in B cells requires novel protein kinase C's. *Mol Cell Biol*. 2001. 21 : 6640-50.

Kraus M, Pao LI, Reichlin A, Hu Y, Canono B, Cambier JC, Nussenzweig MC and Rajewsky K. Interference with immunoglobulin (Ig)alpha immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) phosphorylation modulates or blocks B cell development, depending on the availability of an Igbeta cytoplasmic tail. *J Exp Med*. 2001. 194 : 455-69.

Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y and Gelinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2003. 22 : 8961-82.

Kurosaki T. Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol*. 2002. 2 : 354-63.

Lam KP and Rajewsky K. Rapid elimination of mature autoreactive B cells demonstrated by Cre-induced change in B cell antigen receptor specificity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95 : 13171-5.

Lang J, Arnold B, Hammerling G, Harris AW, Korsmeyer S, Russell D, Strasser A and Nemazee D. Enforced Bcl-2 expression inhibits antigen-mediated clonal elimination of peripheral B cells in an antigen dose-dependent manner and promotes receptor editing in autoreactive, immature B cells. *J Exp Med*. 1997. 186 : 1513-22.

Lecoeur H and Gougeon ML. Analyse multiparamétrique de l'apoptose par cytométrie en flux. *Revue française des laboratoires*. 1999. 311 : 80-87.

Levkau B, Garton KJ, Ferri N, Kloke K, Nofer JR, Baba HA, Raines EW and Breithardt G. XIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res*. 2001. 88 : 282-90.

Li HL, Zhu H, Xu CJ and Yuan JY. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998. 94 : 491-501.

Li LY, Luo X and Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001. 412: 95-9.

Lithgow T, van Driel R, Bertram JF and Strasser A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ*. 1994. 5 : 411-7.

Longthorne VL and Williams GT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J*. 1997. 16 : 3805-12.

Los M, Wesselborg S and Schulze-Osthoff K. The role of caspases in development, immunity and apoptotic signal transduction : lessons from knockout mice. *Immunity*. 1999. 10 : 629-39.

Luisiri P, Lee YJ, Eisfelder BJ and Clark MR. Cooperativity and segregation of function within the Ig-alpha/beta heterodimer of the B cell antigen receptor complex. *J Biol Chem.* 1996. 271 : 5158-63.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998. 94 : 481-90.

Ly JD, Grubb DR and Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis.* 2003. 8 : 115-28.

Majeti R, Xu Z, Parslow TG, Olson JL, Daikh DI, Killeen N and Weiss A. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell.* 2000. 103 : 1059-70.

Mapara MY, Bargou R, Zugck C, Dohner H, Ustaoglu F, Jonker RR, Krammer PH and Dorken B. APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *Eur J Immunol.* 1993. 23 : 702-8.

Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, Castedo M, Decaudin D, Susin SA, Masse B and Kroemer G. Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.* 1996. 157 : 4830-6.

Marsden VS and Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol.* 2003. 21 : 71-105.

Marshall AJ, Niuro H, Yun TJ and Clark EA. Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase Cgamma pathway. *Immunol Rev.* 2000.176 : 30-46.

Martinou JC and Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001. 2 : 63-7.

Martinou JC, Desagher S and Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol.* 2000. 2 : E41-3.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC and Kroemer G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*. 1998. 187 : 1261-71.

Masters SC, Yang H, Datta R, Greenberg ME and Fu H. 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol*. 2001. 60 : 1325-1331.

Mate MJ, Ortiz-Lombardia M, Boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, Penninger J, Kroemer G and Alzari PM. The crystal structure of the mouse apoptosis inducing factor AIF. *Nat Struct Biol*. 2002. 9 : 442-6.

May WS, Tyler PG, Ito T, Armstrong DK, Qatsha KA and Davidson NE. Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL-2alpha in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem*. 1994. 269 : 26865-870.

Merino R, Grillot DA, Simonian PL, Muthukkumar S, Fanslow WC, Bondada S and Nunez G. Modulation of anti-IgM induced B cell apoptosis by Bcl-xL and CD40 in WEHI 231 cells. *J Immunol*. 1995. 155 : 3830-38.

Metzstein MM, Stanfield GM and Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *C. Elegans* - past, present and future. *Trends Genet*. 1998. 14 : 410-16.

Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E and Saikumar P. Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem*. 2003. 278 : 5367-76.

Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, and Saikumar P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*. 2001. 276 : 18361-74.

Miller LK. An exegesis of IAPs : salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol*. 1999. 9 : 323-8.

Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, and Thompson CB. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*. 1997. 385 : 353-7.

Mitchell RN, Shaw AC, Weaver YK, Leder P and Abbas AK. Cytoplasmic tail deletion converts membrane immunoglobulin to a phosphatidylinositol-linked form lacking signaling and efficient antigen internalization functions. *J Biol Chem.* 1991. 266 : 8856-60.

Mizuno K, Tagawa Y, Mitomo K, Arimura Y, Hatano N, Katagiri T, Ogimoto M and Yakura H. Src homology region 2 (SH2) domain-containing phosphatase-1 dephosphorylates B cell linker protein/SH2 domain leukocyte protein of 65 kDa and selectively regulates c-Jun NH2-terminal kinase activation in B cells. *J Immunol.* 2000. 165 : 1344-51.

Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL and Fesik SW. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature.* 1996. 381 : 335-41.

Muscarella DE and Bloom SE. Cross-linking of surface of IgM in the Burkitt's lymphoma cell line ST486 cells provides protection against arsenite- and stress- apoptosis that is mediated by ERK and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *J Biol Chem.* 2003. 278 : 4358-67.

Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Sawa H and Loh DY. Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994. 91 : 3700-4.

Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ and Shore GC. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem.* 1993. 268 : 25265-8.

Nicholson DW and Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997. 22 : 299-306.

Nihiro H and Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol.* 2002. 2 : 945-56.

Nisitani S, Tsubata T, Murakami M, Okamoto M and Honjo T. The bcl-2 gene product inhibits clonal deletion of self-reactive B lymphocytes in the periphery but not in the bone marrow. *J Exp Med.* 1993. 178 : 1247-54.

Nitschke L, Floyd H and Crocker PR. New functions for the sialic acid-binding adhesion molecule CD22, a member of the growing family of Siglecs. *Scand J Immunol.* 2001. 53 : 227-34.

Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S and Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem.* 2001. 276 : 4812-8.

Okkenhaug K and Vanhaesebroeck. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. 2003. *Nat Rev Immunol.* 3 : 317-330.

Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993. 74 : 609-19.

Pan Z, Bhat MB, Nieminen AL and Ma J. Synergistic movements of Ca(2+) and Bax in cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem.* 2001. 276 : 32257-63.

Pao LI, Bedzyk WD, Persin C and Cambier JC. Molecular targets of CD45 in B cell antigen receptor signal transduction. *J Immunol.* 1997. 158 : 1116-24.

Pao LI, Famiglietti SJ and Cambier JC. Asymmetrical phosphorylation and function of immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines in B cell antigen receptor signal transduction. *J Immunol.* 1998. 160 : 3305-14.

Pasparakis M, Schmidt-Supprian M and Rajewsky K. IkappaB kinase signaling is essential for maintenance of mature B cells. *J Exp Med.* 2002. 196 : 743-52.

Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL and Marcineviciute A. Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 1999. 274 : 31734-9.

Petrie RJ, Schnetkamp PP, Patel KD, Awasthi-Kalia M and Deans JP. Transient translocation of the B cell receptor and Src homology 2 domain containing inositol phosphatase to lipid rafts : evidence toward a role in calcium regulation. *J Immunol.* 2000. 165 : 1220-27.

Petro JB, Rahman SM, Ballard DW and Khan WN. Bruton's tyrosine kinase is required for activation of IkappaB kinase and nuclear factor kappaB in response to B cell receptor engagement. *J Exp Med.* 2000. 191 : 1745-54.

Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R and Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta.* 1994. 1187 : 255-9.

Petros AM, Olejniczak ET and Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004. 1644 : 83-94.

Pierce SK. Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2002 . 2: 96-105.

Platt N, da Silva RP and Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* 1998. 8 : 365-72.

Pleiman CM, Abrams C, Gauen LT, Bedzyk W, Jongstra J, Shaw AS and Cambier JC. Distinct p53/56lyn and p59fyn domains associate with nonphosphorylated and phosphorylated Ig-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994. 91 : 4268-72.

Porter RR. Structural studies of immunoglobulins. *Science.* 1973. 180 : 713-6.

Puthalakath H and Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 2002. 9 : 505-12.

Puthalakath H, Huang DCS, O'Reilly LA, King SM and Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 1999. 3 : 287-96.

Raff M, Sternberg M and Taylor RB. Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells. *Nature.* 1970. 225 : 553-4.

Reichlin A, Hu Y, Meffre E, Nagaoka H, Gong S, Kraus M, Rajewsky K and Nussenzweig MC. B cell development is arrested at the immature B cell stage in mice carrying a mutation in the cytoplasmic domain of immunoglobulin beta. *J Exp Med.* 2001. 193 : 13-23.

- Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature*. 1989. 338 : 383-4.
- Rosenquist M. 14-3-3 proteins in apoptosis. *Braz J Med Biol Res*. 2003. 36 : 403-8.
- Rossi D and Gaidano G. Molecular heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma: implications for disease management and prognosis. *Hematology*. 2002. 7 : 239-52.
- Rothstein TL, Zhong X, Schram BR, Negm RS, Donohoe TJ, Cabral DS, Foote LC and Schneider TJ. Receptor-specific regulation of B-cell susceptibility to Fas mediated apoptosis and a novel Fas apoptosis inhibitory molecule. *Immunol Rev*. 2000. 176 : 116-33.
- Rottenberg H and Wu S. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochim Biophys Acta*. 1998. 1404 : 393-404.
- Ruiz-Vela A, Gonzalez de Buitrago G and Martinez-A C. Implication of calpain in caspase activation during B cell clonal deletion. *EMBO J*. 1999. 18 : 4988-98.
- Ruvolo PP, Deng X and May WS. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*. 2001. 15 : 515-22.
- Ruvolo PP, Deng X, Carr BK and May WS. A functional role for mitochondria protein kinase C α in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem*. 1998. 273 : 25436-442.
- Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK and May WS. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondria PP2A. *J Biol Chem*. 1999. 274 : 20296-300.
- Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C and Cossarizza A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett*. 1997. 411 : 77-82.
- Sanchez M, Misulovin Z, Burkhardt AL, Mahajan S, Costa T, Franke R, Bolen JB and Nussenzweig M. Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig-alpha and Ig-beta. *J Exp Med*. 1993. 178 : 1049-55.

Sandel PC and Monroe JG. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity*. 1999. 10 : 289-99.

Savopoulos JW, Carter PS, Turconi S, Pettman GR, Karran EH, Gray CW, Ward RV, Jenkins O and Creasy CL. Expression, purification, functional analysis of the human serine protease HtrA2. *Protein Expr Purif*. 2000. 19 : 227-34.

Scaffidi C, Fulda S and Srinivasan A. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*. 1998. 17 : 1675-87.

Schendel SL, Azimov R, Pawlowski K, Godzik A, Kagan BL and Reed JC. Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem*. 1999. 274 : 21932-6.

Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M and Reed JC. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. 94 : 5113-8.

Schinzel A, Kaufmann T and Borner C. Bcl-2 family members : intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Bioch Biophys Acta*. 2004. 1644 : 95-105.

Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T and Korsmeyer SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science*. 2003. 300 : 135-9.

Scott DW. Analysis of B cell tolerance in vitro. *Adv Immunol*. 1993. 54 : 393-425.

Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB and Korsmeyer SJ. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92 : 7834-8.

Shapiro HM. Cell membrane potential analysis. *Methods Cell Biol*. 1994. 41 : 121-33.

Shimizu S, Ide T, Yanagida T and Tsujimoto Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem*. 2000. 275 : 12321-5.

Silke J and Vaux DL. Two kinds of BIR-containing protein - inhibitors of apoptosis, or required for mitosis. *J Cell Sci.* 2001. 114 : 1821-7.

Simons K and Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000. 1 : 31-9.

Slee EA, Adrain C and Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999. 6 : 1067-74 (a).

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR and Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 1999. 144 : 281-92 (b).

Smaili SS, Hsu YT, Carvalho AC, Rosenstock TR, Sharpe JC and Youle RJ. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *raz J Med Biol Res.* 2003. 36 : 183-90.

Sproul TW, Malapati S, Kim J and Pierce SK. Cutting edge : B cell antigen receptor signaling occurs outside lipid rafts in immature B cells. *J Immunol.* 2000. 165 : 6020-3.

Stennicke HR and Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta.* 1998. 1387 : 17-31.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM and Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature.* 1999. 397 : 441-6.

Suzuki H, Matsuda S, Terauchi Y, Fujiwara M, Ohteki T, Asano T, Behrens TW, Kouro T, Takatsu K, Kadowaki T and Koyasu S. PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat Immunol.* 2003. 4 : 280-6.

Suzuki M, Youle RJ and Tjandra N. Structure of Bax : coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell.* 2000. 103 : 645-54.

Takada E, Toyota H, Suzuki J, Mizuguchi J. Prevention of anti-IgM-induced apoptosis accompanying G1 arrest in B lymphoma cells overexpressing dominant-negative mutant form of c-Jun N-terminal kinase 1. *J Immunol*. 2001. 166 : 1641-9.

Takata M, Sabe H, Hata A, Inazu T, Homma Y, Nukada T, Yamamura H and Kurosaki T. Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J*. 1994. 13 : 1341-9.

Tan Y, Demeter MR, Ruan H and Comb MJ. BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-xL interaction and cell survival. *J Biol Chem*. 2000. 275 : 25865-9.

Tognon CE, Kirk HE, Passmore LA, Whitehead IP, Der CJ and Kay RJ. Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol Cell Biol*. 1998. 18 : 6995-7008.

Tonks NK and Neel BG. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell*. 1996. 87 : 365-8.

Torres RM and Hafen K. A negative regulatory role for Ig-alpha during B cell development. *Immunity*. 1999. 11 : 527-36.

Tsubata T. Co-receptors on B lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 1999. 11 : 249-55.

Tsujimoto Y and Shimizu S. Bcl-2 family : life-or-death switch. *FEBS Lett*. 2000. 466 : 6-10.

van Eijk M and de Groot C. Germinal center B cell apoptosis requires both caspase and cathepsin activity. *J Immunol*. 1999. 163 : 2478-82.

van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R and Vandenabeele P. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*. 2001. 8 : 1136-42.

van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W and Vandenabeele P. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*. 2002. 9 : 20-6.

Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT and Thompson CB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell*. 1999. 3 : 159-67.

Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P and Wallach D. Targeted disruption of the mouse Caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 1998. 2 : 267-76.

Vaux DL, Cory S and Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988. 335 : 440-2.

Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR and Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*. 1993. 75 : 229-40.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ and Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000. 102 : 43-53.

Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ and Vaux DL. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem*. 2002. 277 : 445-54.

Vermes I, Haanen C and Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*. 2000. 243 : 167-90.

Wang HG, Pathan N, Etnell IM, Krajweski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF and Reed JC. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of Bad. *Science*. 1999. 284 : 339-343.

Wang LD and Clark MR. B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology*. 2003. 110 : 411-20.

Wang Y, Hasegawa M, Imamura R, Kinoshita T, Kondo C, Konaka K and Suda T. PYNOD, a novel Apaf-1/CED4-like protein is an inhibitor of ASC and caspase-1. *Int Immunol.* 2004. 16 : 777-86.

Wattenberg B and Lithgow T. Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic.* 2001. 2 : 66-71.

Wera S and Hemmings BA. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J.* 1995. 311 : 17-29.

Wolf BB and Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem.* 1999. 274 : 20049-52.

Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH and Sonenshein GE. Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.* 1996. 15 : 4682-90.

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL and Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.* 1984. 142 : 67-77.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980. 284 : 555-6.

Xerri L, Devilard E, bouabdallah R, Hassoun J, Chaperot L, Birg F and Plumas J. Quantitative analysis detects ubiquitous expression of apoptotic regulators in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia.* 1999. 13 : 1548-53.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP and Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997. 275 : 1129-32.

Yankee TM and Clark EA. Signaling through the B cell antigen receptor in developing B cells. *Rev Immunogenet.* 2000. 2 : 185-203.

Yellen AJ, Glenn W, Sukhatme VP, Cao XM and Monroe JG. Signaling through surface IgM in tolerance-susceptible immature murine B lymphocytes. Developmentally regulated differences in transmembrane signaling in splenic B cells from adult and neonatal mice. *J Immunol.* 1991. 146 : 1446-54.

Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001. 2 : 67-71.

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 1996. 183 : 1533-44.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J and Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-X(L). *Cell.* 1996. 87 : 619-28.

Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Pawlowski K, Godzik A and Reed JC. BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000. 97 : 2597-602.

Zhivotovsky B, Hanson KP and Orrenius S. Back to the future : the role of cytochrome c in cell death. *Cell Death Diff.* 1998. 5 : 459-60.

Zhou XM, Liu Y, Payne G, Lutz R and Chittenden T. Growth factors inactivate the cell death promoter BAD phosphorylation of its BH3 domain on Ser 155. *J Biol Chem.* 2000. 275 : 25046-51.

Zoratti M and Szabo I. Electrophysiology of the inner mitochondriale membrane. *J Bioenerg Biomembr.* 1994. 26 : 543-53.

Zou H, Henzel WJ, Liu XS, Lutschg A and Wang XD. Apaf-1, a human protein homologous to C. Elegans Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 1997. 90 : 405-13.

Zuliani T, Duval R, Jayat C, Schnebert S, André P, Dumas M and Ratinaud MH. Sensitive and reliable JC-1 and TOTO-3 double staining to assess mitochondrial transmembrane potential and plasma membrane integrity : interest for cell death investigations. 2003. *Cytometry*. 54A : 100-8.

ANNEXES

ANNEXE 1

Bcl-2 protein phosphorylation/dephosphorylation and apoptosis induced by B cell antigen receptor ligation.

Emilie Malissein, Mireille Verdier, Marie-Hélène Ratinaud et Danielle Troutaud.

S.G. Pandalai (Ed), Recent Research Developments in Immunology, vol 4 (2002) Part II. Research signpost, Trivandrum pp.669-688.

ANNEXE 2

POSTER 1 : 8^{ème} congrès annuel de l'AFC, Bordeaux (Octobre 2002)

Cell cycle analysis and synchronisation can improve IgM-mediated apoptosis in the WEHI 231 B cell line.

E.Malissein, M.Verdier, M.H.Ratinaud and D.Troutaud.

Laboratoire de Physiologie moléculaire mitochondriale et immunitaire. UMR CNRS 6101. Faculté de Médecine, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges cedex.

ABSTRACT Cross-linking of BCR results in G1 cell cycle arrest and apoptosis immature B cell line (WEHI 231). However in almost cases the proportion of cells undergoing apoptosis increased after 24h to 72h and molecular mechanisms that ultimately mediate apoptosis in response to BCR stimulation are not clear.

Preliminary studies were performed on exponentially growing cells obtained after a primary culture at 10^5 cells/ml for 48h. Apoptosis was allowed toward the translocation of phosphatidylserine to the outer plasma membrane (Annexin-V-FITC) and the disruption of the mitochondrial transmembrane potential (DiOC₆(3)). Results showed that ligation of the surface IgM receptors on proliferating WEHI-231 cells causes cell cycle arrest and apoptosis from 24h poststimulation with anti-IgM. However, only about 10% of cells were induced in apoptosis at this time of the kinetic. Analysis of the cell cycle distribution at the beginning of the stimulation revealed that cells were desynchronised.

In other B cells, it has been demonstrated that sensitivity toward BCR to apoptosis was relied to their cycling status. In our case, we should want to obtain a "preculture" with an important enrichment of cells in G0/G1 phase, and without using chemical treatment. To adress this issue, a "physiological cell cycle synchronization" was tested for its capacity to improve apoptosis efficacy. WEHI-231 cells were maintained in culture at different cell density (1 to 8.10^4 cells/ml). Evaluation of the cell cycle phases were performed along a kinetic study and conditions which induced all cells to accumulate in G0/G1 phase whithout provoking death were selected. Synchronisation was then studied by monitoring the progression through the cell cycle. Data showed that highly ($\geq 80\%$) enriched cell populations in G0-G1 was achieved after 5 days of culture at 8.10^4 cells/ml ; furthermore, most cells progressed through the different cycle phases when they were further incubated in fresh medium. The same BCR induced apoptosis was then also studied on these G0/G1 enriched cell populations. In this later case, cell death could be detected earlier since about 20% of apoptotic cells were obtained 8h after induction. Furthermore, this IgM-mediating killing response was confirmed by a higher level of apoptosis observed at 24h poststimulation (about 30%).

Thus, the "physiological" cell cycle synchronisation described here would be useful to improve the apoptosis response in other cell lines avoiding the use of chemical treatment with its inherent toxic effect

Cell cycle analysis and synchronisation can improve IgM-mediated apoptosis in the WEHI 231 B cell line.

E. Malissein, M. Verdier, M.H. Ratinaud and D. Troutaud.

Laboratoire de Physiologie moléculaire mitochondriale et immunitaire. UMR CNRS 6101.
Faculté de Médecine, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges cedex.

INTRODUCTION Cross-linking of BCR in WEHI 231 (murine B lymphoma cell line) results in G1 cell cycle arrest and apoptosis. However in almost cases the proportion of cells undergoing apoptosis increased after 24h to 72h and mechanisms that ultimately mediate apoptosis in response to BCR stimulation are not clear. Preliminary studies were performed on exponentially growing cells obtained after a primary culture at 10^5 cells/ml for 48h. Results showed that ligation of the surface IgM receptors on proliferating WEHI-231 cells causes cell cycle arrest and apoptosis which was detected from 24h poststimulation with anti-IgM. However, only about 10% of cells were induced in apoptosis at this time of the kinetic. Furthermore, analysis of the cell cycle distribution at the beginning of the stimulation revealed that cells were desynchronised. To improve these results, we tried to obtain a "preculture" with an important enrichment of cells in G0/G1 phase without using chemical treatment. Finally, this "physiological cell cycle synchronization" was tested for its capacity to enhance apoptosis efficacy.

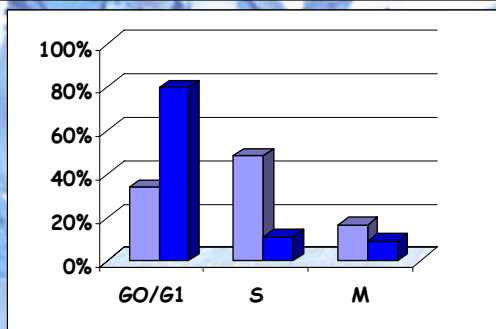


Figure 1. Cell cycle analysis. WEHI 231 were maintained in culture at different cell density : compared to 10^5 cell/ml \square during 2 days 8.10^4 cell/ml during 5 days \blacksquare .

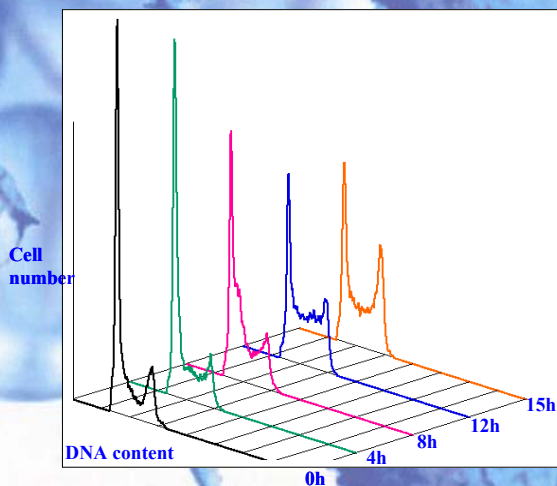


Figure 2. Progression of cells in the different cycling phase, after synchronisation. Similar results were obtained in 3 independents experiments.

MATERIAL AND METHODS

-Cell cycle analysis :

After washing twice with PBS, cell pellets were resuspended in 300 μ l of PBS, fixed in 700 μ l 70% ethanol and stored at -20°C until analysis. Then, they were washed twice in PBS followed by incubation for 20 min in 1 ml of PBS containing 10 mg/ml RNase at room temperature. Propidium iodide (IP) was added just before analysis.

-Assesment of apoptosis induced by anti-IgM :

\bullet 5.10^5 cell were incubated for 40 min at 37°C with $\text{DiOC}_2(3)$ and apoptotic cells were identified by their decreased $\Delta\Psi\text{m}$ ($\text{DiOC}_2(3)^{\text{low}}$), in presence of IP.

\bullet 10^5 cells were stained with Annexin V-FITC according to the manufacturer's protocol. Before cytometer analysis, IP was added to distinguish apoptotic cells (Annexin⁺/IP⁻) and necrotic cells (Annexin⁺/IP⁺).

- Beckman Coulter flow cytometer (Fullerton, CA).

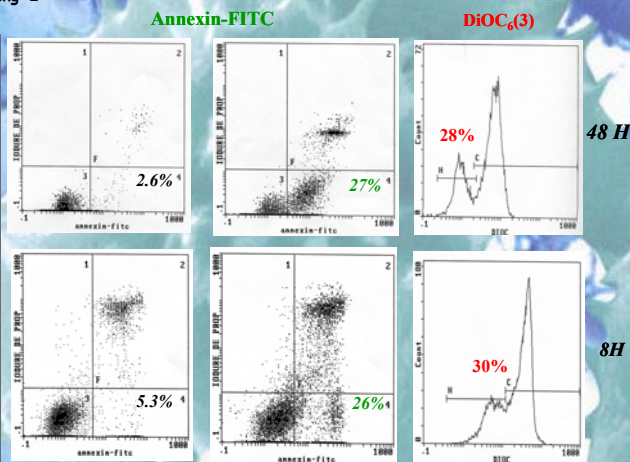


Figure 3. Cell death induced by cross-linking of the BCR.. WEHI 231 were maintained in culture with $10\ \mu\text{g/ml}$ anti-IgM during 48h after 2 days of culture at 10^5 cell/ml or with $1\ \mu\text{g/ml}$ during 8h after 5 days of culture at 8.10^4 cell/ml. Pourcentage of apoptosis was determined after Annexin V-FITC staining and $\text{DiOC}_2(3)$ incorporation.

RESULTS/CONCLUSION

WEHI-231 cells were maintained in culture at different cell density (1 to 8.10^4 cells/ml). Evaluation of the cell cycle phases were performed along a kinetic study and conditions which induced all cells to accumulate in G0/G1 phase without provoking death were selected. Synchronisation was then studied by monitoring the progression through the cell cycle. Data showed (Fig 1) that highly ($\geq 80\%$) enriched cell populations in G0-G1 was achieved after 5 days of culture at 8.10^4 cells/ml ; furthermore, most cells progressed through the different cycle phases when they were further incubated in fresh medium (Fig 2). The same BCR induced apoptosis was then also studied on these G0/G1 enriched cell populations. In this later case, cell death could be detected earlier since about 30% of apoptotic cells were obtained 8h after induction (Fig 3).

\Rightarrow Thus, the "physiological" cell cycle synchronisation described here would be useful to improve the apoptosis response in other cell lines avoiding the use of chemical treatment with its inherent toxic effects.

ANNEXE 3

POSTER 2 : Congrès de la FEBS “Meeting on signal transduction”, Bruxelles (Juillet 2003)

Bad phosphorylation signaling pathways are implied in the B cell antigen receptor-induced apoptosis of WEHI-231 B cells.

E.Malissein, M.Verdier, M.H.Ratinaud and D.Troutaud.

Laboratoire de Physiologie moléculaire mitochondriale et immunitaire. UMR CNRS 6101. Faculté de Médecine, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges cedex.

ABSTRACT Signaling through the B cell antigen receptor (BCR) is a key determinant in the regulation of B cell physiology. Depending on additional factors, such as microenvironment and developmental stage, ligation of the BCR can trigger B lymphocyte activation, proliferation, or apoptosis. The regulatory mechanisms determining B cell apoptosis and survival are not completely known.

Using the murine B lymphoma cell line WEHI-231 as a model system, we investigated the role of the phosphorylation of Bad, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, in the anti-IgM mediated apoptosis. For the apoptotic analysis, we focused on the mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) collapse which was reported as a rate-limiting step in the BCR-induced cell death of immature B lymphocytes.

Serine phosphorylation of Bad was found in WEHI 231 cell control cultures and its hypophosphorylation correlates with appearance of apoptosis when cross-linking the surface IgM. Furthermore, treatment of cells with specific inhibitors of protein kinases known to be involved in serine phosphorylation of Bad (LY294002 for the PI3K and H-89 for the PKA) mimics or enhances BCR-induced cell death. Collectively, results strongly suggest that regulation of Bad phosphorylation plays an active role in mediating anti-IgM-induced apoptosis of WEHI-231 B cells.

Bad phosphorylation signaling pathways are implied in the B cell antigen receptor-induced apoptosis of WEHI-231 B cells

E. Malissein, M. Verdier, M.H. Ratinaud and D. Troutaud.

Laboratoire de Physiologie moléculaire mitochondriale et immunitaire. UMR CNRS 6101.
Faculté de Médecine, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges cedex.

INTRODUCTION

Signaling through the B cell antigen receptor (BCR) is a key determinant in the regulation of B cell physiology. Depending on additional factors, such as microenvironment and developmental stage, ligation of the BCR can trigger B lymphocyte activation, proliferation, or apoptosis. The regulatory mechanisms determining B cell apoptosis and survival are not completely known. Recent data emphasized that Bad (a member of the Bcl-2 family) phosphorylation status which inhibits its pro-apoptotic role, is necessary to lymphocyte survival. Using the murine immature B cell line WEHI-231 as a model system, we investigated the role of the phosphorylation of Bad in the anti-IgM-induced apoptosis. Indeed, we postulated that balance between phosphorylated and unphosphorylated Bad could be implied in the BCR signaling-induced cell fate (see fig.1)

MATERIAL AND METHODS

Induction of apoptosis:

For anti-IgM induced cell death experiments, enriched WEHI-231 in G0/G1 phase were cultured (2.5×10^5 cells/ml) with $1 \mu\text{g/ml}$ of F(ab)₂ goat anti-mouse IgM during 8h or 24h. Cells were pretreated (30 min) or cotreated with or without signaling inhibitors: PI3K inhibitor, LY294002 ($10 \mu\text{M}$) and PKA inhibitor, H-89 ($10 \mu\text{M}$).

Assessment of apoptosis induced by anti-IgM:

5×10^5 cells were incubated for 40 min at 37°C with DiOC₃(3) (2nM) and apoptotic cells were identified by their decreased $\Delta\Psi\text{m}$ (DiOC₃(3)^{low}), in presence of IP.

10^5 cells were stained with Annexin according to the manufacturer's protocol. Before cytometer analysis, IP was added to distinguish apoptotic cells (Annexin/IP) and necrotic cells (Annexin/IP⁻).

FACSscan flow cytometer

Immunoprecipitation and Western blotting:

Lysates ($130 \mu\text{g}$ of proteins) were immunoprecipitated with anti-Bad ($4 \mu\text{g}$) overnight at 4°C and protein A-sepharose was added for 3h at 4°C . Immunoprecipitates were separated on a 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Nonspecific binding sites of the membrane were blocked with 1% blocking agent of kit ECL in TBS for 1h at room temperature and incubated for 3h with primary antibody. After washes with 0.1% Tween-20 in TBS, membranes were incubated for 1h with peroxidase-conjugated secondary antibody. Protein detection was performed with the ECL system according to the manufacturer's protocole using the Kodak ID image analysis software.

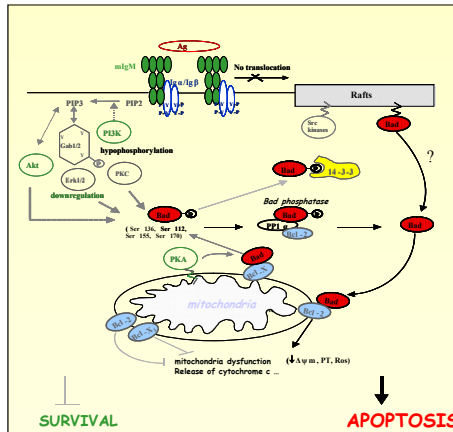


Fig1. How altered BCR-signaling kinase pathways in immature B lymphocytes may affect Bad phosphorylation and thus influence B cell fate ?

After BCR cross-linking, differential activation of PI3K/Akt, PKC and Erk1/2 may define the molecular basis of the differential responses following BCR engagement: proliferation (mature B lymphocyte) and apoptosis (immature B lymphocyte).

Indeed, a lack of sustained activation of these kinases in immature B cells has been correlated with commitment cell to apoptosis. Moreover, it is noteworthy that these kinases (especially PI3K, PKA) are involved to different degrees in the regulation of Bad phosphorylation. Collectively, these results lead us to hypothesize that an altered regulation of Bad phosphorylation/dephosphorylation in immature B cells could link BCR-signaling pathways and mitochondrial dysfunction, thus committing cells to apoptosis.

E. Malissein et al, 2003 (Review in press)

RESULTS

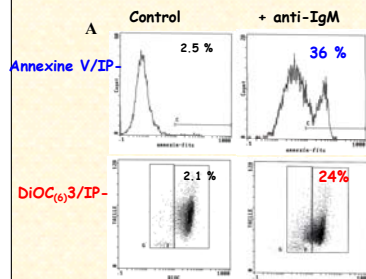
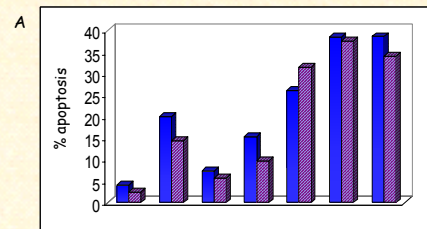


Fig. 2. Effect of BCR ligation on the Bad phosphorylation status of WEHI-231 immature B cells.

(A) Cells were incubated with anti-IgM ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24 h. Apoptosis was analyzed using fluorescence flow cytometric methods. Regions C and G corresponds to Annexin V⁺/PI⁻ and DiOC₃(3)^{low}/PI⁻ apoptotic cells. For each sample, the percentage is superimposed.



(B) Cell lysates from 0, 8 and 24 h after anti-IgM stimulation were immunoprecipitated with anti-Bad antibody, transferred to nitrocellulose and blotted with phospho-Bad Ser112, Ser136, Ser155 or anti-Bad antibody, the latter as internal control. Protein bands were detected using ECL. Results are representative of three independent experiments.



Anti-IgM ($\mu\text{g/ml}$)
H89 ($10 \mu\text{M}$)
LY294002 ($10 \mu\text{M}$)

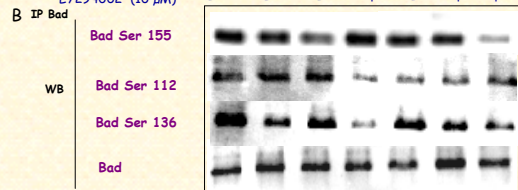


Fig. 3. PI3K and PKA inhibitors mimic BCR-mediated apoptosis. Cells were incubated with anti-IgM ($1 \mu\text{g/ml}$) with or without LY294002 ($10 \mu\text{M}$) and H-89 ($10 \mu\text{M}$) during 8h.

(A) Percentages of apoptotic cells were determined by the annexin V assay (■ Annexin V⁺/PI⁻ cells) and the $\Delta\Psi\text{m}$ collapse (■ DiOC₃(3)^{low}/PI⁻ cells). Data are presented as means from three independent experiments.

(B) Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Bad antibody, transferred to nitrocellulose and blotted with phospho-Bad Ser136, Ser112, Ser155 and anti-Bad antibody. Protein bands were detected using ECL. Results are representative of three independent experiments.

DISCUSSION/CONCLUSION

Using the murine B lymphoma cell line WEHI-231, we investigated the role of the phosphorylation of Bad in the anti-IgM mediated apoptosis. Bad phosphorylation at serine 112, 136 and 155 was found in WEHI-231 cell control cultures and its hypophosphorylation on the three sites correlates with appearance of apoptosis when cross-linking the surface IgM. Furthermore, inhibition of PK involved in serine phosphorylation of Bad effectively blocked the phosphorylation on critical sites (serine136 and 155 for PI3K and PKA respectively) in association with cell death apoptosis. This effect was most pronounced for the PI3K pathway inhibition and additive responses were observed when inhibitors were combined with anti-IgM. (Fig.3)

Collectively, these results strongly suggest that regulation of Bad phosphorylation may play an active role in mediating anti-IgM-induced apoptosis of immature B cells. (E. Malissein et al. Changes in Bad phosphorylation are correlated with BCR-induced apoptosis of WEHI-231 immature B cells. Accepted in Biochimie)

ANNEXE 4

POSTER 3: 12^{ème} Congrès International d'Immunologie – 4^{ème} Conférence Annuelle de la FOCIS, Montréal (Juillet 2004)

Subcellular redistribution of Bad : a dynamic process in BCR-induced apoptosis of immature B cells.

E.Malissein, M.Verdier, M.H.Ratinaud and D.Troutaud.

Laboratoire de Physiologie moléculaire mitochondriale et immunitaire. UMR CNRS 6101. Faculté de Médecine, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges cedex.

ABSTRACT Signaling through the B cell antigen receptor (BCR) is a key determinant in the regulation of B cell physiology. The regulatory mechanisms determining rather apoptosis in immature B lymphocytes or survival in mature B cells are not completely known. Using the murine immature B lymphoma cell line WEHI-231 as a model system, we focus in the laboratory on the role of Bad, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, in the BCR-induced apoptotic response. Several post-translational modifications, among with reversible phosphorylation/dephosphorylation by kinases and phosphatases, determine active/inactive conformations of both anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family proteins. It has been shown that serine phosphorylation of Bad blocks its pro-apoptotic activity by inhibition of its interaction with anti-apoptotic Bcl-2 family members. In addition, recent works strongly suggest that dynamic subcellular redistribution of Bad from sequestration compartments (like lipid rafts) to mitochondria may be a new mechanism of apoptosis control.

We have demonstrated, in previous studies, that down-regulation of Bad phosphorylation was correlated with WEHI-231 B cells commitment to apoptosis following anti-IgM stimulation. In the present work, we analyzed by confocal microscopy, western blotting and cellular fractionation, the dynamic intracellular traffic of Bad, in correlation with its phosphorylation status, following BCR stimulation. We focussed, in particular, on Bad dynamic interaction with 14-3-3 protein in cytosol, lipid rafts and with mitochondria. Furthermore, phosphatase activation may be implied in the decrease of Bad phosphorylation observed in our model following BCR engagement. So, we also evaluated in WEHI-231 the significance of the hypothetical trimolecular complex “Bad phosphatase” recently proposed by Garcia and coll. in which Bcl-2 protein targets PP1 α to its substrate, Bad. Our preliminary results show that subcellular re-localization of Bad may be involved in the BCR-induced apoptosis of WEHI-231 cells. Moreover, we show by reciprocal co-immunoprecipitation experiments that PP1 interacts with Bcl-2 and Bad, suggesting that PP1 may regulate Bcl-2/Bad phosphorylation status in WEHI-231 B cells and consequently cell survival.

Finally, the functional relevance of the balance between kinase and phosphatase activity involving in the regulation of Bad phosphorylation will be discussed in the context of BCR-mediated cell fate.



SUBCELLULAR REDISTRIBUTION OF BAD : A DYNAMIC PROCESS IN BCR-INDUCED APOPTOSIS OF IMMATURE B CELLS.

Emilie Malissein, Mireille Verdier, Claire Carrion, Marie-Hélène Ratinaud and Danielle Troutaud.
Laboratoire de « Physiologie Moléculaire Mitochondriale & Immunitaire » UMR CNRS 6101, Faculté de Médecine,
2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cédex, France.



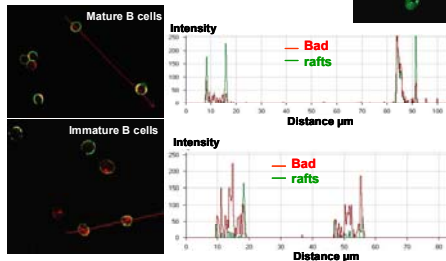
ABSTRACT We have recently reported that BCR-induced apoptosis of WEHI-231 B cells was correlated with Bad phosphorylation. These data were reproduced by using inhibitors of kinases known to be implied in Bad phosphorylation events, suggesting a down-regulation of this process [1]. In this study, as phosphatase activation may be implied in Bad dephosphorylation following BCR engagement, we evaluated the significance of the hypothetical "Bad phosphatase" recently proposed by Garcia *et al.* [2]. Furthermore we also analyzed the dynamic intracellular traffic of Bad following BCR stimulation. We focused, in particular, on Bad interaction with 14-3-3 protein in cytosol, its localization in lipid rafts and translocation to mitochondria. Our preliminary results show that subcellular re-localization of Bad may be involved in the BCR-induced apoptosis of immature B cells. Moreover, reciprocal co-immunoprecipitation experiments revealed that PP1 α could interact with Bcl-2 and Bad in WEHI-231 B cells; this result suggests that PP1 α may regulate Bcl-2/Bad phosphorylation status and consequently B cell survival.

INTRODUCTION Signaling through the B cell antigen receptor (BCR) is a key determinant in the regulation of B cell physiology. The regulatory mechanisms determining rather apoptosis in immature B lymphocytes or survival in mature B cells are not completely known. Several post-translational modifications, among with reversible phosphorylation/dephosphorylation by kinases and phosphatases, determine active/inactive conformations of both anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family proteins [3]. Serine phosphorylation of Bad, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks its apoptotic activity by inhibition of its interaction with anti-apoptotic Bcl-2 family members. In addition, recent works strongly suggest that dynamic subcellular redistribution of Bad from sequestration compartments (like lipid rafts) to mitochondria may be a new mechanism of apoptosis control [4]. Using the murine immature B lymphoma cell line WEHI-231 as a model system, we focus in the laboratory on the role of Bad, in the BCR-induced apoptotic response.

METHODS
Cell culture and analysis of apoptosis: WEHI-231 B cells were cultured with 1 μ g/ml of F(ab)₂ goat anti-mouse IgM during 8h or 24h. Apoptosis was detected by FACScan: (i) translocation of PS on the cell surface (double staining Annexin-V-FITC/PI assay) (ii) disruption of the mitochondrial transmembrane potential (Δ Psi) (incorporation of the dye DiOC₂(3)).
Immunoprecipitation and Western blotting: Lysates were immunoprecipitated with the appropriate Ab and protein A/G agarose was added. Immunoprecipitates were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose, blocked and incubated with primary Ab. After washes, membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary Ab. Protein detection was performed using the ECL system.
Confocal microscopy: Cells stimulated with anti-IgM on raft were incubated with CTX-FITC (5 μ g/ml), then fixed and permeabilized. After washes, cells were incubated with primary Ab (anti-Bad Ab or anti-Tom 20 Ab: 1.5 μ g) washed, and then incubated with Alexa Fluor conjugated secondary Ab. Finally, after several washing steps, cells were mounted and analyzed immediately.
Lymphocyte preparation and B cell purification: Lymphocyte suspensions were obtained from spleen BALB/c mice using Ficolil treatment and resuspended in RPMI 1640 medium. Then splenic cell suspensions were enriched in mature B cells by positive selection after MACS separation using MACS anti-CD19 MicroBeads. Similarly, bone marrow (BM) cell suspensions were prepared from femurs and tibia in RPMI 1640 medium. Then, the BM suspension was enriched in immature B cells by (i) negative selection after cell labeling with anti-Ig μ -FITC and anti-CD25-FITC and cell depletion (mature and pre-B cells) with MACS anti-FITC MicroBeads (ii) positive selection after MACS separation with MACS anti-CD19 MicroBeads. Efficiency of B cell magnetic purification was evaluated by FACScan after staining the cells with anti-CD45R/B220-Cy-Chrome (>90%).

Fig 4. Colocalization of Bad/Raft in murine ex-vivo mature and immature B lymphocytes.

Overlay confocal sections of freshly enriched splenic mature and BM immature B cells stained with CTX-FITC and anti-Bad Ab are shown. The profile of green (raft) and red fluorescence (Bad) colocalization in the surface of cell membranes was analyzed using quantification software (Leica).



RESULTS In this study, we tested, in BCR-induced apoptosis, the contribution of the "Bad phosphatase" model proposed by Garcia *et al.* where holoenzyme Bcl-2-PP1 α can be targeted to Bad. To form a trimolecular complex under survival conditions. Reciprocal co-immunoprecipitation experiments showed the association of Bcl-2/PP1 α /Bad in B cell lysates. Furthermore, the number of trimolecular complexes decreases throughout the BCR-induced apoptotic response (revealed by FACScan analysis, ~25 % of apoptotic cells at 24h, data not shown) without modification of total expression of the proteins of the complex (Fig.1). The subcellular redistribution of Bad during BCR-induced apoptosis has been also studied using coimmunoprecipitation experiments and confocal microscopy analysis. Data demonstrated that BCR-induced apoptosis of WEHI-231 cells is correlated with: (i) a strongly reduced association of Bad to 14-3-3 protein 24h post BCR stimulation (Fig.2) and (ii) a translocation of Bad to mitochondria (Fig.3, right). Since lipid rafts have been recently reported as a new intracellular compartment of Bad sequestration leading to its inactivation in T cell lines, we have explored this possibility in B cells. Using the raft marker CTX B subunit (CTX-FITC) we didn't observed the association of Bad with lipid rafts in WEHI-231 cells; however as expected, a disorganization of rafts was associated with BCR-induced apoptosis (Fig.3, left). Interestingly, Bad was found colocalized with lipid rafts in freshly murine mature B cells isolated from the spleen, whereas this association was strongly decreased in freshly enriched bone marrow immature B cells suspensions (Fig.4).

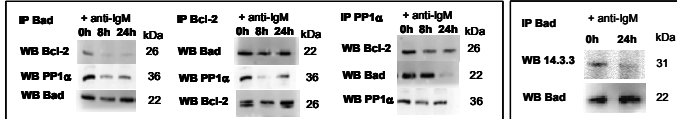
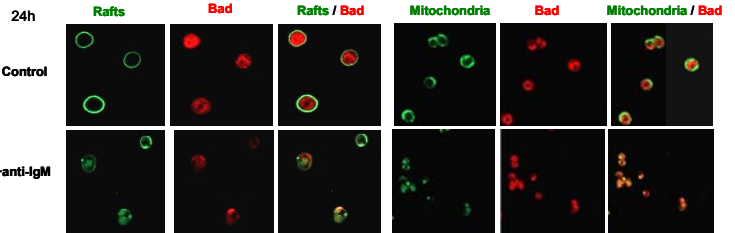


Fig 2. Effect of BCR stimulation on the association of Bad to the 14.3.3 protein. Lysates from 0 and 24 h anti-IgM stimulated cells were immunoprecipitated with anti-Bad Ab and blotted with an anti-14.3.3 Ab. Similar results were obtained in three independent experiments.

Fig 1. Association of Bcl-2 to Bad and PP1 α in WEHI-231 B cells. Cell lysates from 0, 8 and 24h after anti-IgM stimulation were immunoprecipitated with anti-Bad or anti-Bcl-2 or anti-PP1 α antibody and blotted with anti-Bad, anti-Bcl-2 and anti-PP1 α . Similar results were obtained in three independent experiments.

Fig 3. Raft and mitochondrial localization of Bad in BCR-stimulated WEHI-231 cells.

Immature B cells were cultured for 24 h with or without anti-IgM. Then cells were stained with anti-Bad (red fluorescence) and CTX-FITC or anti-Tom20 for raft and mitochondria respectively (green fluorescence) followed by Alexa-Fluor labeled secondary Abs. Similar confocal sections were obtained in three independent experiments.



CONCLUSION Collectively, these results suggest that post-translational modifications of Bad (phosphorylation/dephosphorylation, intracellular traffic) are associated with BCR-induced apoptosis of immature B cells. Moreover, the Bad-phosphatase concept proposed by Garcia *et al.* may be implied in these regulations, suggesting that phosphatase activation as well as down regulation of Bad Kinases activity would influence the apoptotic response. Finally differences in cellular Bad sequestration between immature and mature B lymphocytes, notably in lipid rafts, may contribute to the *in vivo* differential susceptibility to apoptosis, and thus to BCR qualitatively distinct outcomes.

This work was supported by a Regional (Conseil Régional du Limousin) and European grant.
1- Malissein E *et al.*, *Biochimie*, 2003.
2- Garcia A *et al.*, *Biochimie*, 2003.
3- Klump S *et al.*, *Curr Opin Pharmacol*, 2002.
4- Aylton V *et al.*, *J Immunol*, 2002.