

## L-DNase II : un nouveau maillon dans les voies de l'apoptose

Alicia Torriglia, Paolo Perani, Yves Courtois

*Il est actuellement admis que l'induction de l'apoptose est suivie par la libération d'éléments mitochondriaux, l'activation de protéases et d'endonucléases. Dans ce processus, l'activation des protéases, et en particulier des caspases, est considérée comme l'étape décisive.*

*L'activation des endonucléases est conçue comme une étape finale de dégradation de l'ADN devenu accessible. Or, dans l'apoptose des neurones rétiniens, induite pendant le développement embryonnaire, et dans la différenciation terminale des cellules fibres du cristallin, nous avons décrit l'augmentation de l'activité d'une DNase de type II comme étant une étape critique. L'étude moléculaire de cette enzyme, présente dans de nombreux*

*tissus, a montré qu'elle est synthétisée sous la forme d'une protéine de la famille des serpines, la leukocyte elastase inhibitor (LEI), qui a une activité anti-protéase. Lors de l'activation de l'apoptose, la LEI se transforme, par modification post-traductionnelle en L-DNase II, une protéine sans activité antiprotéase mais avec une activité endonucléase. Il est donc possible que, lors du déclenchement de l'apoptose, cette voie LEI-L-DNase II agisse comme un switch qui entraîne, à la fois l'activation des endonucléases par apparition dans la cellule de la L-DNase II et l'activation des protéases par libération de leur inhibition. Dans ce cas, l'événement décisif serait situé à ce niveau et non au niveau des caspases.*

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un phénomène qui permet l'élimination de cellules d'un tissu de façon sélective. Elle intervient dans les processus physiologiques, comme le développement embryonnaire, et pathologiques, notamment dans les maladies dégénératives et auto-immunes, dans le SIDA et le cancer (*m/s* 1996, n° 12, p. 1452) [1].

Les études génétiques effectuées chez le nématode *Caenorhabditis elegans* [2] ont montré l'existence de gènes spécifiques qui interviennent dans l'activation et l'inhibition du processus d'apoptose. Chez les mammifères, la situation est plus complexe, dans la mesure où ces gènes sont représentés par des familles de molécules [3, 4] (*m/s* 1997, n° 5, p. 378). Du point de vue biochimique, l'apoptose est constituée de

trois étapes [5] : une étape d'induction, une étape d'exécution et de contrôle, et une étape de dégradation [3]. Ces dernières années, l'attention des chercheurs a été dirigée essentiellement sur la deuxième étape. En particulier, l'activation des caspases a été très étudiée (*m/s* 1996, n° 11, p. 1263). Malgré le rôle essentiel actuellement attribué aux caspases, la participation d'autres protéases au processus d'apoptose a aussi été montrée. Ainsi, la serpine protéase nexine I, un inhibiteur de protéases à sérine, protège les neurones de la mort après axotomie [6]. D'autres inhibiteurs de protéases à sérine comme le TPCK (N-tosyl-L-phénylalanine-chlorométhylkétone) inhibent l'apoptose dans différents modèles cellulaires [7, 8]. Une protéase de sérine de 24 kDa, purifiée à partir des cellules U937 en apoptose,

induit la fragmentation de l'ADN dans les noyaux purifiés [9, 10]. Cette enzyme est activée par la caspase 3 [8]. Finalement, la granzyme B, une enzyme essentielle pour que le lymphocyte T cytotoxique induise l'apoptose dans sa cellule cible, dans laquelle elle active la caspase 3, est aussi une sérine protéase [12]. La position respective de ces différentes protéases dans les voies générales de l'apoptose n'a pas été établie.

### L'activation des endonucléases

La dégénérescence des noyaux pendant l'apoptose est apparue longtemps comme un élément essentiel de l'apoptose. Son importance a été maintenant relativisée et même dénigrée par certains auteurs [13]. Malgré cela, la dégradation de l'ADN conti-

nue d'être un élément de référence pour l'identification des cellules en apoptose. Du point de vue moléculaire, il y a clivage de l'ADN en fragments de haut poids moléculaire (300 et 50 kb) [14], suivi de l'apparition des oligonucléosomes [15].

La dégradation de l'ADN est réalisée par des endonucléases. On en connaît actuellement trois types: celles de type DNase I, actives en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Mg}^{2+}$  à pH neutre, celles de type DNase II, actives à pH acide en l'absence de cations et celles dépendantes uniquement d'un seul cation, dont le groupe le plus important est celui des DNases dépendantes du  $\text{Mg}^{2+}$ . Certains auteurs soutiennent que, parmi ces différentes enzymes, la DNase I est l'enzyme responsable de la digestion du génome pendant l'apoptose [16], tandis que d'autres affirment qu'il s'agit de la DNase II [17], ou bien d'une nouvelle DNase, appelée NUC 18, dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$  [18] ou alors d'autres DNases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$  [19] ou dépendantes du  $\text{Mg}^{2+}$  [20].

La liaison entre l'activation des protéases et des endonucléases est restée

longtemps obscure. En 1997, la première liaison entre endonucléases et caspases a été proposée avec la découverte du DFF (*DNA fragmentation factor*), une molécule activée par la caspase 3 (*m/s* 1997, n° 8/9, p. 1076) [21]. Plus récemment, la découverte de deux nucléases activées par la caspase 3 a permis d'établir une relation directe entre caspases et endonucléase. Il s'agit de CAD (*caspase activated DNase*) [22] et de CPAN (*caspase activated nuclease*) [23].

Dans tous ces modèles, l'activation des endonucléases est une conséquence de l'activation des protéases pendant l'apoptose.

### Les endonucléases activées pendant la différenciation terminale du cristallin et de la rétine

La différenciation terminale des cellules du cristallin entraîne la disparition des noyaux de ces cellules, de façon analogue à celle des noyaux des cellules en apoptose [24]. Cette disparition des noyaux est synchronisée au

niveau des différentes couches cellulaires et le gradient de dégradation progresse des fibres périphériques vers les fibres centrales (*figure 1*).

Nous avons examiné le type de coupure trouvé dans l'ADN. À cet effet, nous avons utilisé une réaction de *nick translation* [25] et la technique TUNEL [26]. Les résultats obtenus indiquent que les coupures simple brin et double brin s'accumulent sur l'ADN mais elles n'engendrent pas des extrémités 3'OH libres. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à l'action de la DNase II, une enzyme qui libère des extrémités 3' phosphate [27].

À l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre la DNase II, nous avons montré que cette enzyme présente une localisation cytoplasmique dans les cellules épithéliales qui conservent leur noyau, mais qu'elle se concentre dans les noyaux des cellules fibres qu'elles détruisent. De plus, seul l'anticorps anti-DNase II est capable d'inhiber la dégradation de l'ADN des cellules fibres *in vitro* [28]. Nous avons aussi constaté une activation de la DNase II lors du développement embryonnaire de la rétine du poulet au cours duquel 50 % des neurones meurent par apoptose [29].

### Les caractéristiques moléculaires de la DNase II (L-DNase II)

Le rôle primordial joué par la DNase II dans ces différents processus nous a conduits à nous intéresser à sa structure moléculaire. C'est ainsi que nous avons entrepris le clonage, l'analyse de l'expression du gène qui code pour cette enzyme, et l'étude de ses propriétés [28].

La DNase II a été séquencée dans l'extrémité amino-terminale et soumise à une protéolyse limitée, suivie de séparation des peptides obtenus par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) et séquençage. La recherche des similitudes des séquences obtenues avec celles contenues dans les banques de données montre 100 % d'identité avec l'inhibiteur d'élastase des leucocytes (LEI). Il s'agit d'une protéine de 42 kDa qui appartient à la famille des

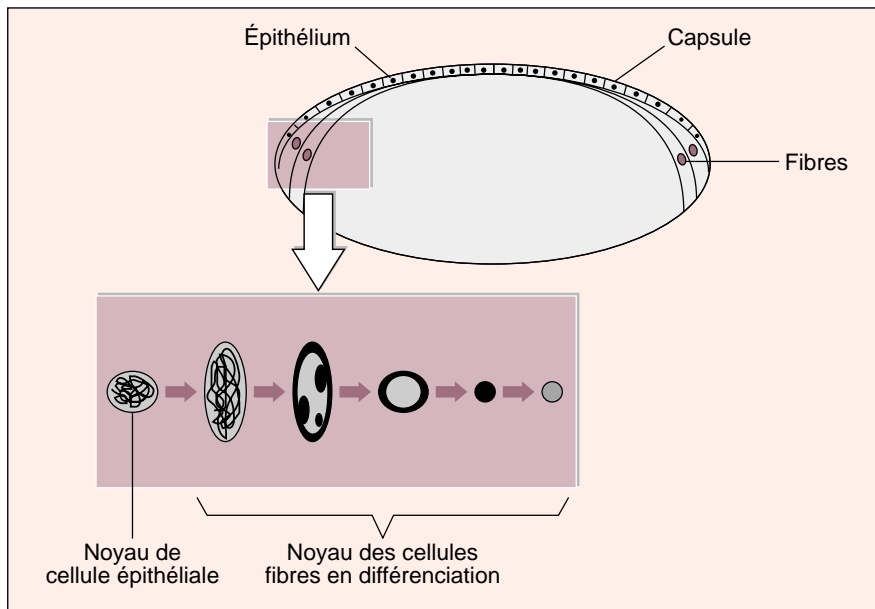


Figure 1. **Le cristallin.** Le cristallin est formé d'une capsule acellulaire sous laquelle se trouve une monocouche de cellules épithéliales non différenciées. Au niveau de l'équateur de l'organe, les cellules épithéliales se divisent, puis se différencient en cellules fibres. Cette différenciation entraîne la dégénérescence des noyaux. Ils commencent par s'allonger, la chromatine se condense. Par la suite ils rétrécissent, deviennent picnotiques et ronds et finissent par disparaître.

serpines et qui a une activité antiprotéase. Elle inhibe, notamment, l'élastase et la cathepsine G.

Étant donné que la DNase II a une masse moléculaire apparente plus faible, trois hypothèses ont été émises pour expliquer le rapport entre la LEI et la DNase II: (a) les deux protéines présentent des séquences communes mais sont codées par des gènes différents; (b) l'ARNm de la DNase II est issu de celui de la LEI par épissage alternatif; (c) la DNase II est issue de la LEI par modification post-traductionnelle.

Les études génomiques en *Southern blot* ont écarté la première hypothèse. La deuxième hypothèse a été longuement étudiée puisqu'elle semblait la plus probable. En effet, les peptides obtenus par séquençage protéique de la DNase II se localisent dans les extrémités amino- et carboxy-terminales de la LEI. Pourtant, les études de l'ARNm par *Northern blot* montrent une seule bande de 2 200 paires

de bases dans tous les tissus étudiés. Cette taille correspond à celle attendue pour l'ARNm de la LEI. Ces résultats ont été confirmés par des études de PCR emboîtée.

Pour évaluer notre troisième hypothèse, nous avons produit une LEI recombinante. Nous avons obtenu une protéine de 42 kDa, qui ne possède pas d'activité endonucléase.

Étant donné que l'extraction de la DNase II à partir des tissus implique une précipitation acide, essentielle à son activité [27], nous avons exposé la p42 recombinante à l'action d'un pH acide. Cela nous a permis d'obtenir, à partir de la p42, une protéine de 35 kDa. Cette protéine a une activité de type DNase II (*figure 2A*).

Ces résultats nous ont permis de conclure que cette DNase II dérive de la LEI par modification post-traductionnelle. Nous l'avons donc nommée L-DNase II (pour *LEI-derived DNase II*). Nous nous sommes ensuite demandé ce que devenait

l'activité anti-élastase normalement détenue par la LEI. Pour répondre à cette question, nous avons exposé la LEI et la L-DNase II (donc la LEI portant déjà la modification post-traductionnelle) à l'action de l'élastase pendant 5 minutes. Dans ces conditions, la LEI forme, avec cette protéase, un complexe stable au SDS qui se conserve pendant 20 minutes. La formation de ce complexe est une condition indispensable pour l'activité antiprotéase [31]. Ces expériences nous ont permis de vérifier que si la p42 possède bien son activité anti-élastase, la p35 l'a perdue (*figure 2A*).

Finalement, nous avons vérifié la participation de la DNase II ainsi produite à l'apoptose. Pour cela, nous avons traité des noyaux purifiés de cellules BHK normales par la LEI native, ou modifiée après traduction. Nous avons observé une condensation de la chromatine accompagnée de dégradation de l'ADN dans les noyaux traités avec la LEI modifiée, mais pas de modification dans les noyaux traités par la LEI native [30] (*figure 2B*).

L'ensemble de ces résultats nous permet d'affirmer que la DNase II est dérivée de la LEI par modification post-traductionnelle. Cette modification implique, d'une part, son changement de poids moléculaire apparent et, d'autre part, l'apparition d'une activité endonucléase avec disparition de l'activité antiprotéase de la LEI. Des résultats *in vitro* et en culture de cellules [30] nous permettent d'affirmer que cette enzyme, appelée L-DNase II, intervient dans la dégradation du génome lors de l'apoptose.

### Les particularités moléculaires de la L-DNase II

Six particularités moléculaires peuvent être soulignées en ce qui concerne la L-DNase II.

1. Il existe au moins deux autres DNases II avec des caractéristiques différentes de la L-DNase II. En effet, récemment, l'équipe de Kishi [32] et celle de Liao [33] ont cloné d'autres ADNc de DNases de type II. Celle de Kishi est apparentée, du point de vue de sa structure, avec les cathepsines,

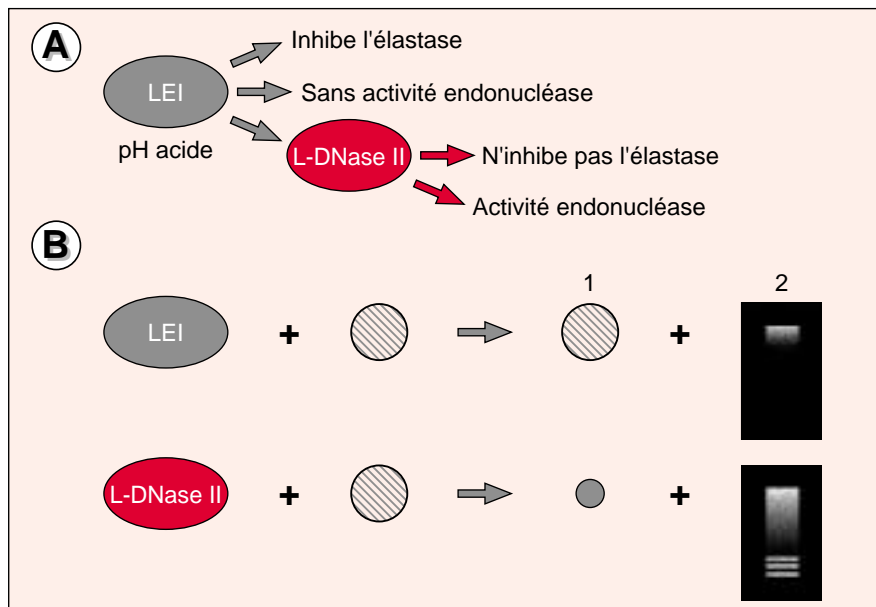


Figure 2. **LEI et L-DNase II: effet sur des noyaux purifiés de cellules BHK.** A. La LEI est une protéine de la famille des serpines de poids moléculaire apparent 42 kDa. Elle inhibe l'élastase mais n'a pas d'activité endonucléase. L'exposition de la LEI à pH acide ou à l'élastase pendant des périodes prolongées entraîne l'apparition, à partir de la p42, d'une protéine de poids moléculaire apparent 35 kDa, qui a perdu son activité anti-élastase mais qui a acquis une activité endonucléase. B. Des noyaux de cellules BHK ont été incubés pendant 6 heures en présence de LEI synthétisée par *E. coli*, dans sa forme native (LEI), traitée à pH 2,0 ou en ajoutant du PBS à sa place. Par la suite, l'ADN a été extrait et analysé sur un gel d'agarose (2) dans lequel les noyaux ont été colorés au DAPI et observés en microscopie de fluorescence (1).

mais son rôle dans les phénomènes apoptotiques n'a pas été étudié. Les études de comparaison de séquences ne montrent pas de relation phylogénétique entre ces DNases et la L-DNase II (Tableau I).

2. La LEI appartient à la grande famille des serpines intracellulaires [31]. Ces protéines ont de nombreuses fonctions outre celle d'inhibiteurs de protéases. Ainsi, la maspine, par exemple, inhibe la migration des cellules cancéreuses à travers la membrane basale et limite leur capacité de produire des métastases [34]. Le processus d'apoptose semble aussi réglé par cette famille de protéines. En effet, *crmA* (*cytokine response mediator A*) est une serpine connue pour être un des plus puissants inhibiteurs des caspases de type I. Cette protéine présente 35-37 % d'identité avec la LEI (Tableau I).

3. Les premières expériences effectuées pour induire la transformation LEI-L-DNase II utilisaient des conditions physico-chimiques très éloignées des conditions physiologiques. Néanmoins, la présence d'un extrait cytosolique permet la transformation dans les conditions de pH observées

dans les cellules en apoptose [30]. Cela laisse supposer l'existence de facteurs adjuvants non identifiés. De plus, l'action de certaines enzymes protéolytiques, comme l'élastase, peuvent aboutir à la même modification post-traductionnelle [30].

4. *In vitro*, la L-DNase II présente une activité maximale à pH 5,5. En réalité, cette enzyme est capable de travailler dans une large fourchette de pH puisqu'elle conserve 50 % de son activité à pH 7,4 [35]. De plus, contrairement à ce qui était couramment affirmé, cette enzyme est, comme d'autres DNases participant à l'apoptose, inhibée par les ions  $Zn^{2+}$  [36].

5. Il est généralement accepté que l'activation des endonucléases pendant l'apoptose consiste à activer des précurseurs déjà présents dans la cellule, notamment par l'action protéolytique des caspases. Or, dans l'apoptose des cellules HeLa induite par épuisement du milieu de culture, nous avons constaté que l'activation de la L-DNase II est indépendante des caspases 1 et 3. De plus il y a néosynthèse de la LEI [37]. Cela se confirme aussi dans les cellules de

l'épithélium pigmentaire de la rétine humaine dont l'apoptose est induite par différents inducteurs, comme une forte concentration d'alcool.

6. La L-DNase II et son précurseur présentent des caractéristiques exceptionnelles. En général, les modifications post-traductionnelles activent ou désactivent une enzyme, ou modifient sa localisation subcellulaire. Dans ce cas, la protéine change complètement d'activité. Elle se transforme d'antiprotéase en endonucléase. Ce changement d'activité est aussi accompagné d'une translocation nucléaire [28].

### Une nouvelle hypothèse dans l'activation des voies apoptotiques

Les éléments que nous avons apportés concernant l'activation de la L-DNase II changent radicalement notre façon de voir la hiérarchie des molécules impliquées dans la mort cellulaire. Nos données peuvent être résumées dans le modèle schématisé dans la figure 3.

Selon ce modèle, la LEI joue un rôle clé dans l'activation des voies de

Tableau I  
COMPARAISON DE LA L-DNASE II AVEC CERTAINES ENDONUCLÉASES RÉCEMMENT DÉCRITES

	Homologie avec la L-DNase II	Poids moléculaire (kDa)	Peptide signal	Localisation subcellulaire	Condition d'activité DNase
L-DNase II	100 %	35-27	non	cytoplasmique et nucléaire pendant l'apoptose	sans cations, pH 5,5-7,5
DNase II humaine (Yasuda <i>et al.</i> )	aucune	32	?	lysosome	pH 7,5
DNase II porcine (Liao <i>et al.</i> )	aucune	35 + 10	oui	?	sans cations, pH 4,6
CAD (Enari <i>et al.</i> )	aucune	40	?	nucléaire	dépendante de $Mg^{2+}$ pH 7,0
CPAN (Halenbech <i>et al.</i> )	aucune	40	?	?	?
<i>Crma</i>	39% d'identité sur 369 aa	38		protéine virale	

dégradation déclenchées pendant l'apoptose. Nous pensons que, dans la cellule vivante, la LEI a sa fonction habituelle d'inhibiteur des protéases. Elle inhibe ainsi les élastase-like, les cathepsines et probablement d'autres protéases non encore identifiées. Son action est ici de type anti-apoptotique, analogue à celle de la nexine I ou de *CrmA*. Lorsque la cellule reçoit un signal de mort, qui entraîne une diminution du pH intracellulaire, la LEI se transforme en L-DNase II. Il y a donc apparition d'une activité endonucléase mais, en même temps, l'activité antiprotéase de la LEI disparaît. Deux voies de dégradation sont donc activées : celle des endonucléases, par l'apparition de la L-DNase II et celle des protéases, par libération de leur inhibition. Dans ce modèle, deux points sont à remarquer : (1) à la différence des

modèles d'apoptose proposés jusqu'à présent, celui-ci ne se prétend pas un modèle universel. En effet, nous pensons qu'il est impliqué dans les apoptoses qui entraînent une diminution du pH intracellulaire [38, 39]. Nous concevons donc l'existence de voies alternatives de l'apoptose ; (2) dans ce modèle, la LEI joue un rôle-clé dans l'activation de la voie apoptotique permettant d'activer, à la fois, la dégradation des protéines et de l'ADN dans la cellule. Elle constitue à la fois un élément de contrôle et un effecteur de l'apoptose. Des expériences récentes montrent que d'autres éléments, en dehors du pH acide, peuvent intervenir dans la transformation de la LEI en L-DNase II. Parmi ces éléments, on retrouve certaines protéases à sérine, comme l'élastase (voir plus haut). Il est donc possible que, dans les cas d'apoptose

où il n'y a pas diminution du pH intracellulaire, la LEI soit transformée en L-DNase II par l'action des sérine protéases. Cela pourrait expliquer l'action de ces enzymes dans l'apoptose décrite précédemment. Dans ce cas, l'activation de la L-DNase II ressemblerait à l'activation de AP24 ou de PAK2 par la caspase 3 [11, 40].

Il est intéressant de remarquer que nous sommes peut-être à l'émergence d'un nouveau type de systèmes utilisés pour régler l'apoptose. En effet, dans notre cas, la cellule synthétise une protéine qui a une activité qu'on pourrait qualifier d'anti-apoptotique : la LEI. Lorsque cette protéine se transforme en L-DNase II, son activité anti-apoptotique disparaît au profit d'une activité de type endonucléase, donc pro-apoptotique. Ce système présente une certaine ressemblance avec celui décrit par l'équipe de Nagata [22, 41], dans lequel le précurseur de l'endonucléase (CAD) est synthétisé en formant un complexe avec son inhibiteur (ICAD) qui a besoin d'être coupé par la caspase 3 pour libérer l'enzyme active.

### Une nouvelle conception sur l'événement décisif de l'apoptose

Jusqu'à présent les auteurs se sont beaucoup impliqués dans la recherche de l'événement décisif commun à toutes les formes d'apoptose. Ce point est actuellement fixé au niveau de l'activation des caspases [3]. Les résultats obtenus par les différents groupes, sur plusieurs modèles d'apoptose, font penser que la cellule du mammifère possède, en fait, diverses voies qui peuvent être activées indépendamment. Il est donc possible qu'il n'existe pas un événement décisif unique mais que chaque voie en possède un propre. Ainsi, dans une cellule dont l'apoptose est activée par la voie de Fas, par exemple, il est possible que l'événement décisif soit situé au niveau de l'activation des caspases. En revanche, si la voie activée est celle de la L-DNase II, l'événement décisif peut se situer au niveau de l'activation de cette enzyme, puisque le couple LEI-

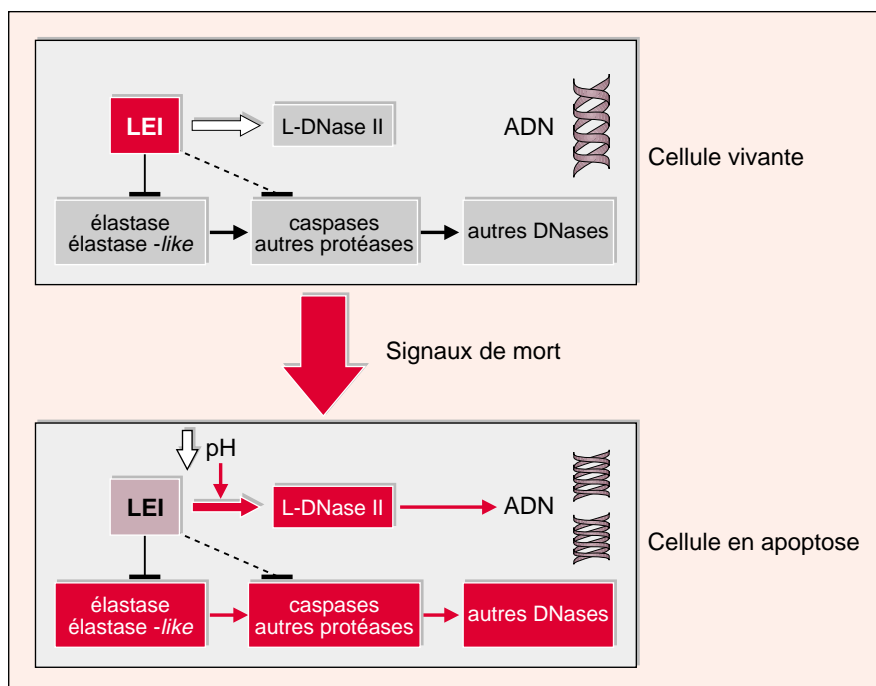


Figure 3. **Rôle de LEI-DNase II dans les cellules apoptotiques.** La LEI joue un rôle-clé dans l'activation des voies de dégradation déclenchées pendant l'apoptose. Dans la cellule vivante, la LEI a sa fonction habituelle d'inhibiteur des protéases. Elle inhibe ainsi les élastase-like, les cathepsines et probablement d'autres protéases pas encore identifiées. Lorsque la cellule reçoit un signal de mort, qui entraîne une diminution du pH intracellulaire, la LEI se transforme en L-DNase II. Il y a donc apparition d'une activité endonucléase mais, en même temps, il se produit une disparition de l'activité antiprotéase de la LEI. Deux voies de dégradation sont donc activées : celle des endonucléases, par l'apparition de la L-DNase II et celle des protéases, par libération de leur inhibition.

L-DNase II agit comme un *switch* capable d'activer à la fois les endonucléases et les protéases.

## Conclusions

La manipulation de l'apoptose comme cible thérapeutique a suscité de grands espoirs, ces dernières années, aussi bien dans le traitement des maladies tumorales que dégénératives. La connaissance approfondie des voies intracellulaires de l'apoptose devient par conséquent essentielle. Or, cette tâche semble difficile dans les organismes supérieurs puisque la cellule disposerait de diverses voies pour induire l'apoptose. Cela peut représenter un avantage lorsqu'on cherche à augmenter l'apoptose d'une lignée cellulaire. En effet, l'existence de voies parallèles autoriserait la mise en place de traitements alternatifs permettant de pallier les éventuelles résistances. En revanche, cette diversité peut représenter une difficulté lorsqu'on cherche l'effet inverse, c'est-à-dire l'inhibition de l'apoptose pour le traitement, par exemple, des maladies dégénératives. Dans ce cas, une connaissance détaillée des voies empruntées par l'apoptose sera nécessaire pour traiter les différentes maladies ■

## Remerciements

Nous remercions pour leur participation active les autres membres de l'équipe dans le développement du sujet: Jean-Yves Brossas, Elisabeth Chaudun, Marie-France Counis et Jacques Tréton, ainsi que nos collaboratrices Claudia Negri, Ivana A. Scovassi et Évelyne Segal.

## RÉFÉRENCES

1. Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biol* 1995; 6: 3-16.
2. Labouesse M. *C. elegans*, les promesses d'un petit animal intelligent: «small is beautiful». *Med Sci* 1994; 10: 337-41.
3. Mignon A, Rouquet N, Joulin V. Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose: un enjeu thérapeutique pour demain? *Med Sci* 1998; 14: 9-17.
4. de la Coste A, Perret C. Bad est-elle la protéine cible des facteurs de survie? *Med Sci* 1997; 13: 384-6.
5. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* 1995; 9: 1277-87.
6. Houenou LJ, Turner PL, Li L, Oppenheim RW, Festoff BW. A sérine protease inhibitor, protease nexin I, rescues motoneurons from naturally occurring and axotomy-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 895-9.
7. Fernanhead H, Rivet A, Dinsdale D, Cohen G. A pre-existing protease is a common effector of thymocyte apoptosis mediated cytotoxicity. *FEBS Lett* 1995; 357: 242-6.
8. Dubrez L, Savoy I, Hamman A, Solary E. Pivotal role of a DEVD sensitive step in etoposide-induced and fas-mediated apoptotic pathways. *EMBO J* 1996; 15: 5504-12.
9. Wright SC, Wei QS, Zhong J, Zheng H, Kinder DH, Larrick JW. Purification of a 24 kDa protease from apoptotic tumor cells that activates DNA fragmentation. *J Exp Med* 1994; 180: 2113-23.
10. Wright SC, Wei QS, Kinder DH. Biochemical pathways of apoptosis: nicotinamin adenin dinucleotide deficient cells are resistant to tumor necrosis factor or ultraviolet light activation of the 24 kDa apoptotic protease and DNA fragmentation. *J Exp Med* 1996; 183: 463-71.
11. Wright SC, Schellenberger U, Wang H, Kinder DH, Talhouk JW, Larrick JW. Activation of CPP32-like proteases is not sufficient to trigger apoptosis: inhibition of apoptosis by agents that suppress activation of AP24, but not CPP32-like activity. *J Exp Med* 1997; 186: 1107-17.
12. Chinnaiyan AM, Hanna WL, Orth K, Poirier GG, Froelich CJ, Oixit VM. Cytotoxic T-cell-derived granzyme B activates the apoptotic protease ICE-LAP3. *Curr Biol* 1996; 6: 897-9.
13. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3: 614-20.
14. Brown DG, Sun XM, Cohen GM. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J Biol Chem* 1993; 268: 3037-9.
15. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-6.
16. Stephan H, Polzar B, Rauch F, Zanotti S, Ulke C, Mannherz HG. Distribution of deoxyribonuclease I (DNase I) and p53 in rat testis and their correlation with apoptosis. *Histochem Cell Biol* 1996; 106: 383-93.
17. Eastman A. Deoxyribonuclease II in apoptosis and the significance of intracellular acidification. *Cell Death Diff* 1994; 1: 7-9.
18. Montague JW, Gaido ML, Frye C, Cidlowski JA. A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A,B,C have nuclease activity. *J Biol Chem* 1994; 269: 18877-80.
19. Pandey S, Walker PR, Sikorska M. Identification of a novel 97 kDa endonuclease capable of internucleosomal DNA cleavage. *Biochemistry* 1997; 36: 711-20.
20. Kawabata H, Anzai N, Masutani H, et al. Mg<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup>-dependent endonuclease activities of human myeloid leukemia cells capable of producing nucleosomal-size DNA fragmentation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233: 133-8.
21. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; 89: 175-84.
22. Enari M, Sakahira H, Yokohama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50.
23. Halenbeck R, MacDonald H, Ronestone A, Chen TT, Conroy L, Williams LT. CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr Biol* 1998; 8: 537-40.
24. Sanwal M, Muel AS, Chaudun E, Courtois Y, Counis MF. Chromatin condensation and terminal differentiation process in embryonic chicken lens *in vivo* and *in vitro*. *Exp Cell Res* 1986; 167: 429-39.
25. Chaudun E, Arruti C, Courtois Y, et al. DNA strand breakage during physiological apoptosis of the embryonic chick lens: free 3'OH end single strand breaks do not accumulate even in the presence of a cation-independent deoxyribonuclease. *J Cell Physiol* 1994; 158: 354-64.
26. Torriglia A, Chaudun E, Chany F, Désiré L, Régner F, Courtois Y, Jeanny JC, Counis MF. Chromatin cleavage, DNase II activity in differentiating lens cells. *Congress of the European developmental biology organisation*. Toulouse: EDBO, 1995.
27. Bernardi G. Mechanism of action and structure of acid deoxyribonuclease. In: Nord FF, ed. *Advances in enzymology*. New York: Interscience, 1968; 31: 1-49.

## TIRÉS À PART

A. Torriglia.

## RÉFÉRENCES

28. Torriglia A, Chaudun E, Chany-Fournier F, Jeanny JC, Courtois Y, Counis MF. Involvement of DNase II in nuclear degeneration during lens cell differentiation. *J Biol Chem* 1995; 270: 28579-85.
29. Ilschner SU, Waring P. Fragmentation of DNA in the retina of chicken embryos coincides with retinal ganglion cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183: 1056-61.
30. Torriglia A, Perani P, Brossas JY, et al. L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin, leukocyte elastase inhibitor. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3612-9.
31. Korpula-Mastalerz R, Dubin A. The intracellular serpin family. *Acta Biochim Polonica* 1996; 43: 419-30.
32. Yasuda T, Takeshita H, Iida R, et al. Molecular cloning of the cDNA encoding human deoxyribonuclease II. *J Biol Chem* 1998; 273: 2610-6.
33. Wang CC, Lu SC, Chen HL, Liao TH. Porcine spleen deoxyribonuclease II. Covalent structure, cDNA sequence, molecular cloning, and gene expression. *J Biol Chem* 1998; 273: 17192-8.
34. Pemberton PA. The role of serpin superfamily members in cancer. *Cancer J* 1997; 10: 24-30.
35. Counis MF, Chaudun E, Arruti C, et al. Analysis of nuclear degradation during lens cell differentiation. *Cell Death Diff* 1998; 5: 251-61.
36. Torriglia A, Chaudun E, Courtois Y, Counis MF. On the use of Zn<sup>2+</sup> to discriminate endonucleases activated during apoptosis. *Biochimie* 1997; 79: 435-8.
37. Torriglia A, Negri C, Chaudun E, et al. Differential involvement of DNases in HeLa cell apoptosis induced by etoposide and long term-culture. *Cel Death Diff* 1999 (sous presse).

### Alicia Torriglia

Chargée de recherche à l'Inserm. Inserm U. 450, Développement, vieillissement et pathologie de la rétine, affiliée Cnrs, Association Claude-Bernard, 29, rue Wilhem, 75016 Paris, France.

### Paolo Perani

Chercheur postdoctoral, boursier AFRP, Rétina France.

### Yves Courtois

Directeur de recherche à l'Inserm. Inserm U. 450, Développement, vieillissement et pathologie de la rétine, affiliée Cnrs, Association Claude-Bernard, 29, rue Wilhem, 75016 Paris, France.

38. Czene S, Tibäck M, Harms-Ringdahl M. pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. *Biochem J* 1997; 323: 337-41.

39. Sharma K, Srikant CB. G protein coupled receptor signaled apoptosis is associated with activation of a cation insensitive acidic endonuclease and intracellular acidification. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242: 134-40.

40. Rudel T, Zenke FT, Chuang TH, Bokoch GM. p21-activated kinase (PAK) is required for Fas-induced JNK activation in Jurkat cells. *J Immunol* 1998; 160: 7-11.

41. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96-9.

## Summary

### L-DNase II: a new link in apoptotic pathways

Induction of apoptosis is triggered by the release of mitochondrial molecules, followed by the activation of proteases and endonucleases. In this molecular pathway, the activation of proteases known as caspases is thought to be the no-return step of apoptosis. Activation of endonucleases is believed to have a degradative function and to occur downstream of proteases. In neural apoptosis occurring during embryonic development of the chick retina and in lens cell terminal differentiation, we have shown the activation of an acid DNase. The molecular study of this enzyme, present in many tissues, has shown that it is synthesized as a serpin, the leukocyte elastase inhibitor, a molecule displaying an anti-protease activity. After induction of apoptosis a post-translational modification of LEI gives rise to L-DNase II, a protein devoid of antiprotease activity but with an endonuclease activity. It is then possible that after induction of apoptosis the L-LEI-DNase II pathway acts as a switch triggering, at the same time, the activation of endonucleases by the appearance of L-DNase II in the cell, and the activation of protease by releasing their inhibition. In this apoptotic pathway the no-return step would be located at the LEI-L-DNase II transition, instead of been at the caspase level.