

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel



BC.10/07

Faculté des Sciences
Département du Biologie Moléculaire et Cellulaire

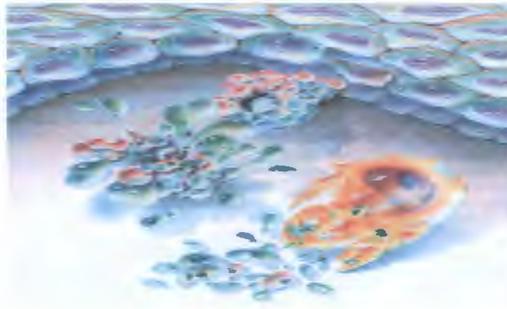
Mémoire

De Fin d'Etudes en Vue de l'Obtention du Diplôme d'Etudes
Supérieures (D.E.S) en Biologie

Option : Biochimie

Thème

Biochimie de l'apoptose

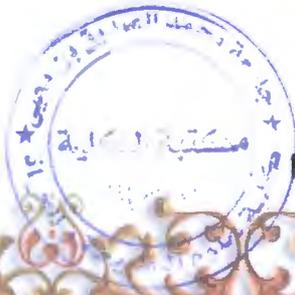


Membre du jury :

- ❖ Encadreur : M^r KEBAIECHE Mohamed
- ❖ Examinatrice : M^{lle} ROUIBAH Hassiba

Présenté par :

- ❖ BOUANIKA Sakina
- ❖ BOURITA Chahida
- ❖ BOUSBIA Souad



Promotion : Juin 2007

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu qui nous donné du courage et de la volonté d'avoir réussi dans notre vie éducationnelle et privée.

Nous serons heureuses d'exprimer nous plus vifs remerciements à notre encadreur Monsieur « K'EBALIECH Mohamed », pour ces précieux conseils, son collaboration, son aide, son grand soutien et sa disponibilité permante aussi bien de son patience de début jusqu'à la fin de notre mémoire.

Nous adressons particulièrement nos vifs remerciements au notre Jury qui accepte de jurer ce modeste travail.

Nos remerciements vont à tout les enseignants de l'institut de biologie de l'université de Jijel surtout Melle CHERBELL et Melle K'ABSA.

Nous adresssons particulièrement nos vifs remerciements à B-Samir pour tout ses aides.

En fin nous tenous à remercions tous ceux qui nous ont aidé de prés ou de loin pour conclure ce travail.

Souad, Sakina et Chahida

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Généralités

1. Définition de l'apoptose.....	2
2. Caractéristiques de l'apoptose	2
3. Détection de l'apoptose.....	2
4. L'apoptose et la nécrose : Différence	3
5. Intérêt Biologique de l'apoptose	3
5.1. Chez l'embryon	3
a. Lors de la morphogenèse	3
b. Lors de la neurogenèse	3
5.2. Chez l'adulte	4

Chapitre II : Mécanisme moléculaire de l'apoptose

1. Aspect général.....	10
2. Les inducteurs d'apoptose	11
3. Les voies de l'apoptose (Les mécanismes généraux de l'apoptose)	11
▪ Le sentier extrinsèque	11
▪ Le sentier intrinsèque	12
4. Le rôle de la mitochondrie dans l'apoptose	12
4.1. La mitochondrie	12
▪ Quel est son rôle dans l'apoptose ?	14
▪ Le déclenchement du relargage des facteurs apoptogènes dans la mitochondrie	14
▪ Mécanisme de relargage	14
4.1.1. Le cytochrome C.....	15
4.1.2. Smac/DIABLO et Omi/HtrA2	16
5. Les membres de la famille Bcl-2	16
5.1. Les anti-apoptotiques	19
5.2. Les pro-apoptotiques.....	19
5.2.1. Les protéines à multiples domaines BH	19

■ Bax et Bak	20
5.2.2. Les protéines à domaine BH3 seulement.....	20
■ Bid(BH3-Interacting Domain death agonist)	20
■ Bad (Bcl-2 Antagonist of cell Death protein).....	21
■ Bim/BOD: (BOD = Bcl-2 Ovarian Death synonyme de Bim)	21
■ PUMA/BBC3	22
■ Noxa	23
■ Autres	23
6. Les protéines intervenant dans l'exécution de l'apoptose	25
6.1. Les caspases	25
a-Nomenclature	25
b- Structure	25
c-Activation	26
d-Substrats	28
e-Invalidation génique	28
f- Régulation	29
6.2. Les trois phases de l'apoptose	30
6.2.1 La phase d'initialisation	30
6.2.2 La phase de décision	30
6.2.3 La phase d'exécution	30
7. Les récepteurs et les ligands de récepteurs de mort cellulaire.....	32
a. Les récepteurs	32
b. Les ligands	32

Chapitre III : L'apoptose dans la pathologie et la physiologie

1. Les types des cellules qui subissent la mort cellulaire programmée	34
1.1. Les cellules nuisibles	34
1.2. Les cellules du développement défectueuses	34
1.3. Les cellules en excès	34
1.4. Les cellules obsolètes	34
1.5. Les cellules infectées par les virus.....	35
1.6. Les cellules inutiles.....	35
1.7. L'élimination chimiothérapeutique des cellules	35

2. L'apoptose physiologique et pathologique	35
2.1. L'apoptose physiologique	35
2.2. L'apoptose pathologique	36
2.2.1. Le diabète et l'apoptose	37
▪ Rôle de l'apoptose dans le diabète	37
▪ Apoptose et complications du diabète	37
2.2.2. Le stress et l'apoptose	38
▪ C'est quoi le stress oxydant ?	38
▪ Quelle est la relation entre le stress et l'apoptose ?	38
▪ Généralités sur les protéines de stress	38
CONCLUSION	39

Références bibliographiques

Glossaire

Liste des tableaux

Tab.1. Morphologies et biochimie de l'apoptose.....	2
Tab.2. Les méthodes de la détection de l'apoptose.....	5
Tab.3. Comparaison biochimique et morphologique de l'apoptose et de la nécrose.	8

Liste des figures

Fig.1. Destruction des cellules par le phénomène de l'apoptose.....	7
Fig.2. Comparaison morphologique entre nécrose et apoptose.....	7
Fig.3. Différentiation incomplète de deux orteils du fait d'une activité apoptotique défectueuse.....	9
Fig.4. Une cellule enclenche un processus apoptotique.	10
Fig. 5. Les sentiers extrinsèque (type I et II) et intrinsèque de l'apoptose.....	13
Fig .6. Mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales.....	17
Fig.7. Cytochrome c et initiation de l'apoptose	18
Fig.8. Structure des membres de la famille Bcl-2	18
Fig.9. Régulation de l'apoptose par les membres de la famille B.....	24
Fig.10. Structure tridimensionnelle des caspases	27
Fig.11. Structure et activation des caspases. Les caspases contiennent quatre domaines principaux qui sont clivés en deux étapes afin de donner une caspase active.....	27
Fig12: Schéma simplifié représentant les protéines essentielles au programme de mort cellulaire chez C.elegans et chez les mammifères.....	31
Fig.13. Les trois phases de l'apoptose.....	31
Fig. 14. Activation des caspases par les récepteurs de mort.....	33

Liste des abréviations et acronyme

- ADN** : acide désoxyribonucléique
- AIF** : Apoptosis Inducing Factor facteur induisant l'apoptose
- Apaf** : Apoptotic protease activating factor
- Apaf-1** : Apoptotic-protease-activating-factor 1 facteur activant les protéases Apoptotiques
- ATP** : adénosine triphosphates
- ARN** : acide ribonucléique
- ARNm** : acide ribonucléique messenger
- Bad** : Bcl-2 Antagonist of cell Death protein protéine de mort cellulaire antagoniste domaines homologie à Bcl-2
- Bax** : Bcl 2 Associated X protein protéine X associée à Bcl-2
- Bak** : Bcl-2 homologous Antagonist/Killer tueur/antagoniste homologue de Bcl-2
- BBC3** : Bcl-2 Binding Component 3 (aussi appelée PUMA)
- Bcl-2** : B Cell Lymphoma protein 2 protéine 2 de lymphome des cellules B
- BH1-4** : Bcl-2 Homology domain 1-4 domaines 1, 2, 3 et 4 d'homologie à Bcl-2
- Bid** : BH3-Interacting Domain death agonist agoniste de mort interagissant avec les domaines BH3
- Bik/Nbk** : Bcl-2 Interacting Killer tueur interagissant avec Bcl-2
- BimEL** : Bim isoforme extra-longue
- BimL** : Bim isoforme longue
- BimS** : Bim isoforme courte
- Bim** : Bcl-2-Interacting Mediator of cell death médiateur de l'apoptose interagissant avec Bcl-2
- Bmf** : Bcl-2 Modifying Factor facteur modifiant Bcl-2
- BOD** : Bcl-2 Ovarian Death synonyme de Bim (peu utilisé)
- CARD** : Caspase Recruitment Domain domaine de recrutement des caspases
- Caspase** : Cystein-Aspartate protease protéase cystéine-aspartate cellulaire
- Cyt.c** : cytochrome c
- DLC1** : Dynein Light Chain 1 chaîne légère 1 de la dynéine
- EndoG** : Endonucléase G
- ERK** : Extracellular signal Regulated Kinase kinase régulée par les signaux extracellulaires
- HSP90** : Heat Shock Protein 90 protéine de choc thermique de 90 kDa
- IAP** : Inhibitor of Apoptosis Protein protéine inhibitrice de l'apoptose
- JNK** : c-jun N-terminal Kinase kinase du N-terminal de c-jun
- Mcl-1** : Myeloid Cell Lymphoma 1 protéine 1 du lymphome des cellules myéloïdes
- PUMA** : p53-Upregulated Modulator of Apoptosis modulateur de l'apoptose augmenté par p53.
- ROS** : Reactive Oxygen Species espèces réactives d'oxygène
- Smac/DIABLO** : Second mitochondria-derived factor activator of caspases , second facteur dérivé de la mitochondrie activant les caspases
- tBid** : Truncated Bid Bid tronquée
- TNF- α** : Tumor Necrosis Factor alpha facteur alpha de nécrose des tumeurs
- VDAC2** : Voltage-Dependent Anion Channel 2 pore anionique 2 dépendant du voltage
- VIH** : human immuno-deficiency virus

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La mort cellulaire programmée, suicide cellulaire ou apoptose est un processus fondamental et indispensable au cours du développement cellulaire, de l'homéostasie tissulaire et de la régulation des réponses immunes. L'apoptose se caractérise par de profonds changements morphologiques comprenant une réduction du volume cellulaire, un bourgeonnement de la membrane plasmique, une condensation nucléaire et finalement une fragmentation internucléosomale de l'ADN (Jean et al., 2001). La cellule apoptotique se sépare de ses voisines puis se désintègre de façon ordonnée: Condensation puis fragmentation d'un noyau, casseur régulier des chromosomes, puis bourgeonnement des cytoplasmes sous forme de petits ballonnets rapidement ingérés par les cellules voisines (les macrophages) (Yang et al., 1997).

Après qu'il eut été démontré que les organismes vivants sont constitués de cellules, l'importance de la mort cellulaire dans le développement d'un animal a été découverte (Clarke, 1996). La mort cellulaire normale a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens puis dans plusieurs tissus en développement tant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Jacobson et al., 1997). Le terme mort cellulaire programmée a initialement été utilisé pour décrire une mort cellulaire qui survient à des endroits prévisibles et à des moments précis (Jacobson et al., 1997).

En 1972 KERR et al., ont décrit une mort cellulaire de même type que plusieurs auteurs avaient préalablement observés dans divers tissus et divers types cellulaires (Currie et al., 1972). Ces cellules mourantes démontraient des caractéristiques morphologiques communes mais cependant, distinctes de celles observées dans les cellules mourantes accidentellement par nécrose, ces mêmes auteurs ont suggéré que ces caractéristiques morphologiques communes puissent être le résultat d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire. Ils ont donné le nom d'apoptose à ce processus (Currie et al., 1972).

Mais pourquoi l'apoptose ? Qu'est-ce que ça veut dire ? quel est son rôle, son importance ? et par quel mécanisme survient-elle ?

L'apoptose constitue aujourd'hui un des domaines de recherche récent, elle prend une grande importance dans l'embryogenèse mais également impliquée dans des nombreuses pathologies (cancer, sida...) (Horvitz, 1986). Bien que l'apoptose n'est pas bien connue, mais elle est sans aucun doute reste un des sujets de recherche biomédicale qui attire une grande part de l'attention au cours de la dernière décennie. Une base de données a d'ailleurs été créée, répertoriant plus de 40 000 publications élucidant certaines questions de domaine de la mort cellulaire programmée (Folkow, 1982).

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons donc souhaité apporter une contribution à l'amélioration de la compréhension de l'apoptose tant sur le plan biochimique que sur le plan pathologique.

CHAPITRE - I

GÉNÉRALITÉS

Tab.2. Les méthodes de la détection de l'apoptose (Hengartner ,2000)

Caractéristique visée	Technique et préparation utilisées
<p>Morphologie cellulaire</p>	<p>Un marquage avec un fluorochrome, le DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) qui se fixe spécifiquement à l'ADN. Un bourgeonnement de la membrane plasmique et la présence de corps apoptotiques peuvent être observés grâce à ce fluorochrome dans une préparation cellulaire.</p> 
<p>Fragmentation de l'ADN</p>	<p>La fragmentation de l'ADN est causée par les endonucléases induites durant le processus apoptotique. La coupure de l'ADN se produit préférentiellement dans une région spécifique de l'ADN, ce qui provoque la libération de fragments oligonucléosomaux typiques de l'apoptose de 180-200 paires de bases. Ces fragments peuvent être visualisés sur un gel d'agarose sous forme de bandes multiples formant une "échelle d'ADN" (DNA ladder).</p>  <p>Dans la ligne 1, on retrouve un marqueur de poids moléculaire; dans la ligne 2, on retrouve des cellules U937 sans stimulus apoptotique; dans la ligne 3 des cellules U937 avec un stimulus apoptotique et dans la ligne 4 on retrouve un contrôle positif. Source "Roche Diagnostics".</p> <p>La coupure d'ADN durant l'apoptose peut produire plusieurs types de fragments d'ADN: à double ou simple brin ou de faible poids moléculaire. Ces fragments peuvent être identifiés par un marquage des extrémités 3'-OH grâce à des nucléotides modifiés et l'utilisation de réactions enzymatiques. Deux méthodes existent: la première utilise la DNA polymérase qui permet l'incorporation des nucléotides marqués aux sites de coupures d'ADN; la seconde est l'utilisation de la "terminal transferase" (TdT) qui incorpore les nucléotides marqués aux sites de coupures d'ADN ainsi qu'aux extrémités 3'-OH des fragments d'ADN.</p>

4. L'apoptose et la nécrose : Différence

Toute cellule est génétiquement programmée pour mourir « Born to Die » est condamnée à mort en sursis : Son sort dépend de signaux émis par son environnement, on distingue deux types majeurs de la mort cellulaire tel que l'apoptose, la nécrose.

La nécrose est une mort cellulaire dit accidentelle, considérée comme mort cellulaire désordonnée qui survient lors d'un dommage tissulaire, et elle implique des groupes des cellules. En effets lors de la nécrose, les cellules vont se gorger d'eau au point que celle-la va entraîner la lyse de leur membrane plasmique, cette véritable explosion cellulaire conduit au relargage dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique, les organelles vont-elles aussi avoir tendance à gonfler, l'ADN nucléaire va être dégradé de manière aléatoire par des endonucléases, notamment par des serines protéases. Les fragments ainsi générés sont dépourvus d'extrémité 3' sortante. On remarque que la dispersion du contenu cellulaire provoquant une lésion et une réaction inflammatoire au niveau de tissus environnant. Par opposition, l'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée rapide (quelque heures) et discret mettant en œuvre une véritable machinerie interne de destruction de la cellule, procédant par différentes phases chronologiques (figure 1). Bien que toutes deux conclues par la mort cellulaire, nécrose et apoptose s'opposent point par point, tant sur le plan biochimique que sur le plan morphologique (tableau 3), (figure 2).

5. Intérêt Biologique de l'apoptose

La mort cellulaire ne se limite pas à la période embryonnaire mais elle intervient tout au long de la vie de l'organisme, de sa naissance à sa mort.

5.1. Chez l'embryon

L'apoptose élimine des cellules devenues inutiles une fois leur fonction accomplie (au cours de l'histo, de l'organo et de la morphogénèse).

a. Lors de la morphogénèse : Le développement normale d'un organe s'effectue par modelage ; ainsi , durant le développement embryonnaire , les mains et les pieds apparaissent d'abord sous forme de bourgeon , puis les doigts et les orteils sont sculptés , les cellules situées entre eux mourant. Sans l'apoptose les mains et les pieds palmés ; peut-être ceux qui ont « un poil dans la mains » ont-ils un déficit d'apoptose de cet ornement si gênant chez les autres quand un organe n'est plus nécessaire , ces cellules meurent : ainsi lors de la métamorphose des insectes et des amphibiens , grâce à l'apoptose , la chenille se mue en papillon et le têtard en grenouille (Strange *et al.*, 2001)(figure 3).

b. Lors de la neurogénèse : Les neurones se multiplient migrent et envoient leur axons en des cellules direction cibles (neurones, cellules musculaires...); seuls survivent les neurones qui ont établi un synapses avec les cellules cibles parce qu'ils ont reçu en retour de celles-ci des facteurs de survie (facteurs de croissances) en quantité suffisante, les autres neurones (1neurones sur 2 meurt par apoptose).(Verhage *et al.*, 2000).

5.2. Chez l'adulte

Chez l'adulte, on note divers intérêts de grande importance que l'on peut résumer dans les points suivants :

- L'apoptose contrebalançant la prolifération cellulaire, régule la taille des organes (figure 4) (1000 000000 nouvelles cellules apparaissent quotidiennement, autant doivent disparaître par apoptose).

- Elle élimine des cellules devenues inutiles : Absence de nidation, endomètre utérin et menstruation (les hormones sexuelles ayant bloqué l'apoptose pendant 21 jours) .

- Elle élimine des cellules devenues dangereuses telles que:

- Cellules dont l'ADN est lésé
- Cellules du système immunitaire une fois leur mission accomplie (lymphocytes une fois l'agent infectieux éliminé).
- Cellules infectées par des virus (apoptose induit par les lymphocytes T cytotoxiques).
- Cellules potentiellement cancéreuses.

Sans apoptose, un adulte de 80 ans aurait un intestin de 16 Km de long et 2 Tonnes de moelle osseuse et de ganglions (Moussard, 2005).

La mise en place du réseau synaptique entre les neurones dépend d'un contrôle dynamique et séquentiel de la vie et de la mort. Une fois que le câblage des synapses est établi, la survie des neurones dépend de la capacité de ces connexions à faire preuve de leur fonctionnalité ; l'absence de circulation d'information nerveuse à travers une synapse entraîne l'autodestruction des neurones qui la composent. En quelques jours, plus de la moitié des neurones meurent. Disparaissent ainsi les neurones dits « inutiles » ou « dangereux ». Le contrôle de la vie et de la mort cellulaire par des signaux de l'environnement joue un rôle dans ces signaux d'auto-organisation, sélectionnant parmi toutes les interactions neuronales initialement possibles, celles qui réussissent à faire preuve de leur capacité à fonctionner (Verhage *et al.*, 2000). Ce sont des mécanismes semblables qui permettent la sculpture et la complexité de notre système immunitaire.

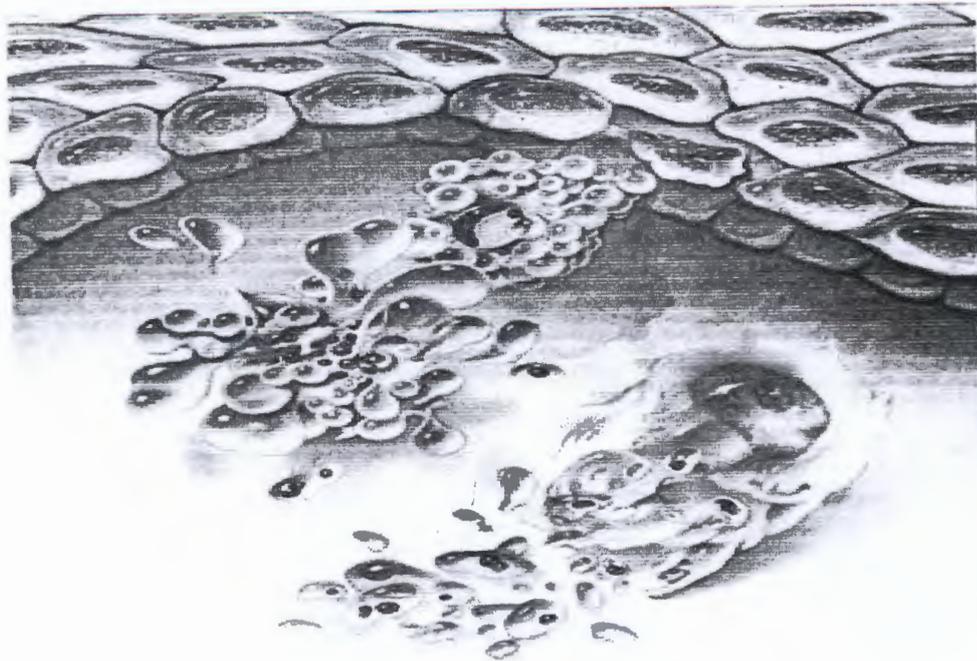


Fig.1. Destruction des cellules par le phénomène de l'apoptose (Kerr et al ., 1972) .

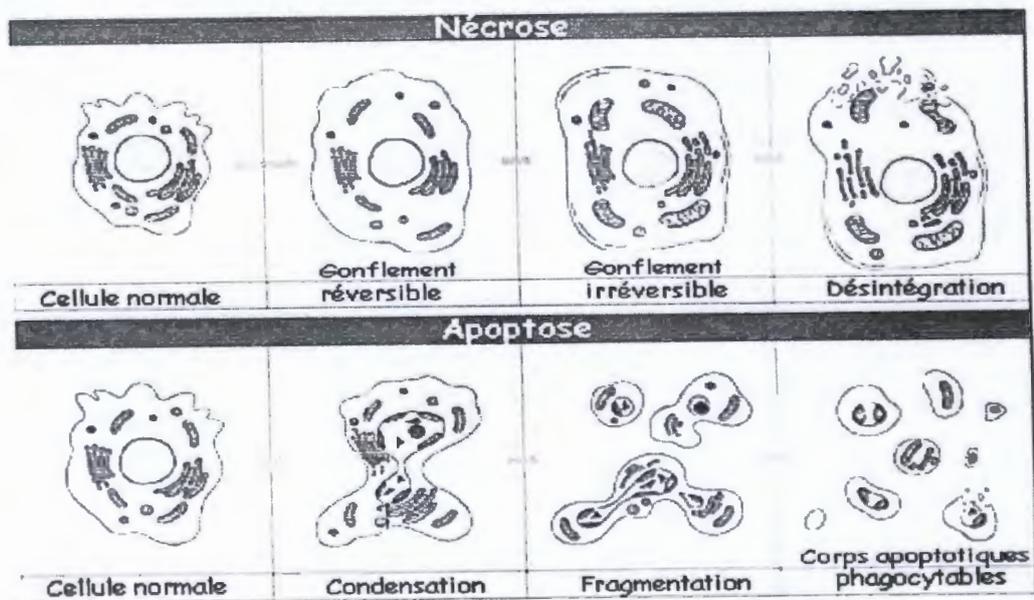


Fig.2. Comparaison morphologique entre nécrose et apoptose (Kerr et al ., 1972) .

Tab.3. Comparaison biochimique et morphologique de l'apoptose et de la nécrose.

	Apoptose	Nécrose
Origine du terme	du Grec apo « loin de » et ptôsis « chute »	du Grec nekors «mort »
Causes	Mort cellulaire physiologique « naturelle » par suicide provoqué par la mise en marche d'un programme génétique en réponse à des signaux extra et intracellulaire (autodestruction sur commande).	Mort cellulaire pathologique « accidentelle » par meurtre provoqué par une agression physique ou chimique de l'environnement cellulaire
Morphologie	<p>1- Bourgeonnement de la membrane plasmique, condensation et fragmentation de la cellule et de son noyau (avec condensation chromatinienne et fragmentation de l'ADN spécifique) en corps apoptotiques, vésicules contenant des organites structurellement intacts, sans rupture membranaire (Yang et al., 1997)</p> <p>2- Phagocytose des corps apoptotiques par des macrophages et autres cellules spécialisées ou non, sans déversement du contenu cellulaire dans le milieu environnant et sans réaction inflammatoire ; les corps apoptiques non phagocytés peuvent provoquer une nécrose secondaire</p>	<p>1- Gonflement et éclatement de la cellule et de ses organites par rupture membranaire</p> <p>2- Déversement du contenu cellulaire dans le milieu environnant provoquant une réaction inflammatoire</p>
Biochimie	<p>1- Processus actif, requit de l'énergie, nécessitant la synthèse de protéines spécifiques</p> <p>2- Au cours de la condensation cellulaire : perte des contacts cellulaires avec les cellules voisines ; translocation des phosphatidyl_sérines de la face externe de la membrane plasmique, permettant la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes ; activation des transglutaminases (enzymes créant des « liaisons croisées »entre protéines)</p> <p>3_ libération par les mitochondries de divers facteurs (cytochrome C, AIF)</p> <p>4_ activation de la cascade des caspases</p> <p>5_ au cours de la condensation nucléaire : fragmentation spécifique de l'ADN (clivage internucléosomique(Thomas et al ., 2004)</p>	<p>1-Processus passif, ne requérant pas d'énergie</p> <p>2- Perte de la régulation de l'homéostasie cellulaire de l'eau et des ions</p> <p>3- Fragmentation aléatoire de l'ADN (Thomas et al ., 2004)</p>
NATURE	Mort silencieuse par « implosion »	Mort bruyante par « explosion »



Fig.3. Différentiation incomplète de deux orteils du fait d'une activité apoptotique défectueuse



CHAPITRE - II

MÉCANISME MOLÉCULAIRE

DE L'APOPTOSE

1. Aspect général

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 (Duvall et Wyllie, 1986). Les mitochondries des cellules apoptotiques subissent des modifications majeures telles que:

- Diminution du potentiel membranaire mitochondrial.
- Modification de la perméabilité membranaire mitochondriale (Marchetti et al., 1996 ; Zamzami et al., 1996) et relargage du cytochrome C (Kluck et al., 1997 ; Yang et al., 1997) .

Après la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, les cellules atteignent un point de non retour, la chromatine se condense en amas volumineux . 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 al., 1984) donnant un profil caractéristique dit en « barreaux d'échelles » 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, les 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 phosphatidylsérine du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique (Platt et al., 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 » (figure 4).

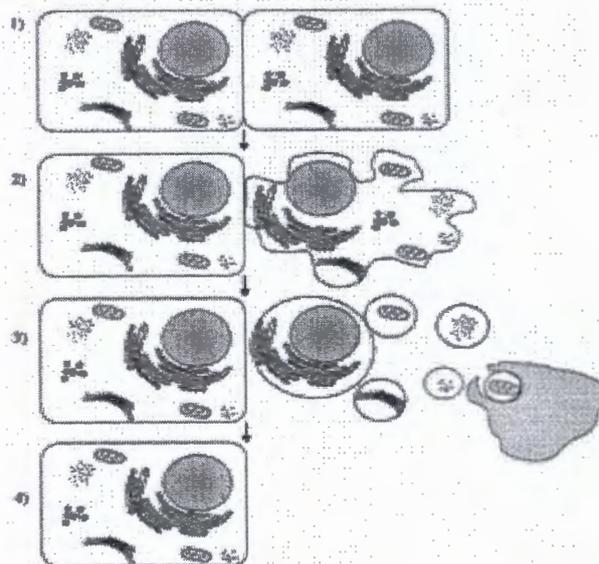


Fig.4. Une cellule enclenche un processus apoptotique.

2. Les inducteurs d'apoptose

Il y a deux types d'inducteurs, à savoir :

- ✓ Les inducteurs négatifs ce sont les suppresseurs des facteurs de survie tels que les facteurs de croissance, les cytokines, certaines hormones, lorsque ces facteurs de survie sont présents, la machinerie apoptotique est maintenue à l'état inactive ; leur privation la déprime.
- ✓ Les inducteurs positifs, les ajouts de facteurs de mort:

- Les lésions d'ADN (stress génotoxique) par oxydants , rayons X, agents chimiothérapeutiques, des molécules qui par contact intercellulaire, en se liant à leurs récepteurs membranaires, parmi ces molécules qui déclenchent l'apoptose, on a:

- Les cytokines , le TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha)ligand du TNFR (TNF receptor) et la lymphotoxine (TNF β , ligand du même récepteur).
- Le fas ligand .

- Par ailleurs l'apoptose peut être induite par l'activité protéolytique des granzymes. Ces enzymes protéolitiques sont contenues dans des granules cytoplasmiques (lymphocytes T cytotoxiques) : Libérés , ils pénètrent dans la cellule cible (tumorale ou infecté par des virus) à travers les canaux transmembranaires formés par des molécules de perforines polymérisées (Moussard , 2005).

3. Les voies de l'apoptose (Les mécanismes généraux de l'apoptose):

A ce jour, Il existe deux grands sentiers par les quels l'apoptose peut être induite dans une cellule (Figure 5).

Le premier, est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort . Une autre voie appelé voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. Ces deux voies de signalisation aboutissent toutes les deux à l'activation des caspases, famille de protéases ayant un rôle clé dans l'apoptose. Cependant d'autres voies de signalisation s'ajoutent à celles précédemment décrites ; la voie indépendante des caspases met en jeu une protéine mitochondriale appelée AIF (Apoptosis Inducing Factor). Et, outre la mitochondrie, le réticulum endoplasmique apparaît comme un compartiment cellulaire déclencheur de l'apoptose en cas de stress. Bien que les événements initiaux menant à l'apoptose diffèrent dans chacun des cas et seront expliqués un peu plus loin, les deux premier sentiers ont en commun de mener à l'activation des caspases, ce qui constitue le point de non-retour pour la cellule: Si les caspases sont activées, la mort est inévitable. Si les caspases sont absentes de la cellule ou rendues inactives, l'apoptose est très ralentie, voire même complètement inhibée (Earnshaw et al ., 1999).

- **Le sentier extrinsèque:** Le sentier extrinsèque de l'apoptose (Figure5) est souvent appelé le sentier des récepteurs de mort cellulaire du fait que c'est la liaison entre

un récepteur à la surface de la cellule et son ligand qui enclenche le processus. L'enclenchement de l'apoptose se fait quand un ligand se lie sur la portion N-terminal extracellulaire du récepteur. Ceci mène à la trimérisation du récepteur et son activation. Il y a alors recrutement de protéines via la portion c-terminal cytoplasmique du récepteur, parmi celles-ci des procaspases initiateuses. Ces caspases sont alors activées selon le modèle de la proximité induite. À partir de ce moment, la mort cellulaire induite par les récepteurs de mort peut emprunter deux sentiers qui varient selon le type cellulaire dans lequel l'apoptose est en train de se produire (Debatin et al., 2004) :

- Dans les cellules dites de type I, la caspase initiateuse ira activer immédiatement une caspase effectrice.
- Dans les cellules de type II, la caspase initiateuse clivera la protéine à domaine BH3 Bid (Bid: BH3-Interacting Domain death agonist) ce qui mènera au largage de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie, à l'activation d'autres caspases et à l'induction de l'apoptose (Opferman et Korsmeyer, 2003), (Figure5).

▪ **Le sentier intrinsèque:** Alors que le sentier extrinsèque est déclenché par des facteurs extérieurs à la cellule, le sentier intrinsèque a pour éléments déclencheurs des insultes intracellulaires, comme l'augmentation du niveau de ROS (Reactive Oxygen Species ; *espèces réactives d'oxygène*) des dommages d'ADN, stress du réticulum endoplasmique, l'activation d'oncogènes, etc. (Opferman et Korsmeyer, 2003). Via divers sentiers de signalisation intracellulaire, ces insultes convergent en un point dans la cellule ; La mitochondrie. Malgré que la mitochondrie soit essentielle à la vie cellulaire, elle joue une toute aussi grande part dans l'apoptose. Lorsque des signaux de mort y parviennent, il y a perméabilisation de la membrane mitochondriale et relargage de plusieurs protéines dans le cytosol, dont le cytochrome C, Smac/Diablo (Second Mitochondrial Activator of Caspases or Direct IAP Binding Protein with Low pI), EndoG (Endonucléase G) et AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Figure5).

Bien que chacune ait son rôle à jouer dans l'apoptose, seulement le cytochrome C et les protéines Smac/DIABLO ont un effet sur l'activation des caspases (Saelens et al., 2004).

4. Le rôle de la mitochondrie dans l'apoptose

4.1. La mitochondrie

Organite subcellulaire clé possédant une double membrane délimitant deux compartiments : la matrice et l'espace intermembranaire. Elle comprend un génome circulaire et des systèmes propres de transcription-traduction. La plupart des cellules eucaryotes contiennent des centaines de mitochondries. Leurs nombres, leurs tailles et leurs positions dépendent du type cellulaire et reflètent les besoins énergétiques de la cellule. Leur forme et leur changement de localisation sont associés à un transport actif *via* des interactions avec les éléments du cytosquelette. Les trois principales fonctions des mitochondries sont : la production d'énergie, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la régulation de l'apoptose.

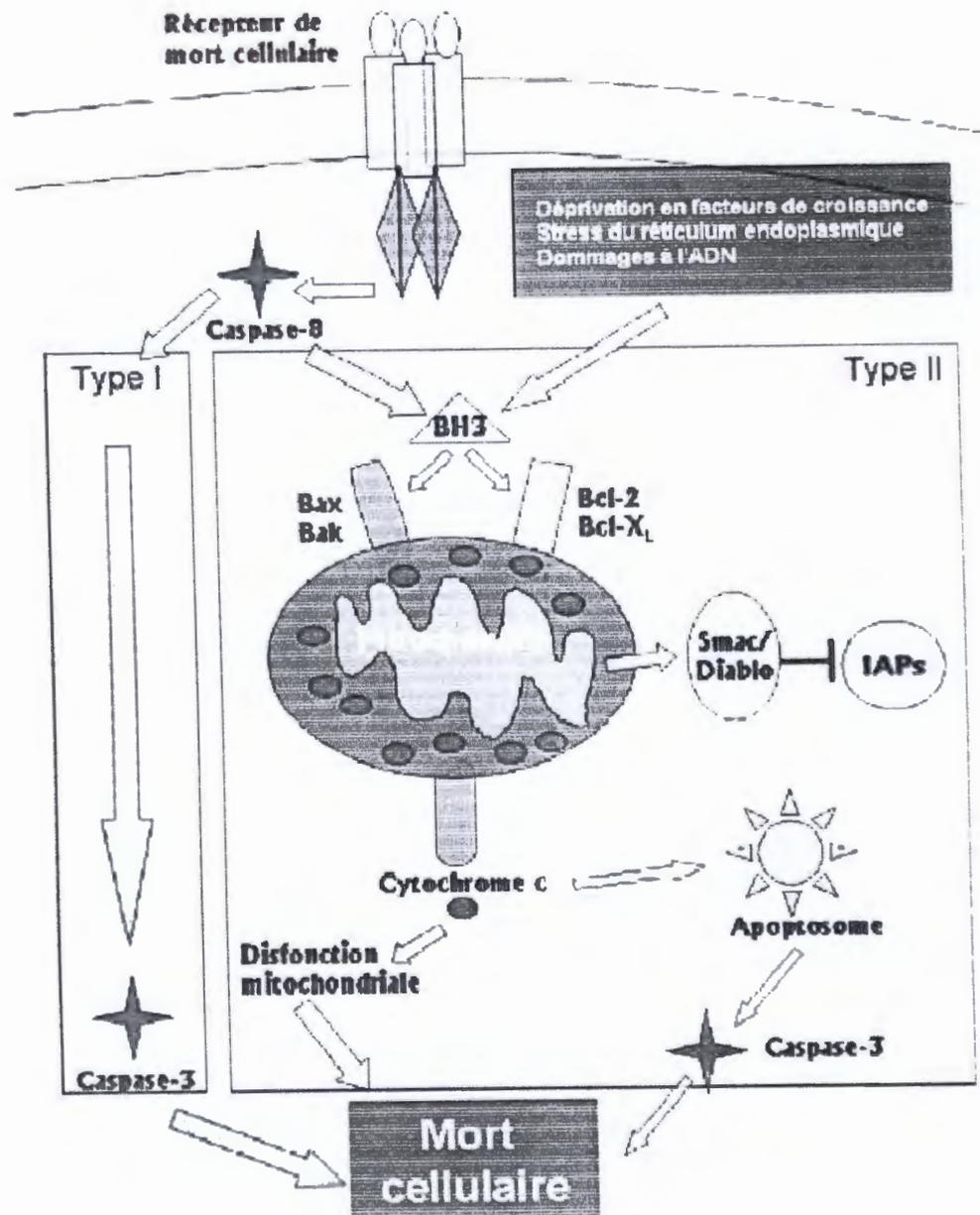


Fig. 5. Les sentiers extrinsèque (type I et II) et intrinsèque de l'apoptose

▪ Quel est son rôle dans l'apoptose ?

La mitochondrie joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose (Zamzami et al., 1996; Kroemer, 1997; Brenner et al., 1998). En effet, la phase effectrice de l'apoptose comporte l'ouverture des pores de transition de perméabilité (pores PT) des mitochondries et la libération de molécules apoptogènes telle que le cytochrome c, les caspases 2, 3 et 9 ainsi que le facteur AIF. Cette phase de libération est sous le contrôle de membres de la famille Bcl-2 (B Cell Lymphoma protein 2). Ainsi, Bcl-2 est capable de bloquer la sortie du cytochrome C (Kluck et al., 1997; Vander et al., 1997; Yang et al., 1997) alors que Bax (Bcl-2 Associated X protein) peut l'induire (Jurgensmeier et al., 1998). Dans la majorité des cas la libération du cytochrome C est indépendante de l'activité des caspases (Bossy-Wetzel et al., 1998).

▪ Le déclenchement du relargage des facteurs apoptogènes dans la mitochondrie

Se fait par une grande variété d'agressions toxiques, bien que les étapes initiales pas encore été élucidées (Thomas et al., 2004). Dans certains cas les cellules sont soumises à un processus de mort programmée (apoptose). Cela se manifeste par exemple: Lors des dommages irréparables de l'ADN (chimiothérapie, rayons-X, radicaux libres d'oxygène), lors de la perte de contact cellule-matrice ou cellule-cellule, ou lors de la mise en jeu d'une horloge interne dont le mécanisme moléculaire est encore mal compris (les leucocytes polynucléaires ont une vie moyenne limitée à quelques dizaines d'heures, après quoi ils meurent par apoptose)

▪ Mécanisme de relargage

Nombreuses études concernant les mécanismes de relargage des protéines mitochondriales apoptogènes se sont focalisées sur le relargage du cytochrome C, le mécanisme exact de ce relargage n'est pas encore tout à fait connu mais plusieurs hypothèses sont proposées (Borner, 2003). On sait aujourd'hui que les membres de la famille de protéines Bcl-2 sont capables de former des canaux dans les membranes lipidiques : ils ont donc été les premiers candidats désignés pour la formation de pores dans la membrane externe (ME) mitochondriale afin de permettre la libération du Cyt-c. Plusieurs études ont montré que les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Bcl-2 homologous Antagonist/Killer) pouvaient s'insérer dans la membrane mitochondriale et former des oligomères avec des pores assez larges pour permettre le passage du Cyt-c (Korsmeyer *et al.*, 2000). Ceci a été démontré sur des liposomes et des mitochondries isolées où l'incubation avec les protéines proapoptotiques Bax, Bad (Bcl-2 Antagonist of cell Death protein) ou Bid (BH3-Interacting Domain death agonist) déclenche une perméabilisation des membranes mitochondriales. Bax et Bid peuvent s'associer pour former des pores au niveau de la membrane externe mitochondriale. Bad et une autre protéine proapoptotique, Bim (Bcl-2-Interacting Mediator of cell death), sont aussi capables de migrer du cytoplasme vers la mitochondrie. D'autres membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2 sont capables d'empêcher le relargage du Cyt-c en interférant avec Bax et Bak dans la formation des pores.

Concernant le déclenchement de la perméabilisation des membranes mitochondriales, plusieurs mécanismes pourraient coexister qui font tous intervenir la

protéine proapoptotique Bax : La protéine Bax (figure 6.1) s'ancre dans la membrane externe mitochondriale induisant la formation d'un pore assez large pour permettre la sortie du Cyt-c. Cet ancrage pourrait s'effectuer par liaison directe avec un lipide ou une protéine membranaires, ou bien par un changement conformationnel lui permettant d'une part son ancrage à la membrane mitochondriale et d'autre part la formation d'un pore (Borner, 2003).

Une autre hypothèse décrit une oligomérisation de Bax dans la membrane externe mitochondriale (figure 6.2) (Borner, 2003). En effet, une mutation au niveau du domaine d'oligomérisation de Bax ou de Bak inhiberait leur fonction pro-apoptotique (Antonsson et Martinou, 2000). Ainsi, la multimérisation de Bax pourrait favoriser son changement conformationnel.

Bax pourrait également se lier à des canaux déjà présents à la surface de la membrane externe mitochondriale (figure 6.3). Le pore de transition de perméabilité (PTPC ou pore transition permeability complex) est un complexe polyprotéique localisé au point de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe. Les principaux composants de ce complexe, qui pourraient varier en fonction du type cellulaire ou de l'état physiologique, sont le translocateur ANT (Adenine Nucleotide Translocator), le « voltage-dependent anion channel » ou porine (VDAC) protéine la plus abondante de la membrane externe mitochondriale, une hexokinase (HX) et la cyclophiline D (Cyp D) (Zamzami et Kroemer, 2001). La chute du potentiel membranaire serait la conséquence de l'ouverture du PTPC et la liaison de Bax régulerait la taille du pore pour permettre la sortie de molécules d'un poids moléculaire supérieur à 1,5 Kda comme le cytochrome c (15 Kda), l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) (57 Kda) et Smac/Diablo (Second mitochondria-derived factor activator of caspases) (Borner, 2003). Ainsi le mécanisme emprunté par les molécules mitochondriales apoptogènes pour s'échapper de la mitochondrie n'est pas encore bien connu, mais il fait suite à la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire. Parmi les facteurs apoptogène relargés dans le cytoplasme, on site :

4. 1.1. Le cytochrome C

Le cytochrome c est une protéine participant normalement dans le transport des électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale dans l'espace inter membranaire (Saelens et al, 2004). En conditions apoptotiques, il existe trois mécanismes par lesquels le cytochrome c peut être relargué hors de la mitochondrie. Premièrement, il peut y avoir formation de pores dans la membrane externe de la mitochondrie par les protéines Bax(Bcl-2 Associated X protein) et Bak (Bcl-2 homologous Antagonist/Killer). Deuxièmement, le cytochrome c peut être largué par des pores déjà existants dans la membrane externe. Et troisièmement, il pourrait y avoir une altération de l'arrangement des lipides dans la membrane externe de la mitochondrie (Sharpe et al, 2004). Le cytochrome C se retrouve alors dans le cytosol où il s'associe avec le domaine c-terminal de la protéine Apaf-1 (Apoptotic-protease-activating-factor 1). L'association entre le cytochrome C et Apaf-1 facilite le recrutement d'ATP. La protéine Apaf-1 contient un domaine CARD(Caspase Recruitment Domain) dans sa région N-terminal, par lequel elle recrute la procaspase-9, ce qui mène à l'activation de la procaspase-9, une caspase initiatrice, selon le modèle de la liaison à une sous unité régulatrice. Ce complexe de

IMDa , appelé l'apoptosome, contient sept molécules de Apaf-1, de cytochrome c et caspase-9 (Acehan et al, 2002). C'est tout ce complexe qui activera les caspases effectrices, particulièrement ici la caspase-3 (figure 7).

4.1.2. Smac/DIABLO et Omi/HtrA2

Smac/DIABLO (Smac pour la protéine humaine, et DIABLO pour la protéine murine) et Omi/HtrA2 (high-temperature requirement factor) sont également des protéines qui résident en temps normal dans la mitochondrie. Lorsque survient un stress apoptotique dans la cellule, ces protéines sont relarguées dans le cytosol. Contrairement au cytochrome c dont le rôle est d'activer la procaspase-9, Smac/DIABLO a comme tâche d'inhiber les IAP dans la cellule. Les IAP sont des protéines inhibitrices des caspases. Smac/DIABLO participe donc indirectement à l'activation des procaspases, en empêchant leurs inhibiteurs de faire leur action et en envoyant même certaines IAP(Inhibitor of Apoptosis Protein) vers le protéasome pour la dégradation. Omi/HtrA2, tout comme Smac/DIABLO, se lie aux IAP pour les inhiber. Par contre, elle est en plus capable de les inactiver par clivage (Shiozaki et al, 2004). Bien que Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 soient toutes deux capables de lier les membres de la famille des IAP, leur spécificité pour chacune d'elles diffère. Non seulement y a-t-il donc une synergie entre ces deux protéines pour inactiver les IAP(Inhibitor of Apoptosis Protein), il y a également une synergie avec le cytochrome C pour aider au maintien de l'activation des caspases. Puisque la sortie de diverses protéines hors de la mitochondrie est une étape si importante dans l'apoptose, il n'est pas surprenant de voir qu'il existe dans la cellule des protéines veillant au contrôle de l'intégrité mitochondriale. Une famille de protéines est particulièrement importante pour réguler ce phénomène , la famille de protéines Bcl-2.

5. Les membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 ont une importance cruciale dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire.

Les membres de la famille Bcl-2 (B Cell Lymphoma protein 2) contrôlent l'intégrité de la membrane mitochondriale. Chaque protéine a son rôle à jouer dans le processus apoptotique. Les membres de cette famille se divisent en deux groupes, les pro-apoptotiques, et les anti-apoptotiques (Strasser, 2005), (figure8).

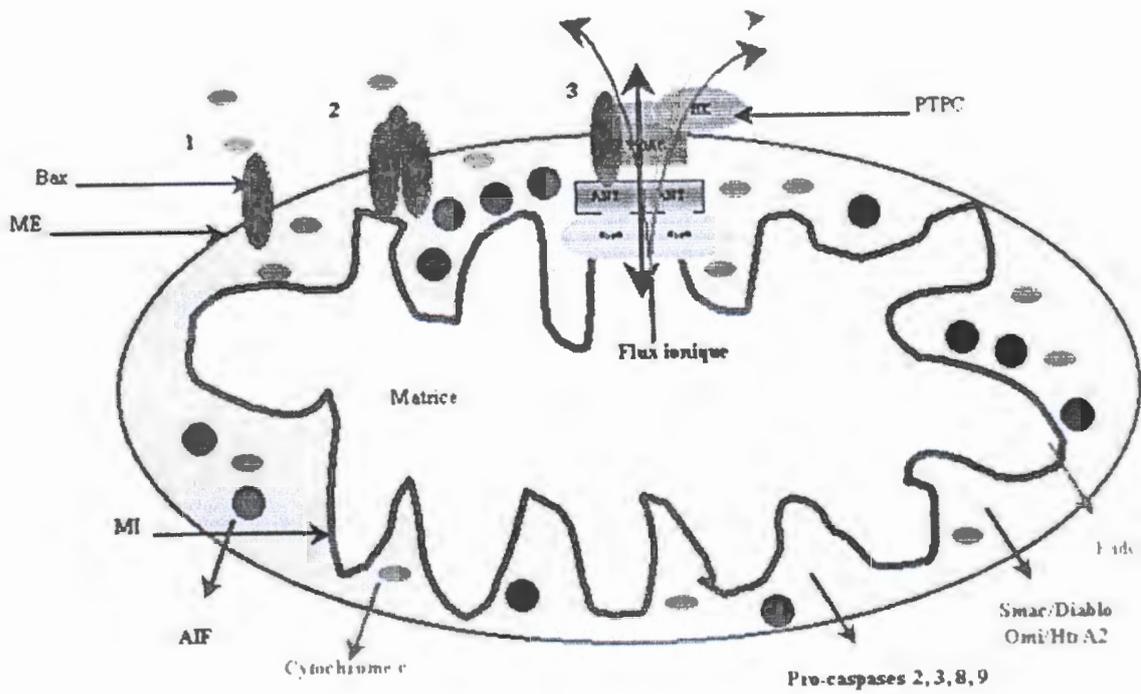


Fig .6. Mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales.

5.1. Les anti-apoptotiques

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1, Boo/DIVA et Mcl-1; Bcl-2 et Bcl-xL étant les membres les mieux connus (Strasser, 2005). Tous partagent certaines caractéristiques, entre autre une région c-terminal d'environ 20 acides aminés hydrophobes. Bien que cette région démontre peu d'homologie au niveau de la séquence en acides aminés entre les membres de la famille, elle est essentielle pour assurer l'ancrage de ces protéines aux membranes des organites (Schinzel et al, 2004). Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 possèdent quatre domaines BH, de BH1 à BH4 (sauf Mcl-1 qui en possède seulement deux) (Strasser, 2005). Les domaines BH1, BH2 et BH3 forment un sillon hydrophobique dans lequel un domaine BH3 d'une autre protéine peut se lier (Sattler et al., 1997). Parmi les Bcl-2 antiapoptotique, on peut citer :

Bcl-2 et Bcl-xL : Bcl-2 a été initialement identifiée au point de coupure de la translocation dans les lymphocytes B malignes (Tsujimoto et al, 1985, Cleary et al.,1985, Bakhshi et al, 1985). Bcl-2 se trouve associée à la face cytoplasmique de la membrane de trois organites dans la cellule : la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire, autant en conditions normales que suite à un stress (Nguyen et al, 1993, Lithgow et al., 1994).

La surexpression de Bcl-2 bloque presque tous les stimuli apoptotiques passant par la mitochondrie, la sortie du cytochrome c étant abolie. Bcl-2 inhibe également l'activation de Bax (Murphy et al., 2000). Il n'est donc pas surprenant que dans le processus apoptotique, différents mécanismes visent à réduire l'action de cette protéine. Par exemple :

- Bcl-2 peut être clivée par la caspase-3 (Kirsch et al., 1999). Bcl-2 peut également être phosphorylée par JNK(c-jun N-terminal Kinase), (Yamamoto et al.,1999), p38 (Torcia et al.,2001), Cdc 2 (Furukawa et al.,2000) et Cdc42 (Thomas et al, 2000), ce qui la rend inactive.

- Bcl-xL, quant à elle, démontre une spécificité pour la membrane externe de la mitochondrie (Kaufmann et al., 2003). Tout comme Bcl-2, Bcl-xL inhibe la sortie du cytochrome c et l'activation de Bax. Bien que moins étudiée que Bcl-2, il a été démontré que tout comme elle, Bcl-xL pouvait être phosphorylés par JNK et que cela menait à son inactivation (Kharbanda et al., 2000).

5.2. Les pro-apoptotiques

Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 se divisent en deux sous-familles: Les protéines à multiple domaines BH et les protéines contenant seulement le domaine BH3.

5.2.1.Les protéines à multiples domaines BH: Les membres du groupe des multiples domaines BH sont Bok, Bcl-xS, Bcl-GL, Bfk, Bak et Bax. Elles possèdent trois des quatre domaines BH, soit BH1, 2 et 3, sauf Bcl-xS qui contient seulement les domaines BH3 et BH4, et Bcl-GL et Bfk qui comprennent les domaines BH2 et BH3 (Strasser, 2005). Bok, contrairement aux autres, semble être exprimée dans seulement

quelques tissus particuliers (Hsu et al., 1997, Ha et al., 2001, Itoh et al., 2003). Peu de choses sont connues sur les mécanismes par lesquels Bcl-xS, Bcl-GL, Bfk et Bok induisent l'apoptose. C'est cependant différent pour Bax et Bak.

▪ **Bax et Bak:** Bax (Bcl 2 Associated X protein) et Bak (Bcl-2 homologous Antagonist/Killer) sont des protéines très importantes dans l'induction du processus apoptotique mitochondrial puisque la délétion de ces protéines inhibe la sortie du cytochrome c de la mitochondrie (Wei et al., 2001). Bak est située dans la membrane externe de la mitochondrie où elle est maintenue dans un état monomérique inactif via son interaction avec la protéine VDAC2 (Voltage-Dependent Anion Channel 2) (Cheng et al., 2003). Bax est quant à elle maintenue inactive dans le cytosol des cellules saines (Tsuruta et al., 2004, Sawada et al., 2003). Suite à un stress apoptotique, elle est activée et est transloquée vers la mitochondrie pour s'insérer dans la membrane externe où elle forme des complexes multimériques pouvant servir de pores pour la sortie du cytochrome c (Basanez et al., 1999, 2002). Plusieurs mécanismes pourraient être responsables de l'activation de Bax. La protéine p53 s'associe avec Bax pour induire un changement de conformation et mener à son activation (Chipuk et al., 2004). Les protéines BH3 Bid, Bim et PUMA(p53-Upregulated Modulator of Apoptosis) seraient également capables d'induire l'activation de Bax (Cartron et al., 2004).

5.2.2. Les protéines à domaine BH3 seulement

Comme leur nom l'indique, les protéines BH3 ont comme seule homologie avec les autres membres de la famille Bcl-2 leur domaine BH3, un petit domaine de 9 à 16 acides aminés (Strasser, 2005). Toutes peuvent induire l'apoptose lorsqu'elles sont surexprimées et cette apoptose est dépendante de Bax et/ou Bak et requiert un domaine BH3 intact autant sur Bax et/ou Bak que sur les protéines BH3 (Huang et Strasser, 2000, Zong et al., 2001). Chacune des protéines BH3 réside dans un compartiment cellulaire distinct et répond à un stimulus apoptotique précis (Opferman et Korsmeyer, 2003). Suite à ce stimulus, elles se dirigent vers la mitochondrie où elles interagissent avec les protéines à multiples domaines BH. Certaines protéines BH3 interagissent avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak pour les activer, d'autres avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL pour les inactiver, et certaines seraient capables d'interagir autant avec les pro-apoptotiques qu'avec les antiapoptotiques.

▪ Bid(BH3-Interacting Domain death agonist)

La protéine Bid a été découverte en 1996 par le groupe de Korsmeyer (Wang et al., 1996). Son gène se trouve sur le chromosome 22 humain et 6 murin (Footz et al., 1998). Elle est exprimée dans presque tous les tissus. Bid contient huit hélices- α organisées de façon à ce que deux hélices hydrophobiques centrales soient entourées par les six autres. Elle est régulée par un procédé de phosphorylation et de façon plus importante par un clivage. Le clivage de Bid est effectué soit par la caspase-8 ou la Granzyme B pour générer un fragment plus court, tBid (Truncated Bid = bid tronquée) (Li et al., 1998, Barry et al., 2000). Le clivage expose le domaine BH3, ce qui change la charge de surface et l'hydrophobicité de la protéine, causant donc la translocation du fragment tBid vers la mitochondrie et son insertion dans la membrane externe (Donnell et al., 1999).

Bid est la protéine BH3 qui a le plus souvent été associée à l'activation de Bax et/ou Bak plutôt qu'à l'inhibition des membres pro-apoptotiques, bien qu'elle soit capable de s'y lier.

- **Rôle de Bid** : Le rôle de Bid a été étudié surtout dans le contexte des récepteurs de mort cellulaire, où son clivage par la caspase-8 enclenche le sentier mitochondrial de l'apoptose. Cependant, Bid peut être clivée en aval de la mitochondrie par la caspase-3 à l'Asp-59 en réponse aux rayons UV, à la staurosporine, à la cycloheximide et à l'étoposide. Ce phénomène est une boucle d'amplification de l'apoptose qui suit la sortie initiale du cytochrome C (Slee et al., 2000). Bid serait également clivée par la calpaïne suite à des traitements au cisplatine (Mandic et al., 2002).

▪ **Bad (Bcl-2 Antagonist of cell Death protein)**

Bad fut la première protéine BH3 à être découverte en 1995 par le groupe de Stanley Korsmeyer (Yang et al., 1995). Le gène isolé du rat compte quatre exons. Il existe deux variants d'épissage de l'ARNm de Bad dans les tissus de rat. Ceux-ci donnent naissance à deux protéines : Bad- α (S) et Bad- β (L). Elles diffèrent dans leur région c-terminal mais contiennent toutes deux le domaine BH3. Bad- α (S) est toujours plus abondante que Bad- β (L) ; donc lorsqu'il sera question de Bad, il sera sous-entendu que c'est à l'isoforme- α (S) que l'on fait référence (Hamner et al., 2001). La majorité de la régulation de Bad se fait au niveau post-traductionnel, majoritairement par phosphorylation, bien qu'elle puisse être clivée par les caspases, particulièrement la caspase-3, amplifiant ainsi sa fonction pro-apoptotique (Condorelli et al., 2001, Kim et al., 2002, Benetti et al., 2003).

- **Rôle de Bad**: En général, Bad a été impliquée dans l'apoptose induite par la déprivation en facteurs de croissance dans plusieurs types de cellules, particulièrement les neurones et les cellules du système immunitaire. La protéine Bad, lorsque déphosphorylée est capable d'agir seulement avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. La protéine Bad est considérée comme une facilitatrice de l'apoptose. En inactivant les protéines anti-apoptotiques se trouvant à la mitochondrie, elle les empêche de se lier à Bax et/ou Bak ce qui facilite la sortie du cytochrome C de la mitochondrie (Datta et al., 2002). Longtemps considérée comme une molécule apoptotique latente dans les cellules saines, de récentes études démontrent que Bad est en fait une protéine pro survie avant d'être une protéine pro-apoptotique, un peu comme le cytochrome C, qui est une protéine essentielle dans la mitochondrie, mais qui devient toxique quand elle est larguée dans le cytosol. En effet, Bad permettrait l'assemblage du complexe de la glucokinase, permettant ainsi l'utilisation du glucose par les cellules, lui attribuant ainsi un rôle clé dans le métabolisme (Danial et al., 2003).

▪ **Bim/BOD: (BOD = Bcl-2 Ovarian Death synonyme de Bim)**

Les protéines Bim (Bcl-2-Interacting Mediator of cell death) sont sans doute les plus complexes des protéines BH3 à cause de leur patron d'expression. On compte 18 isoformes résultant d'épissage alternatif (Ley et al., 2005). Le patron d'expression varie selon l'espèce et le type cellulaire, cependant, trois isoformes sont plus communes :

BimEL(Bim isoforme extra-longue) , BimL(Bim isoforme long) et BimS(Bim isoforme courte). Toutes possèdent une queue hydrophobique, qui permet l'insertion dans les membranes, et le domaine BH3. Bim est exprimée dans les lignées myéloïdes, lymphoïdes, épithéliales, neuronales, fibroblastiques et germinales, avec une prédominance pour l'isoforme BimEL, tandis que BimS est exprimée à de très bas niveau ou carrément indétectable (O'Reilly et al., 2000, Liu et al., 2002). BimEL et BimL sont séquestrées par la chaîne légère 1 de la dynéine sur le réseau de microtubules de la cellule, ce qui n'est pas le cas pour BimS (Puthalakath et al., 1999, Day et al., 2004, Adachi et al., 2005). Leur capacité à causer l'apoptose diffère également, cela étant régulé soit par la liaison à la chaîne légère 1 de la dynéine ou à la suite de modifications post-traductionnelles. N'étant pas séquestrée par les microtubules, BimS est la plus dangereuse car elle peut aller directement à la mitochondrie suite à un stress apoptotique. BimL et BimEL doivent être libérées de DLC1(Dynein Light Chain 1) avant de migrer vers la mitochondrie. JNK(c-jun N-terminal Kinase) est la kinase responsable de ce phénomène.

Bim est capable de se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Chen et al., 2005). Bim serait également capable de se lier à Bax et Bak, cependant c'est une possibilité très controversée puisque son interaction avec Bak *in vivo* n'a jamais été démontrée, et les essais *in vitro* avec des peptides ne reflètent pas les concentrations de protéines retrouvées dans la cellule (Marani et al., 2002, Strasser, 2005).

- **Rôle de Bim/BOD** : Jusqu'à maintenant, Bim a été impliquée dans l'apoptose des neurones suite à une réduction en NG(Nerve Growth Factor), mais son rôle le plus important est certainement dans le système immunitaire où Bim est requise pour induire l'apoptose des lymphocytes B et T auto réactifs (Putcha et al., 2001 ; Biswas et al., 2002 ; Bouillet et al., 2002).

▪ PUMA/BBC3

PUMA(p53-Upregulated Modulator of Apoptosis) aussi connue sous le nom de BBC3(Bcl-2 Binding Component 3), a été identifiée en 2001 par trois groupes par la méthode de double hybride avec Bcl-2 comme appât et suite à un dépistage visant à identifier des gènes cibles de la protéine p53 (Han et al., 2001, Nakano et Vousden, 2001 et Yu et al., 2001).

Le gène humain de PUMA compte quatre exons et est situé sur le chromosome 19. Il existe quatre isoformes de la protéine PUMA chez l'humain soit PUMA- α , - β , - δ et - γ , par contre seulement les deux premières contiennent un domaine BH3 (Nakano et Vousden, 2001). Chez les rongeurs, la forme PUMA- α est la seule identifiée jusqu'à présent; par conséquent, lorsqu'il sera question de PUMA, il sera sous-entendu que l'on réfère à l'isoforme PUMA- α (Yu et al., 2001 ; Itoh, 2003).

Lors de sa découverte, PUMA semblait être exprimée seulement suite à un stress causant une accumulation de p53, par exemple des agents causant des dommages à l'ADN comme l'étoposide, et qu'elle était sous son contrôle transcriptionnel. Le rôle d'exécutrice de l'apoptose induite par p53 lui a donc été attribué. Très peu de choses sont connues sur la régulation post traductionnelle de PUMA, aucune phosphorylation ou clivage n'ayant été démontré jusqu'à présent. Une fois exprimée, elle est trouvée exclusivement dans mitochondrie, grâce à son domaine BH3, où elle démontre une très

bonne affinité de liaison pour toutes les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Nakano et Vousden, 2001, Chen et al., 2005).

PUMA pourrait également activer Bax puisqu'un peptide correspondant à la région BH3 de PUMA est capable d'interagir avec la première hélice- α de Bax, induisant ainsi un changement de conformation de Bax similaire à celui requis pour son activation (Cartron et al., 2004). PUMA est impliquée dans l'apoptose induite par l'hypoxie, les agents endommageant l'ADN, le stress du réticulum endoplasmique, la déprivation en sérum et de façon plus importante.

- **Noxa:** La protéine Noxa a été identifiée en 2000 par le groupe de Tanaka suite à des expériences de détection de l'expression différentielle des ARNm visant à trouver un facteur responsable de l'apoptose dépendante de p53 en réponse à des dommages à l'ADN. Noxa est exprimée en faible quantité dans les tissus suivants : Le cerveau, le thymus, la rate, les poumons, les reins et les testicules de la souris, et son expression augmente considérablement suite à des dommages à l'ADN. Son gène compte 3 exons, et contrairement à tous les autres membres de la famille Bcl-2, la protéine Noxa de souris contient deux domaines BH3 (la version humaine en contient un seul). Tout comme PUMA, elle possède un site de liaison pour p53 dans sa séquence promotrice. Noxa se trouve à la mitochondrie (Oda et al., 2000). Par contre, il est clair que Noxa est incapable de lier Bax suite aux dommages à l'ADN et qu'elle peut exclusivement lier les molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Kuwana et al., 2005). Noxa est impliquée dans la réponse apoptotique suite à une infection virale (Sun et al., 2005). Finalement, Noxa peut être induite lorsque le protéasome est inhibé via un mécanisme indépendant de p53 (Qin et al., 2005, Fernandez et al., 2005). Aucune modification post-traductionnelle n'est connue pour Noxa.

- **Autres:** Parmi les autres membres moins connus de la famille des protéines BH3 on retrouve Bmf (Bcl-2 Modifying Factor). Elle fonctionne un peu comme Bim, mais elle est située sur le moteur myosine de l'actine via son interaction sur la chaîne légère 2 de la dynéine (Day et al., 2004). Elle possède également des isoformes issues d'épissage alternatif, Bmf-II et Bmf-III. Cependant ces isoformes n'ont pas d'effet pro-apoptotiques (Morales et al., 2004 ; Zhu et al., 2005b).

L'intervention des différents membres de bcl-2 dans le processus apoptotique et sa régulation est résumée par la figure9.

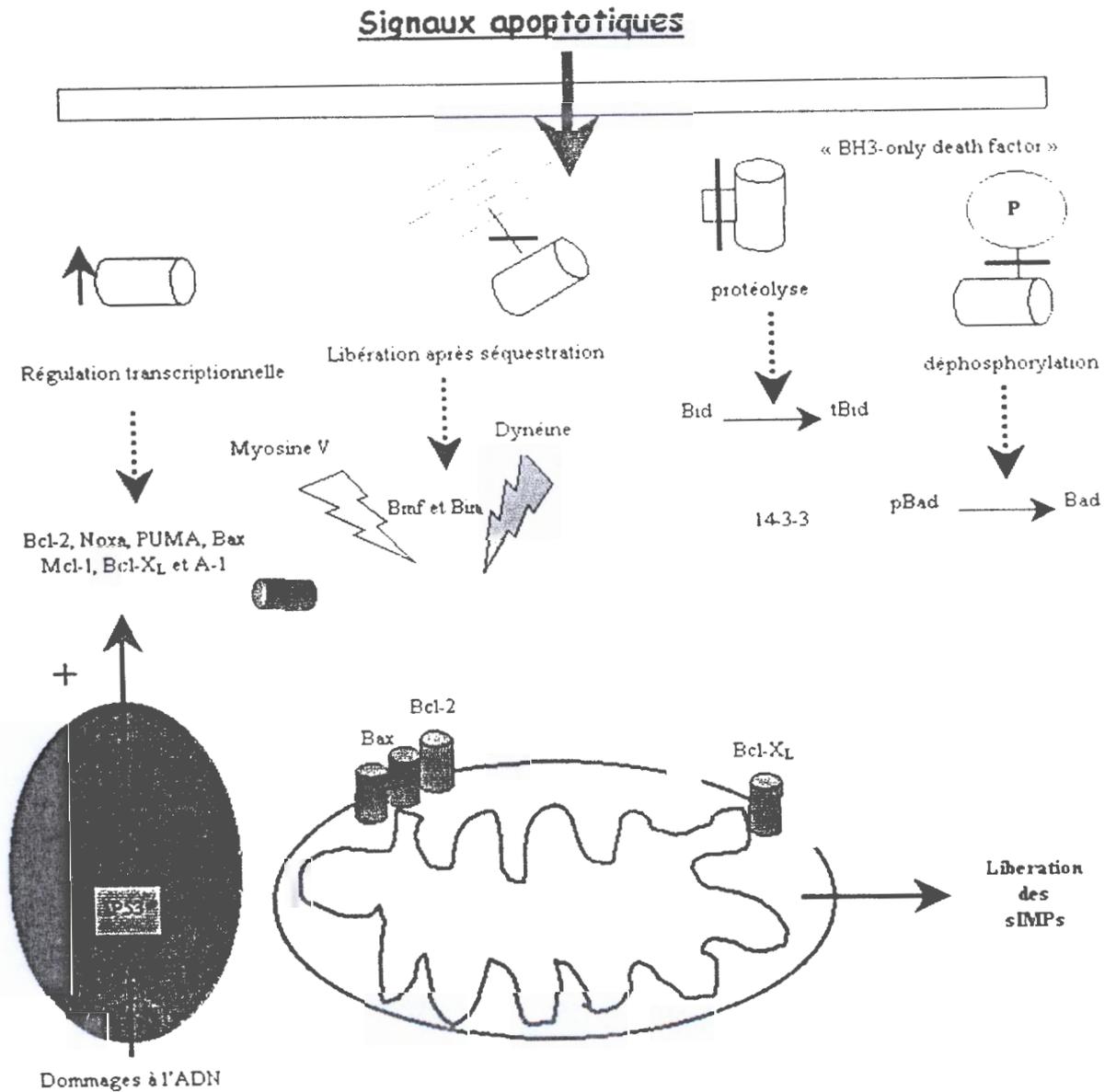


Fig.9. Régulation de l'apoptose par les membres de la famille B

6. Les protéines intervenant dans l'exécution de l'apoptose

6.1. Les caspases

Le terme « caspase » fait référence à une famille de protéases, extrêmement conservées au cours de l'évolution, possédant une cystéine dans leur site actif et clivant leurs substrats après un résidu acide aspartique, d'où le terme caspase, Cystein-ASpartate proteASE.

Le rôle des caspases est principalement exécutif, c'est-à-dire qu'elles vont s'attacher à éteindre les voies protectrices et à activer des molécules qui vont participer à la destruction cellulaire.

a-Nomenclature :

Comme nous l'avons déjà noté, ced-3 code pour une protéase à cystéine homologue à ICE (pour interleukin-1 converting enzyme) (Thornberry et al., 1992). Les protéases apoptogènes sont des protéases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leur substrat après un résidu d'acide aspartique. Cette spécificité de clivage n'est partagée qu'avec une seule autre protéase, le granzyme B (une sérine protéase présente dans les lymphocytes T cytotoxiques).

Une nouvelle nomenclature regroupe désormais les protéases apoptogènes sous le nom de CASPASE (Alnemri et al., 1996). Le C représente la cystéine du centre act et *aspase* définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique. À ce jour 14 caspases ont été identifiées mais il ne fait aucun doute que cette liste n'est pas exhaustive.

b-Structure :

Les caspases sont des enzymes extrêmement sélectives. Ainsi, une analyse sur gel bi-dimensionnel d'extraits obtenus à partir de cellules vivantes ou bien de cellules en apoptose n'a révélé que de faibles modifications dans le profil global (Robaye et al., 1994; Amess et Tolkovsky, 1995; Gerner et al., 1998; Kaufmann, 1989). Les protéines cibles doivent impérativement posséder un aspartate en position P1 (Sleath et al., 1990; Howard et al., 1991). Cet aspartate sera niché dans une poche (désignée site S1) et sera ainsi alignée avec Arg179, Gln283, Arg341 et Ser347 (numérotation correspondant à la caspase 1). Cette structure est conservée chez toutes les caspases humaines (à l'exception de Ser347 qui est remplacée par une Thr dans la caspase 8) (figure 10). Toutes les caspases ont une structure très conservée comprenant, un prodomaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (17-21 kDa), qui porte le centre actif et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité (10-14 kDa).

Certains membres de la famille des caspases possèdent un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité. Les prodomaines sont variables, à la fois dans leur taille et dans leur séquence. Ainsi les caspases 3, 6 et 7 ont un petit prodomaine alors que les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 possèdent un grand prodomaine. Les caspases à petits prodomaines sont souvent regroupées sous le nom de caspases effectrices. Ces caspases sont activées par des caspases dites initiatrices. Les prodomaines semblent jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines. Ainsi les prodomaines des caspases 8 et

10 contiennent des Domaines Effecteurs de Mort Cellulaire (ou Death Effector Domains : DEDs) qui sont des structures permettant la liaison de la caspase aux molécules adaptatrices FADD (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995, Hsu et al., 1995). Certaines autres caspases (caspases 1, 2, 4 et 9) possèdent un Domaine de Recrutement des Caspases (ou Caspase Recruitment Domain) CARD (Hofmann et al., 1997). Ces CARDS jouent un rôle dans l'interaction entre caspases ainsi qu'avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices .

c-Activation :

La conversion de la caspase à l'état de zymogène en une enzyme mature nécessite au moins deux clivages au niveau de liaison Asp-X. Ces clivages successifs ont lieu de manière séquentielle: Tout d'abord coupure entre la grande et la petite sous-unité (donc il y a libération de la petite sous-unité du reste de la molécule) suivie par la libération du prodomaine (figure 11). La caspase va alors pouvoir s'assembler sous sa forme active, composée de deux grandes et de deux petites sous unités. Les caspases vont pouvoir s'autoactiver et/ou être activées par d'autres caspases. Cette remarque introduit la notion de cascade d'activation. Ainsi une fois les caspases initiatrices activées, elles vont pouvoir cliver d'autres caspases encore à l'état de zymogène (notamment les caspases effectrices). Ce type d'activation en cascade permet probablement la régulation et l'amplification du signal. Cette suite d'événements est généralement divisée en trois étapes :

- Une étape d'induction qui est réversible
- Une étape d'exécution qui est régulable
- Une étape de dégradation qui est irréversible.

Il est à noter que certaines protéases n'ayant pas de spécificité pour un acide aspartique sont capables d'activer les zymogènes des caspases au moins *in vitro* (Zhou et Salvesen, 1997). Ce clivage intervient au niveau de sites alternatifs situés dans le segment de liaison entre la grande et la petite sous-unité. De plus il a été décrit que la caspase 9 pouvait être activée sans clivage (Stennicke et al., 1999). L'activation et l'activité des caspases peuvent être modulées de différentes façons (par phosphorylation, par exemple).

d-Substrats :

Les protéines cibles regroupent des protéines cytoplasmiques, nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN et des protéines kinases. De plus, des protéines impliquées dans la transduction du signal et dans l'expression de gènes, dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération dans les maladies génétiques ou des protéines de régulation de l'apoptose sont aussi substrats des caspases.

Il est toutefois à noter que certains substrats ne sont pas clivés dans tous les types cellulaires. L'actine, par exemple (Mashima et al., 1997) dans les neurones (Villa et al., 1998) et dans les thymocytes (Villa et al., 1998) mais pas dans les autres types cellulaires durant l'exécution du programme apoptotique (Song et al., 1997; Rice et al., 1998). De plus, certains substrats sont clivés à des sites différents selon le type cellulaire. Ainsi, la topoisomérase I a un profil de clivage différent selon qu'il s'agisse de cellules de cancer de poumon ou de cellules de cancer du sein (Samejima et al., 1999). Cette hétérogénéité pourrait soit refléter l'activation de caspases différentes, soit des variations dans l'accessibilité des substrats par les protéases, soit une combinaison de ces deux hypothèses.

e-Invalidation génique :

Etant donné le grand nombre de caspases ainsi que l'absence d'inhibiteur réellement sélectif d'une caspase donnée, l'implication individuelle de ces protéases apoptogènes dans la mort cellulaire programmée n'a pu être étudiée jusqu'à présent qu'en générant des animaux déficients pour l'expression de certaines d'entre elles. A ce jour, seuls les gènes codant pour les caspases 1, 2, 3, 8, 9, 11 et 12 ont été invalidés.

- **Caspases 1 et 11:** Il semble bien établi que la caspase 1 joue un rôle dans la régulation du système immunitaire mais pas ou peu dans les voies apoptotiques (Kuida et al., 1995; Li et al., 1995). Récemment, il a été décrit que la caspase 1 est activée par une interaction directe avec la caspase 11) (Wang et al., 1998). La caspase 11 présente des homologies avec les caspases humaines 4 et 5.
- **Caspase 2:** La caspase 2 semble être requise pour la mort des cellules germinales femelles. De plus, les ovocytes de ces souris présentent une résistance à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques. A la naissance, les souris déficientes présentent une diminution du nombre de motoneurones faciaux. Ceci nous indique que la caspase 2 n'agit pas simplement comme un effecteur positif de l'apoptose mais qu'elle est aussi capable, selon le type cellulaire, de retarder la mort cellulaire. Cette différence pourrait s'expliquer par la présence de deux formes de caspase 2 obtenues par épissage alternatif. En définitive, la caspase 2 est probablement essentielle pour l'apoptose des cellules germinales femelles mais elle peut toutefois, dans certaines situations, avoir un effet protecteur contre l'apoptose. De plus, l'action de la caspase 2 semble être dépendante du type cellulaire, du stade de développement, de l'épissage de son ARNm ainsi que de la présence ou de l'absence d'autres caspases (Wang et al., 1994).

- **Caspase 3:** La caspase 3 semble être requise pour l'apoptose des neutrophiles et des lymphocytes T activés (Woo et al., 1998). Elle est nécessaire à la dégradation internucléosomale de l'ADN ainsi qu'à la condensation de la chromatine (Woo et al., 1998). Il a été également décrit que les lymphocytes T périphériques de ces souris étaient insensibles à l'AICD (Activation Induced Cell Death). Ainsi qu'à l'apoptose induite par un anticorps anti-CD3 (dirigé contre la partie monomorphe du récepteur T) ou un anti-Fas (Woo et al., 1998). La caspase 3 pourrait jouer un rôle différent selon le type de cellules et de stimuli considérés.
- **Caspase 8:** La caspase 8 est un élément essentiel et non redondant de l'apoptose initiée par les récepteurs de mort, mais aussi qu'elle joue un rôle essentiel (et à ce jour grandement incompris) dans le développement cardiaque et dans l'hématopoïèse (Varfolomeev et al., 1998).
- **Caspase 12 :** Les souris invalidées pour la caspase 12 ne présentent aucun défaut apparent du développement. Les thymocytes de ces souris répondent de manière comparable aux cellules contrôles lorsqu'elles sont stimulées par un anticorps anti-Fas (Nakagawa et al., 2000). Il semble donc que la caspase 12 ne soit pas essentielle pour l'apoptose induite par Fas (apo1 = CD95). Des études par microscopie confocale suggèrent que la pro-caspase 12 est principalement localisée dans le réticulum endoplasmique. La pro-caspase 12 est activée lorsque les cellules sont traitées avec des agents capables d'induire un stress du réticulum endoplasmique (RE) exemple Tunicamycine (Welihinda et al., 1999).

En définitive, la caspase 12 semble être essentielle pour l'apoptose induite par un stress au niveau du RE ce qui en fait une cible pharmacologique potentielle.

En fin, quelle que soit la caspase considérée, les effets sur l'apoptose sont à la fois dépendants du type cellulaire et du stimulus utilisé. Ainsi, le jeu de caspases impliquées est probablement différent selon l'effecteur et le tissu considérés.

f-Régulation :

Etant donné les effets dévastateurs que pourraient avoir une activation inopportune des caspases, il n'est pas surprenant que cette étape soit étroitement modulée. En fait, non seulement l'activation mais aussi l'activité et la production des caspases sont régulées à plusieurs niveaux. En fait, les connaissances avérées sur la régulation de l'apoptose sont résultats de plusieurs travaux de recherche élaborés sur une espèce de nématode, *Cænorhabditis elegans*.

En effet, la majeure partie de nos connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'apoptose provient de travaux menés sur le nématode *Cænorhabditis elegans* (Hengartner et Horvitz, 1994). Ainsi, la sélection par mutagenèse chimique de larves présentant des défauts d'élimination des cellules au cours du développement a permis l'identification de 11 gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée chez *C. elegans*. Parmi cela, 3 furent identifiés comme des régulateurs clé de l'apoptose dans toutes les cellules somatiques, il s'agit de ced-3, ced-4 et ced-9 (ced pour *Cænorhabditis elegans death*).

ced-3 et ced-4 sont tout deux requis pour la mort cellulaire. En effet, une mutation conduisant à une inactivation de l'un ou l'autre de ces gènes aboutit au blocage de l'apoptose dans chacune des 131 cellules somatiques du ver. ced-9, pour sa part, à une fonction antagoniste de ced-3 et ced-4 en ce sens qu'il est capable de promouvoir la survie. Ainsi une perte partielle de fonction de ced-9 est létale, suite à une mort cellulaire exacerbée, alors qu'un gain de fonction de ced-9 conduit à un excès cellulaire.

Le clonage de ces différents gènes a révélé que (Figure 12)

- CED-3 code pour une protéase à cystéine homologue à l'enzyme de conversion de l'IL-1b (ICE, maintenant désignée comme caspase 1) (Yuan et al., 1993).
- CED-4 code pour une protéine ayant des homologues avec la protéine humaine Apaf-1 (Zou et al., 1997).
- CED-9 code pour une protéine homologue à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 préalablement identifiée chez l'Homme (White, 1996).

Il a été démontré que CED-4 est capable d'interagir à la fois avec CED-3 et CED-9 (Chinnaiyan et al., 1997). Ce résultat rend bien compte des différents niveaux de régulation entre ces protéines et leurs homologues chez les mammifères. Chaque famille sera analysée plus en détail dans la suite de ce manuscrit.

6.2. Les trois phases de l'apoptose

La diversité est grande des signaux, physiologiques et pathologiques, extra- ou intracellulaires, déclenchant la mise en marche du programme apoptotique et intervenant dans sa régulation. Mais quel que soit ce signal. L'apoptose est un processus qui dans ces grandes lignes, peut être décomposé en trois phases (figure 13).

6.2.1. La phase d'initialisation: Ou pré mitochondriale elle est réversible est très variée, pendant la quelle se déroule la séquences des évènements biochimique qui dépend de la nature de l'inducteur.

6.2.2. La phase de décision: Ou mitochondriale au cours de laquelle la cellule intègre, en fonction de leur génotype et de leur phénotype à ce moment donné, les différentes informations reçus et décide de s'engager ou non dans la voie d'apoptose

6.2.3. La phase d'exécution: Ou post-mitochondriale, tendent à devenir irréversible, au cours de laquelle la cellule exécute la décision prise d'entrer en apoptose par une activation de protéases (les caspases) et de nucléases: l'acquisition du morphotype apoptotique est contemporaine de cette phase.

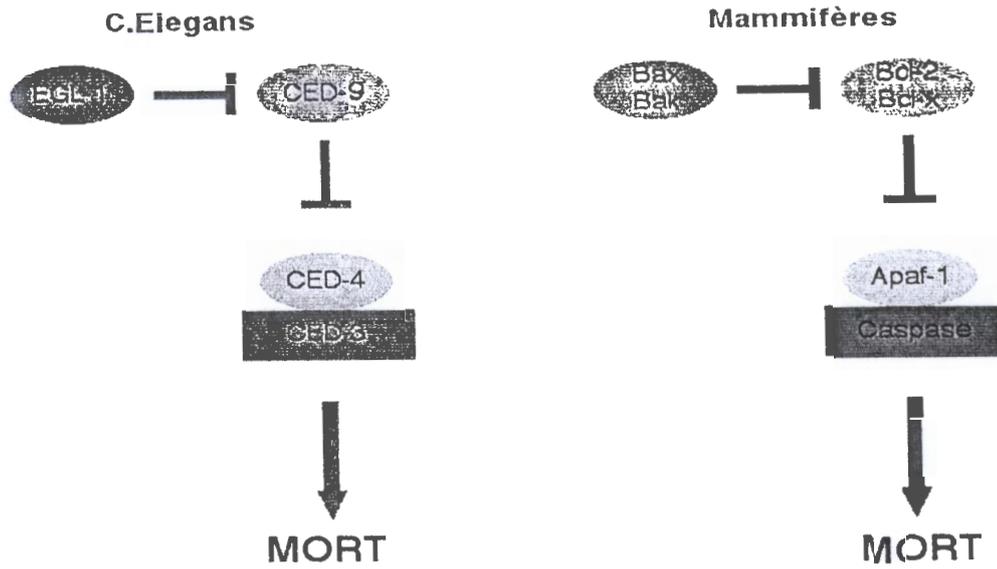


Fig12: Schéma simplifié représentant les protéines essentielles au programme de mort cellulaire chez C.elegans et chez les mammifères.

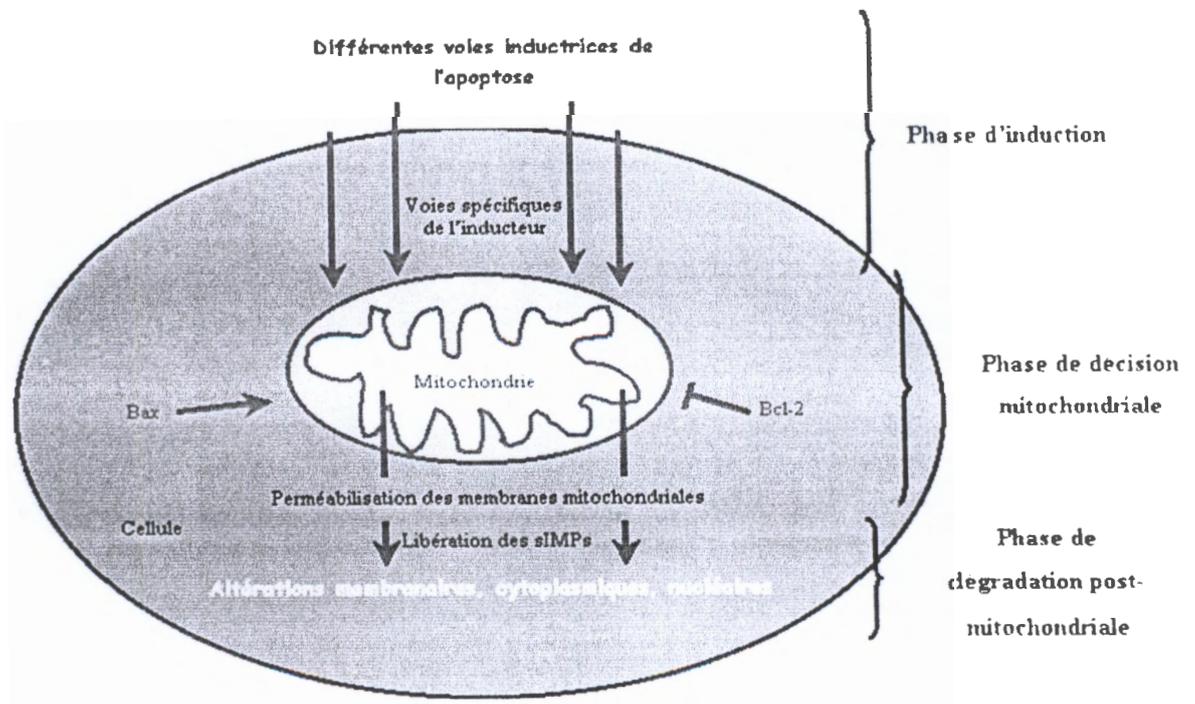


Fig.13. Les trois phases de l'apoptose

7. Les récepteurs et les ligands de récepteurs de mort cellulaire

a. Les récepteurs

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'apoptose. Toutefois il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée : Les récepteurs de mort. Les récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TNF-R) (Nagata, 1997). Les TNF-R (tumor necrosis factor receptor) peuvent promouvoir selon le contexte cellulaire, soit la survie, soit la mort soit les deux. Parmi les membres de la famille impliqués dans la mort cellulaire, il convient de citer CD95 (Fas/APO-1) (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992), TNF-R1 (Loetscher et al., 1990; Schall et al., 1990).

Les membres de la famille du TNF-R sont des protéines transmembranaires de type I possédant dans leur domaine extracellulaire de une à six régions riches en cystéines, impliquées dans la liaison du ligand). (Tartaglia et al., 1993; Chaudhary et al., 1997; Nagata, 1997). On prend pour exemple de ces récepteurs le Fas.

Le Fas : Le Fas (également appelé CD95 ou Apo1) est le mieux décrit des récepteurs de mort, qui sont également caractérisés par la présence d'un domaine DD (Death Domain qui a été conservé au cours de l'évolution) intracellulaire crucial dans l'induction du signal pro-apoptotique. Le Fas est une protéine de 335 acides aminés et d'un poids moléculaire variant de 45 à 52 Kda (Oehm et al., 1992) suivant les études, probablement en raison de différences de glycosylation du récepteur (Keppler et al., 1999). De plus, des formes solubles du récepteur générées par un épissage alternatif au niveau du domaine transmembranaire, ont été décrites et contribuent à la régulation de l'apoptose induite par FasL (ligand du Fas) (Cheng et al., 1994 ; Papoff et al., 1999).

Rôle de Fas : Le Fas joue un rôle capital dans la régulation des populations lymphocytaires B et T, non seulement en éliminant les lymphocytes périphériques autoréactifs, mais également en induisant l'apoptose des lymphocytes activés après leur prolifération en réponse à un antigène (Krammer, 2000).

b. Les ligands

La famille des ligands du TNF comprend une quinzaine de membres (TNF, FasL, Lymphotoxine,...), (Nagata et Golstein, 1995). Ces ligands sont en grande majorité des protéines transmembranaires de type II, qui présentent donc leur extrémité C-terminale du côté extracellulaire. Le domaine extracellulaire est composé d'environ 150 acides aminés et possèdent 20 à 25 % d'homologie avec les autres membres de la famille du TNF. Certaines de ces protéines, telle que FasL et TNF, existent également sous forme soluble. La forme soluble est obtenue par protéolyse induite par une famille de métalloprotéases membranaires. S'il semble bien établi dans le cas de FasL, que la trimérisation des formes membranaires soit responsable de l'oligomérisation et de l'activation du récepteur Fas, le rôle des formes solubles est encore sujet à débat. De nombreuses études ont rapporté que des stress cellulaires pouvaient induire l'expression des ligands de mort, tel que FasL et donc induire l'apoptose (Kasibhatla et al., 1998). Le couple Fas/FasL joue un rôle prépondérant dans la cytotoxicité des lymphocytes T

(LTc). Ce mécanisme coopère pour permettre l'élimination de la cellule cible par un processus d'apoptose (Cohen, 1991; Golstein et al., 1991).

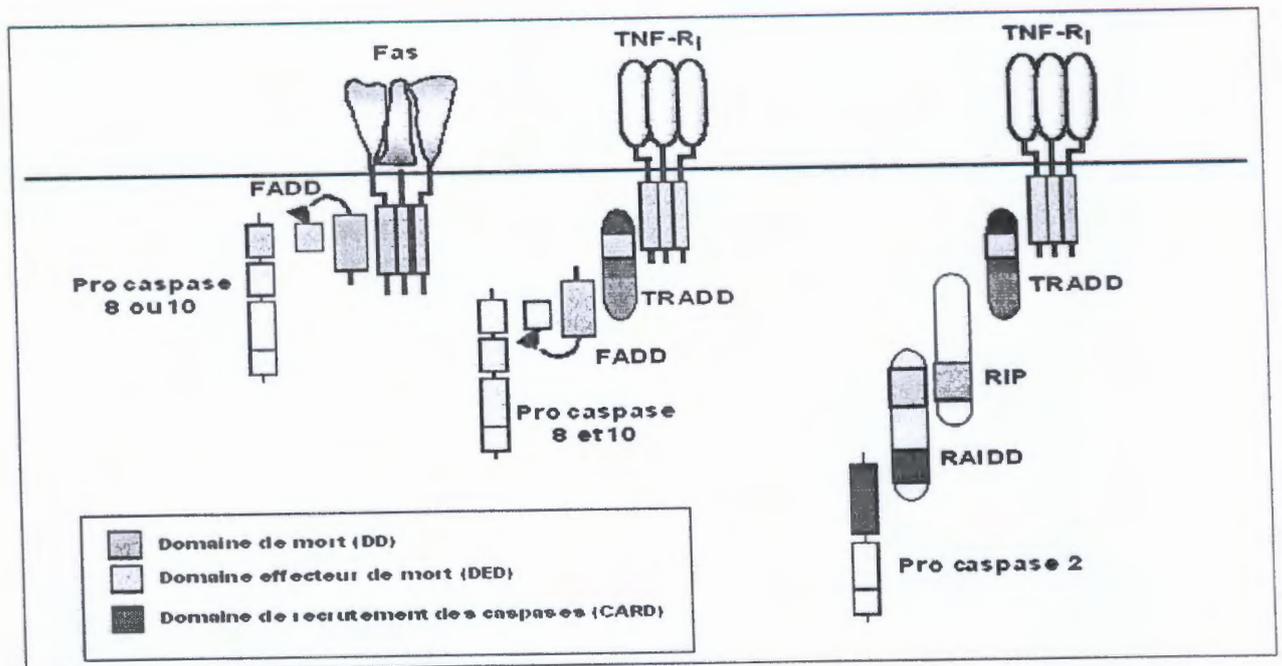


Fig.14. Activation des caspases par les récepteurs de mort. Fas et TNF-RI peuvent recruter les caspases de trois manières distinctes impliquant l'interaction avec les domaines de mort (DD), les domaines effecteurs de mort (DED) ou les domaines de recrutement des caspases (CARD), (Rathmell et al., 1999).

FADD : Fas associated protein with death domain.

RIP : Receptor Interacting Protein.

TRADD : TNF-RI associated protein with death domain.

RAIDD : RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death domain .

CHAPITRE - III

L'APOPTOSE DANS

LA PATHOLOGIE

ET LA PHYSIOLOGIE

1. Les types des cellules qui subissent la mort cellulaire programmée

Une très grande variété de cellules subit la mort cellulaire programmée. Celles-ci peuvent être regroupées en sept classes distinctes (Thomas et al., 2004).

1.1. Les cellules nuisibles

Au cours de la maturation moléculaire des récepteurs de l'antigène des cellules T, les cellules T immatures présentes dans le thymus réarrangent leurs gènes codant les chaînes α et β du récepteur. Beaucoup de récepteurs nouvellement identifiés se lient à des antigènes étrangers, mais d'autres interagissent avec les antigènes de soi. Les cellules dont les récepteurs reconnaissent les antigènes du soi sont potentiellement nuisibles et sont éliminées par mort cellulaire programmée. Il est intéressant de noter que la cyclosporine A qui inhibe l'apoptose dans les thymocytes, peut provoquer des maladies auto-immunes.

Les cellules contenant l'ADN endommagé ont tendance à accumuler les mutations, les cellules qui abritent des agents infectieux, sont aussi dangereuses pour l'organisme. Ces cellules sont éliminées par l'apoptose (Thomas et al., 2004).

1.2. Les cellules du développement défectueux

Les lymphocytes T dont les récepteurs des cellules T sont incapables d'interagir avec l'éventail des glycoprotéines du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) exprimés dont une cellule donnée n'ont aucune efficacité dans la réponse immunitaire. Ces cellules meurent par apoptose. Les lymphocytes B exprimant des anticorps dirigés contre les antigènes de soi ou produisant des anticorps dont l'affinité aux antigènes est en dessous d'un seuil critique, sont éliminées par apoptose (Thomas et al., 2004).

1.3. Les cellules en excès

L'apoptose joue un rôle extrêmement important dans le développement du cerveau. Les ganglions embryonnaires possèdent souvent beaucoup plus de neurones qu'il n'en faut pour innover leurs muscles cibles. Les neurones en excès qui n'établissent pas de connexion appropriée n'exercent aucune fonction et sont par conséquent éliminés par apoptose jusqu'au 80% des neurones meurent de cette façon. Chez les souris dépourvues d'un des facteurs de mort essentiel l'organe le plus gravement affecté est le cerveau (Thomas et al., 2004).

1.4. Les cellules obsolètes

L'élimination des cellules obsolètes s'observe le plus clairement chez les organismes, tels que les insectes et les amphibiens qui connaissent une métamorphose au cours de leurs développements, par exemple: L'apoptose déclenchée par une décharge de l'hormone thyroïdienne est responsable de la résorption de la queue de têtard. Les mammifères utilisent également l'apoptose pour éliminer les tissus obsolètes au cours de l'embryogenèse (Thomas et al., 2004).

1.5. Les cellules infectées par les virus

Une partie au moins de la perte des cellules T auxiliaires CD4⁺ matures chez les personnes infectées par le VIH1 semble résulter de l'apoptose. Lorsqu'elles sont exposées à des agents qui, normalement, stimuleraient la prolifération cellulaire, ces cellules, au contraire, subissent l'apoptose. Paradoxalement, il semble que beaucoup de cellules mourantes ne soit pas elles-mêmes infectées par VIH (human immunodeficiency virus) (Thomas et al., 2004).

1.6. Les cellules inutiles

Lors de développement de nombreux vertébrés, les doigts des mains et des pieds sont reliés par une palmure interdigitale. Les cellules de cette palmure n'occupent aucune fonction chez l'homme, ils sont alors éliminés par apoptose (Thomas et al., 2004).

1.7. L'élimination chimiothérapeutique des cellules

L'exposition des cellules cancéreuses à des nombreux agents utilisés en chimiothérapie ne tue pas ces cellules sur le champ. Au contraire les cellules meurent parce que les produits provoquent des lésions intracellulaires qui agissent comme un signal commandant le déclenchement de l'apoptose (Thomas et al., 2004).

2. L'apoptose physiologique et pathologique

L'apoptose occupe aujourd'hui une part substantielle de la recherche en biologie cellulaire. Pourquoi ce champ attire-t-il autant l'attention des scientifiques ? les raisons sont multiples, mais l'une d'elles est le fait que l'apoptose est un point d'intersection entre les voies de signalisation cellulaire, la structure cellulaire, le cycle cellulaire et bien sur, les maladies humaines (Thomas et al., 2004).

Des perturbations dans les mécanismes de contrôle ou d'exécution du suicide cellulaire sont impliqués dans une variété d'anomalies du développement et de diverses pathologies. La recherche sur l'apoptose s'avère donc d'une importance capitale, puisque l'élucidation des mécanismes impliqués pourrait avoir des répercussions médicales importantes. C'est pour ça elle touche des domaines très variés de la médecine et les conceptions thérapeutiques s'en trouvent perturbées. Comme nous le savons, plusieurs maladies aiguës ou chroniques sont le résultat d'une perte excessive de certaines populations cellulaires. À l'opposé, plusieurs maladies sont caractérisées par un arrêt anormal de la mort cellulaire.

2.1. L'apoptose physiologique

La mort cellulaire ne se limite pas à la période embryonnaire mais elle intervient tout au long de la vie d'un organisme, de sa naissance à sa mort.

L'apoptose assure le remodelage et le maintien de l'homéostasie tissulaire, c'est à dire la conservation du nombre et de la qualité des cellules qui les constituent. La mort cellulaire participe aux phénomènes de différenciation qui donnent naissance aux trois

types de tissus (mésoderme, endoderme et ectoderme) dont dériveront l'ensemble des cellules qui constituent notre corps. Elle joue un rôle essentiel dans la sculpture des métamorphoses successives de notre corps (Strange et al., 2001). Elle sculpte la forme interne et externe de l'embryon, puis la forme de nos bras, de nos jambes, elle élimine les tissus qui séparent les doigts, permettant leur individualisation (Meier et al., 2000). L'apoptose participe à la construction de nos deux organes de régulation les plus complexes, notre cerveau et notre système immunitaire.

La mise en place du réseau synaptique entre les neurones dépend d'un contrôle dynamique et séquentiel de la vie et de la mort. Une fois que le câblage des synapses est établi, la survie des neurones dépend de la capacité de ces connexions à faire preuve de leur fonctionnalité ; l'absence de circulation d'information nerveuse à travers une synapse entraîne l'autodestruction des neurones qui la composent. En quelques jours, plus de la moitié des neurones meurent. Disparaissent ainsi les neurones dits « inutiles » ou « dangereux ». Le contrôle de la vie et de la mort cellulaire par des signaux de l'environnement joue un rôle dans ces signaux d'auto-organisation, sélectionnant parmi toutes les interactions neuronales initialement possibles, celles qui réussissent à faire preuve de leur capacité à fonctionner (Verhage et al., 2000). Ce sont des mécanismes semblables qui permettent la sculpture et la complexité de notre système immunitaire.

La mort cellulaire permet l'adaptation du système immunitaire au soi, sélectionnant à partir de l'immense diversité initiale de lymphocytes, les 1 à 5 % qui ont fait la preuve de leur capacité à défendre l'organisme sans l'agresser et qui seront par la suite capables de combattre un microbe qui nous aura envahi. La mort cellulaire est aussi essentielle à la régulation de la réponse immunitaire. Les cellules immunitaires prolifèrent suite à la présence d'un agent étranger. Une fois éliminé, un grand nombre de cellules est détruit pour ralentir la réponse immunitaire qui pourrait causer de graves dommages à l'organisme. (Meier et al., 2000).

2.2. L'apoptose pathologique

De très nombreuses maladies sont liées à des dérèglements de mécanismes qui contrôlent l'apoptose. Toute anomalie de l'apoptose peut être responsable du déclenchement et de la progression de nombreuses pathologies caractérisées par un excès (maladie neurodégénérative) ou un défaut d'apoptose (cancer, infection virale, ...). Le déclenchement anormal ou excessif de l'apoptose joue un rôle essentiel dans le développement de la plupart de ces pathologies. Citons les exemples des maladies neurodégénératives chroniques comme l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les rétinopathies dégénératives et d'autres atteintes comme les accidents vasculaires cérébraux, les complications immunologiques ou neurologiques dues à l'infection par le HIV, les hépatites fulminantes ou alcooliques et enfin les lésions causées par des méningites (Thompson, 1995).

Il existe une autre catégorie de maladies liées à une augmentation anormale du nombre de certaines cellules c'est le cas des cancers. Le blocage anormal de l'apoptose est important dans le développement des métastases permettant à des cellules cancéreuses de voyager à travers le corps sans s'autodétruire et de survivre dans un organe qui n'est pas le leur (Thompson, 1995). Il existerait aussi un lien entre le vieillissement, la sénescence et le processus apoptotique. Le vieillissement se caractérise par une altération progressive

des capacités fonctionnelles de notre corps et par l'apparition de trois catégories de maladies graves : Les maladies cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives et les cancers, tous liés comme nous l'avons vu à un excès ou un défaut d'apoptose (Johnson et al., 1999).

De nombreux virus modulent la régulation des signaux apoptotiques, soit pour maintenir une infection virale latente soit pour maintenir viable la cellule hôte et ainsi augmenter l'efficacité de la réplication virale. La plupart des virus possèdent un ou plusieurs gènes permettant la synthèse de protéines dont l'effet est de réprimer à différents stades l'apoptose des cellules qu'ils infectent ; c'est le cas du virus de l'hépatite C (VHC), du virus Herpès simplex type-1 (VHS-1), des papillomavirus, du virus Epstein Barr (EBV) et des adénovirus (Caraher et al., 1999). En empêchant la mort de ces cellules, les virus favorisent la survie de la cellule qu'ils infectent et donc leur propre survie, jusqu'à favoriser l'apparition de cancers pour certains. D'autres virus possèdent la capacité de déclencher l'apoptose des cellules qu'ils infectent, entraînant des déficits cellulaires en particulier immunitaire. Les virus peuvent alors se propager. Dans ce cas, on peut citer le HIV, le virus de l'hépatite B (VHB), les virus poliomyélitiques et le virus de la grippe (Johnson et al., 1999). Quelque soit les moyens de réguler l'apoptose, les Virus parviennent toujours à leur fin.

2.2.1. Le diabète et l'apoptose

▪ Rôle de l'apoptose dans le diabète :

Une apoptose des cellules β provoque une insulinopénie. Ce phénomène est observé dans le diabète de type II. L'apoptose des cellules β peut être induite.

L'apoptose des cellules β observée dans le diabète de type I peut être prévenue par la protéine antagoniste au récepteur de l'interleukine 1. Il faudra sans doute à l'avenir de rechercher dans quelle mesure les facteurs de croissance pourraient restaurer une population de cellules β fonctionnelles, en s'opposant à leur autodestruction. De même, des molécules comme la glutamine ou des antioxydant comme l'acide 1-pyrrolidine carbodithioïque (Caraher et al., 1999) ou la thioredoxine (Hotta et al., 1998) ont montré des effets anti apoptotiques dans ce type de diabète. On peut supposer qu'elle aurait une action similaire sur l'apoptose des cellules β du DNID.

▪ Apoptose et complications du diabète :

Ce sont les complications associées au diabète qui font toute la gravité de cette maladie. Les atteintes les plus morbides touchent les vaisseaux sanguins et le système nerveux central. A ces deux niveaux, on constate une exagération des phénomènes apoptotiques induits de façon indirecte par l'état diabétique. Ainsi, une des complications induite par le diabète NID (non insulino-dépendant) est la formation de plaques d'athéromes débouchant le plus souvent sur des cardiopathies obstructives aiguës. Il a été démontré (Fukumoto et al., 1998) qu'à ce niveau aussi des phénomènes apoptotiques sont impliqués.

L'apoptose étant sous la dépendance de signaux intercellulaires comme les interleukines par exemple. Il faudra mieux appréhender les relations entre les différentes cellules des îlots de Langerhans, afin de mieux identifier les signaux moléculaires qui

maintiennent en vie les cellules β . Plus que jamais, la vie d'un organisme pluricellulaire nous apparaît comme un état transitoire résultant d'un équilibre entre la pérennité des fonctions cellulaires et le nécessaire contrôle de leur croissance et de leur reproduction.

2.2.2. Le stress et l'apoptose

- **C'est quoi le stress oxydant ?**

Le stress oxydant est un excès des radicaux libres (ROL) résulte lorsqu'il y a un déséquilibre entre les antioxydants et les pro oxydants (les pro oxydants produit soit par divers mécanismes physiologiques notamment l'activité mitochondriale, soit par des phénomènes toxiques exogènes (Yoshikawa et al.,2000), alors que les antioxydants sont des éléments utilisés par la cellule contre ces ROL et parmi ces éléments on a la vitamine E (Tocophérone), vitamine C (ascorbate) l'ubiquinone et aussi les caroténoïdes (Kinsky et al.,1989).

- **Quelle est la relation entre le stress et l'apoptose ?**

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Au bas mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par massif, soit par un mauvais fonctionnement de ces systèmes de réparation chez des sujets déficients en cofacteurs (thioredoxines, zinc) ou atteints d'une anomalie génétique. Dans ce cas, les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérases translésionnelles infidèles aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome, soit une impossibilité de copie de l'ADN qui aboutira à la mise en route du suicide programmé des cellules par un mécanisme appelé apoptose. (Esterbauer et al., 1992), (Cadet et al., 2002).

- **Généralités sur les protéines de stress**

Les protéines de stress, ou hsp (heat shock protein), forment une famille de protéines remarquablement conservée au cours de l'évolution. Elles exercent des fonctions essentielles à la vie cellulaire et plus encore à la survie lors de stress d'origine chimique, physique ou métabolique. Ces protéines ont été classifiées en fonction de leur poids moléculaire respectif. Certaines hsps, comme hsp90, 70, 60 et 27 agissent comme des protéines chaperonnes. Elles vont lier les peptides, les protéines en cours de synthèse ou à fort risque d'agrégation et vont ainsi permettre leur repliement correct et leur translocation dans les compartiments subcellulaires appropriés. Elles sont aussi capables de lier des protéines dénaturées afin de rétablir leurs fonctions (Gething et Sambrook, 1992).

D'après ça on dit que le stress rest un des causes principales de mort cellulaire programmée et qui aboutie à des autre complications plus graves.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Acehan D, Jiang X, Morgan D.G, Heuser J.E, Wang X, Akey C.W. 2002. Three-Dimensional Structure of the Apoptosome: Implications for Assembly, Procaspase-9 Binding, and Activation. *Molecular Cell* 9; 423-432 .
- Adachi M, Zhao X, Imai K. 2005 Nomenclature of dynein light chain-linked BH3-only protein Bim isoforms. *Cell Death Differ* 12;192-193 .
- Alnemri E. S, Livingston D. J, Nicholson D. W, Salvesen G, Thornberry N. A, Wong W. W, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. *Cell* 87; 171.
- Ameisen J. C, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier J. P, Potentier A, Ouisi A. 1995. Apoptosis in an unicellular eucaryote (trypanosoma cruzi): Implication for the evolutionary origin and the role of programmed cell death in the control of cell proliferation. *Cell Death Differ* 2; 285-300.
- Amess B, Tolkovsky A. M. 1995. Programmed cell death in sympathetic neurons: a study by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using computer image analysis. *Electrophoresis* 16; 1255-67.
- Antonsson B, Montessuits, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. 2000. Bax . Oligomerisation is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome C release from mitochondria. *Biochem J* 345(2) ; 271-8.
- Bakhshi A, Jensen J.P, Goldman P, Wright J.J, McBride O.W, Epstein A.L, Korsmeyer S.J. 1985 . Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41; 899-906 .
- Barry M, Heibein J.A, Pinkoski M.J, Lee S.F, Moyer R.W, Green D.R, Bleackley R.C. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 20; 3781-3794 .
- Basanez G, Nechushtan A, Drozhinin O, Chanturiya A, Choe E, Tutt S, Wood K.A, Hsu Y, Zimmerberg J, Youle R.J. 1999. Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5492-5497 .
- Basanez G, Sharpe J.C, Galanis J, Brandt T.B, Hardwick J.M, Zimmerberg J. 2002. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem* 277; 49360-49365 .
- Benetti L, Munger J, Roizman B. 2003. The herpes simplex virus 1 US3 protein kinase blocks caspase-dependent double cleavage and activation of the proapoptotic protein BAD. *J Virol* 77; 6567-6573.
- Biswas S.C, Greene L.A.. 2002 Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation. *J Biol Chem* 277; 49511-49516 .
- Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D.A. 1995. novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem* 270(14); 7795-8.
- Borner C . 2003. The Bcl2 proteine family sensors and check points for life – or death decisions. *Mol Immunol* 39 ; 615-47.
- Bossy-Wetzell E, Newmeyer D. D, Green D. R. 1998. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17; 37-49.

- Bouillet P, Purton J.F, Godfrey D.I, Zhang L.C, Coultas L, Puthalakath H, Pellegrini M, Cory S, Adams J.M, Strasser A. B. 2002 .BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415;922-926.
- Brenner C, Marzo I, Zamzami N, Vieira, H, Kroemer G. 1998. Coopération mortelle entre la protéine pro-apoptotique Bax et le translocateur à adénine nucléotidique pour le contrôle mitochondriale de l'apoptose. *Med Sci* 14; 1399-401.
- Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat A.G, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat J.L, Sauvaigo S. 2002 Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement, and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem* 383(6) ; 93.
- Caraher EM, Conroy SJ, Newsholme P . 1999. rat islet cells and complement-dependent induction of islet cell apoptosis. *J Endocrinol* 162 (1); 143-153.
- Cartron P.F, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette F.M, Juin P. 2004.The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* 16;807-818 .
- Chaudhary P. M, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. 1997. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7; 821-30.
- Chen L, Willis S.N, Wei A, Smith B.J, Fletcher J.I, Hinds M.G, Colman P.M, Day C.L, Adams J.M, Huang D.C. 2005 .Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 17; 393-403 .
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. 1994. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263(5154); 1759-62.
- Chinnaiyan A. M, O'Rourke K, Lane B. R, Dixit V. M. 1997. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275; 1122-6.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. 1995. FADD a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81(4); 505-12.
- Chipuk J.E, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin N.M, Newmeyer D.D, Schuler M, Green D.R. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303; 1010-1014 .
- Clarke P.G.H, Clarke S. 1996. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol* 193; 81-99.
- Cleary M.L, Sklar J. 1985. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 82;7439-7443.
- Cohen J. J. 1991. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol* 50; 55-85.
- Condorelli F, Salomoni P, Cotteret S, Cesi V, Srinivasula S.M, Alnemri E.S Calabretta B. 2001.Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol Cell Biol* 21; 3025-3036 .
- Curtin J.F, Cotter T.G. 2003.*Live and Let Die*:regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis.*Cellular Signalling* 15;983-992 .
- Danial N.N, Gramm C.F, Scorrano L, Zhang C.Y, Krauss S, Ranger A.M, Datta S.R,Greenberg M.E, Licklider L.J, Lowell B.B, Gygi S.P, Korsmeyer S.J. 2003. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424; 952-956 .
- Datta S.R, Ranger A.M, Lin M.Z, Sturgill J.F, Ma Y, Dikkes P, Korsmeyer S.J, Greenberg M.E. 2002. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis.*Dev Cell* 3; 631-643 .

- Day C.L, Puthalakath H, Skea G, Strasser A., Barsukov I., Lian L.Y, Huang D.C, Hinds M.G. 2004. Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. *Biochem J* 377;597-605 .
- Debatin K.M, Krammer P.H. 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer, *Oncogene* 23; 2950-2966 .
- deBlois D, Tea BS, Dam TV, Tremblay J, Hamet P. 1997. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29;340-349.
- Dunger A, Augstein P, Schmidt S, Fischer U. 1996. Identification of interleukin 1 induced apoptosis in rat islet using in situ specific labelling of fragmented DNA. *J Autoimmun* 9 (3);06 .
- Duvall E, Wyllie A. H. 1986. Death and the cell. *Immunol. Today* 7; 115-19.
- Earnshaw W. C, Martins L. M, Kaufmann S. H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis [In Process Citation]. *Annu Rev Biochem* 68; 383-424.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Rad. Biol. Med* 13; p. 341.
- Fernandez Y, Verhaegen M, Miller T.P, Rush J.L, Steiner P, Opipari A.W. Jr, Lowe S.W, Soengas M.S .2005. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* 65; 6294-6304.
- Folkow B. 1982. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev* 62;347-504.
- Footz T.K, Birren B, Minoshima S, Asakawa S, Shimizu N, Riazi M.A, McDermid H.E. 1998. The gene for death agonist BID maps to the region of human 22q11.2 duplicated in cat eye syndrome chromosomes and to mouse chromosome 6. *Genomics* 51; 472-475.
- Fukumoto H, Naito Z, Asano G, Aramaki T . 1998 .mmunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated with myocardial infarction and diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* 5 (1);29-35.
- Furukawa Y, Iwase S, Kikuchi J, Terui Y, Nakamura M, Yamada H., Kano Y, Matsuda M. 2000. Phosphorylation of Bcl-2 protein by CDC2 kinase during G2/M phases and its role in cell cycle regulation. *J Biol Chem* 275; 21661-21667 .
- Gerner C, Seelos C, Sauermann G. 1998. Alteration of nuclear matrix protein composition during apoptosis in rat embryo cells. *Exp Cell Res* 238;472-80.
- Gething M. J, Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355;33-45.
- Goldstein J. C, Waterhouse N. J, Juin P, Evan G. I, Green D. R. 2000. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2; 156-62.
- Golstein P, Ojcius D. M, Young J. D. 1991. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121; 29-65.
- Ha S.H, Lee S.R, Lee T.H, Kim Y.M, Baik M.G, Choi, Y.J. 2001. The expression of Bok is regulated by serum in HC11 mammary epithelial cells. *Mol Cells* 12; 368-371.
- Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. 1995. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26;642-648.
- Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Walter SV, Wen YI. 1985. Primary versus secondary events in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 63;380-386.
- Hamner S, Arumae U, Li-Ying Y, Sun Y.F, Saarma M, Lindholm D. 2001. Functional characterization of two splice variants of rat bad and their interaction with Bcl-w in sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 17; 97-106 .

- Han J, Flemington C, Houghton A.B, Gu Z, Zambetti G.P, Lutz R.J, Zhu L, Chittenden T. 2001. Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 98; 11318-11323 .
- Hengartner M. O, Horvitz H. R. 1994. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4; 581-6.
- Hengartner M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407; 770-776.
- Hofmann K, Bucher P, Tschopp J. 1997. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22; 155-6.
- Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J, Miyazaki J . 1998. Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotoci. Evidence for enhanced rates of complement activation in serum from patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus exposed t n-induced diabetes. *J Exp Med* 188 (8); 1445-51.
- Howard A. D, Kostura M. J, Thornberry N, Ding G. J, Limjuco G, Weidner J, Salley J. P, Hogquist K. A, Chaplin D. D, Mumford R. A. 1991. IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol* 147; 2964-9.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel D. V. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81; 495-504.
- Hsu S.Y, Kaipia A, McGee E, Lomeli M., Hsueh A.J. 1997. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci USA* 94; 12401-12406 .
- <http://esi-topics.com/apoptosis/index.html>.
- Huang D.C.S, Strasser A. 2000. BH3-only proteins — essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103; 839-842 .
- Ide h, Yeldandi A.V, Reddy J.K, Rao M. S. 1994. Increased expression of sulfated glycoprotein-2 and DNA fragmentation in the pancreas of copper deficient rats . *Toxicol Appl Pharmacol* 126; 05.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66; 233-43.
- Itoh T, Itoh A, Pleasure D. 2003. Bcl-2-related protein family gene expression during oligodendroglial differentiation. *J Neurochem* 85, 1500-1512 .
- Jacobson M.D, Weil M, Raff M.C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88; 347-354.
- Jean E , Laurence M, Corine B, Frédéric L, Bernard M, Paul H ,Patrick A. 2001. Résumé de l'article paru dans la revue *Eur Cytokine Netw. vol. 12(1); 126-134*
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, SehgalA, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M . 1999. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47; 545-54.
- Jurgensmeier J. M, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed J. C. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95; 4997-5002.
- Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green D. R. 1998. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* 1; 543-51.
- Kaufmann S. H. 1989. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* 49; 5870-8.

- Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, Neubert K, Stein R, Borner C. 2003. Characterization of the signal that directs Bcl-xL, but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 160 ; 53-64 .
- Keppler OT, Peter ME, Hinderlich S, Moldenhauer G, Stehling P, Schmitz I, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M. D. 1999 .Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology* 9.
- Kerr J.F.R, Wyllie, A.H., Currie A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26; 239-257.
- Kharbanda S, Saxena S, Yoshida K, Pandey P, Kaneki M, Wang Q, Cheng K, Chen Y.N, Campbell A, Sudha T, Yuan Z.M, Narula J, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. 2000. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl- x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem* 275; 322-327.
- Kim B.C, Mamura M, Choi K.S, Calabretta B, Kim S.J. 2002. Transforming growth factorbeta 1 induces apoptosis through cleavage of BAD in a Smad3-dependent mechanism in FaO hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 22;1369-1378 .
- Kinsky N. 1989. Antioxydants function of carotenoides, *Free Rad. Biol. Med* 7; p. 617.
- Kluck R.M, Bossy-Wetzell E, Green D. R, Newmeyer D. D. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [see comments]. *Science* 275; 1132-6.
- Korsmeyer SJ , wei MC ,Saito M ,weiler S , Oh KJ , Schlesinger Ph . 2000. Pro-apoptotique cascade activates Bid, wich oligomerizes BAK or Bax into pores that result in the release of cytochromec. *Cell Death Differ* 7; 1166 -73.
- Krammer P. H.2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60; 619-42.
- Kroemer G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3; 614-20.
- Kuida K, Haydar T. F, Kuan C. Y, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su M. S, Rakic P, Flavell R. A. 1998 . Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94; 325-37.
- Kuida K, Lippke J. A, KuG, Harding M. W, Livingston D. J, Su M. S, Flavell R. A. 1995. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267;2000-3.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk J.E, Bonzon C, Sullivan B.A, Green D.R, Newmeyer D.D. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Baxmediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17;525-535 .
- Kuwana T, Smith J. J, Muzio M, Dixit V, Newmeyer D. D, Kornbluth S. 1998. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 273; 16589-94.
- Ley R, Ewings K.E, Hadfield K, Cook S.J. 2005 .Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ* 12;1008-1014 .
- Li H, Zhu H, Xu C. J, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94;491-501.
- Li K, Li Y, Shelton J. M, Richardson J. A, Spencer E, Chen Z. J, Wang X, Williams R. S. 2000. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 101; 389-99.
- Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J. 1995. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80; 401-11.

- Lithgow T.R, van Driel R, Bertram J.F, Strasser A. 1994. 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* 5; 411-417
- Liu J.W, Chandra D, Tang S.H, Chopra D, Tang D.G. 2002. Identification and characterization of Bimgamma, a novel proapoptotic BH3-only splice variant of Bim. *Cancer Res* 62; 2976-2981 .
- Loetscher H, Pan Y. C, Lahm H. W, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W. 1990. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61;351-9.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94; 481-90.
- Mandic A., Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S, Shoshan M.C. 2002. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 22; 3003-3013 .
- Marani M, Tenev T, Hancock D, Downward J, Lemoine N. R. 2002. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* 22; 3577-3589 .
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier J. M, Susin S. A., Vieira H. L, Prevost M. C, Xie Z, Matsuyama S, Reed J. C, Kroemer G. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281; 2027-31.
- Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller D. K, Nicholson D. W, Tsuruo T. 1997. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 14;1007-12.
- McDonnell J.M, Fushman D, Milliman C.L, Korsmeyer S.J, Cowburn D. 1999 .Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 96; 625-634 .
- Meier P ,Finch A, Evan G. 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407 ; 796-801.
- Morales A.A., Olsson A, Celsing F, Osterborg A., Jondal M., Osorio L.M. 2004. Expression and transcriptional regulation of functionally distinct Bmf isoforms in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 18;41-47 .
- Moussard C . in:Biologie moléculaire biochimie des communications cellulaires.de boeck .2005 ; 274-275.
- Murphy K.M, Ranganathan V, Farnsworth M.L, Kavallaris M, Lock R.B . 2000. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* 7;102-111.
- Nagata S, Golstein P. 1995. The Fas death factor. *Science* 267; 1449-56.
- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-65.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner B. A, Yuan J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403; 98-103.
- Nakano K, Vousden K.H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7; 683-694.
- Narita M., Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz R. J, Matsuda H, Tsujimoto Y. 1998. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95; 14681-6.
- Nguyen M, Millar D.G, Yong W.V, Korsmeyer S.J, Shore G.C. 1993.Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 268; 25265-25268 .

- Oda E, Ohki R, Murasawa H., Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288; 1053-1058 .
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth B. C. 1992. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267;10709-15.
- Opferman J.T, Korsmeyer S.J. 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology* 4; 410-415 .
- O'Reilly L.A, Cullen L, Visvader J, Lindeman G.J, Print C, BathM.L, Huang D.C, Strasser A.. 2000. The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am J Pathol* 157; 449-461.
- Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G. 1999. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J. Biol. Chem* 274(53); 38241-50.
- Putcha G.V, Moulder K.L, Golden J.P, Bouillet P, Adams J.A., Strasser A., Johnson E.M. 2001. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 29; 615-628.
- Puthalakath H, Huang D.C, O'Reilly L.A., King S.M, Strasser A.. 1999 .The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3; 287-296 .
- Qin J.Z, Ziffra J, Stennett L, Bodner B, Bonish B.K, Chaturvedi V, Bennett F, Pollock P.M, Trent J.M, Hendrix M.J, Rizzo P, Miele L, Nickoloff B.J. 2005. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 65; 6282-6293 .
- Rathmell J. C, Thompson C. B. 1999. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* 17;781-828.
- Rice R. L, Tang D. G, Taylor J. D. 1998. Actin cleavage in various tumor cells is not a critical requirement for executing apoptosis. *Pathol Oncol Res* 4; 135-45.
- Robaye B, Doskeland A. P, Suarez-Huerta N, Doskeland S. O, Dumont J. E. 1994. Apoptotic cell death analyzed at the molecular level by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 15; 503-10.
- Roshal M, Zhu Y, Planelles V. 2001. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 6;103.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. 2004 . Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23; 2861-2874.
- Samejima K, Svingen P. A, Basi G. S, Kottke T, Mesner P. W. Jr, Stewart L, Durrieu F, Poirier G. G, Alnemri E. S, Champoux J. J, Kaufmann S. H, Earnshaw W. C. 1999. Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* 274; 4335-40.
- Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows R. P, Harlan J. E, Eberstadt M, Yoon H. S, Shuker S. B, Chang B. S, Minn A. J, Thompson C. B, Fesik S. W. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275; 983-6.
- Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman D.A, Matsuyama S. 2003. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat Cell Biol* 5; 320-329.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli K. J, Debatin K. M, Krammer P. H, Peter M. E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17; 1675-87.

- Schall T. J, Lewis M, Koller K. J, Lee A., Rice G. C, Wong G. H, Gatanaga T, Granger G. A, Lentz R, Raab H .1990. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61; 361-70.
- Schinzel A, Kaufmann T, Borner C. 2004. Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Biochimica Biophysica Acta* 1644; 95-105 .
- Sharpe J.C, Arnoult D, Youle R.J. 2004. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochimica Biophysica Acta* 1644; 107-113 .
- Shi Y. 2004 .Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Sci* 13; 1979-1987 .
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399; 483-7.
- Shiozaki E.N, Shi Y. 2004. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* 29; 486-494 .
- Sleath P. R, Hendrickson R. C, Kronheim S. R, March C. J, Black R. A. 1990. Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1 beta. *J Biol Chem* 265; 14526-8.
- Slee E.A, Keogh S.A., Martin S.J .2000. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ* 7; 556-565 .
- Song Q, Wei T, Lees-Miller S, Alnemri E, Watters D, Lavin M. F. 1997. Resistance of actin to cleavage during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94; 157-62.
- Stennicke H. R, Deveraux Q. L, Humke E. W, Reed J. C, Dixit V. M, Salvesen G. S. 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 274; 8359-62.
- Strasser A. 2005. *The role of BH3-only proteins in the immune system. Nature Reviews Immunology* 5; 189-200
- Sun Y, Leaman D.W. 2005. Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection. *J Biol Chem* 280; 15561-15568 .
- Susin S. A, Lorenzo H. K, Zamzami N, Marzo I, Snow B. E, Brothers G. M, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette M, Goodlett D. R, Aebersold R, Siderovski D. P, Penninger J. M, Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397; 441-6.
- Tartaglia L. A, Ayres T. M, Wong G. H, Goeddel D. V. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74; 845-53.
- Thomas A, Giesler T, White E. 2000. p53 mediates bcl-2 phosphorylation and apoptosis via activation of the Cdc42/JNK1 pathway. *Oncogene* 19; 5259-5269 .
- Thomas D. Pollard M. D, William C. Earnshaw Ph.D . in : *Biologie cellulaire*. Elsevier. 2004; 819-821.
- Thompson C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267; 1456-62.
- Thornberry N. A, Bull H. G, Calaycay J. R, Chapman K. T, Howard A. D, Kostura M. J, Miller D. K, Molineaux S. M, Weidner J. R, Aunins J. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356; 768-74.

- Torcia M, De Chiara G, Nencioni L, Ammendola S, Lucibello M, Rosini P, Marlier L.N, Bonini P, Dello Sbarba P, Palamara A.T, Zambrano N, Russo T, Garaci E, Cozzolino F. 2001. Nerve Growth Factor Inhibits Apoptosis in Memory B Lymphocytes via Inactivation of p38 MAPK, Prevention of Bcl-2 Phosphorylation, and Cytochrome c Release. *J Biol Chem* 276; 39027-39036.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E. 1985. Croce C.M, Involvement of the Bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228;1440-1443 .
- Tsuruta F. J, Sunayama Y, Mori S, Hattori S, Shimizu Y, Tsujimoto K, Yoshioka N, Masuyama, Gotoh Y. 2004. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J* 23; 1889-1899 .
- Vander H. M. G, Chandel N. S, Williamson E. K, Schumacker P. T, Thompson C. B. 1997. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91; 627-37.
- Varfolomeev E. E, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann J. S, Mett I. L, Rebrikov D, Brodianski V. M, Kemper O. C, Kollet O, Lapidot T, Soffer D., Sobe T, Avraham K. B, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. 1998. 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* 9; 267-76.
- Verhage A.. M, Ekert P. G, Pakusch M, Silke J, Connolly L. M, Reid G. E, Moritz R, Simpson R. J, Vaux D. L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102; 43-53.
- Villa P. G, Henzel W. J, Sensenbrenner M, Henderson C. E, Pettmann B. 1998. Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J Cell Sci* 111; 713-22.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281; 1680-3.
- Wang H. G., Miyashita T, Takayama S, Sato T, Torigoe T, Krajewski S, Tanaka S, Hovey L, Troppmair J, Rapp U. R. 1994. Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* 9; 2751-6.
- Wang K, Yin X.M, Chao D.T, Millman C.L, Korsmeyer S .J.1996. BID: a novel BH domain-only death agonist. *Genes Dev* 10; 2859-2869 .
- Wei M.C, Zong W.X , Cheng E.H, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross A.J, Roth K.A, MacGregor G.R, Thompson C.B , Korsmeyer S.J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292; 727-730 .
- Welihinda A. A, Tirasophon W, Kaufman R. J. 1999. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr* 7; 293-300.
- White E. 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 10; 1-15.
- Woo M, Hakem R, Soengas M. S, Duncan G. S, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman S. A, Senaldi G, Howard T, Lowe S. W, Mak T. W. 1998. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12; 806-19.
- Wyllie A, Morris R. G, Smith A. L, Dunlop D. 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142; 67-77.
- Wyllie A. H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284; 555-6.
- Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer S.J. 1999. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 19; 8469-8478 .

- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise L.H, Thompson C.B, Korsmeyer S.J. 1995 .Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80; 285-291 .
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim C. N, Ibrado A. M, Cai J, Peng T. I, Jones D. P, Wang X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275; 1129-32.
- Yoshikawa T, Yamamoto Y, Naito Y. Free radicals in chemistry, Biology and Medicine, Ed. Oica International. *Londres* 2000.
- Yu J, Zhang L, Hwang P.M, Kinzler K.W, Vogelstein B. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7; 673-682 .
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis H. M, Horvitz H. R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75; 641-52.
- Yuan J, Yankner A. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407;802-809.
- Zamzami N, Kroemer G . 2001. The mitochondrion in apoptosis : how pandora's box open. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 ; 67- 71.
- Zamzami N, Susin S. A, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis [see comments]. *J Exp Med* 183; 1533-44.
- Zhou Q, Salvesen G. S. 1997. Activation of pro-caspase-7 by serine proteases includes a non-canonical specificity. *Biochem J* 324;361-4.
- Zhu H, Zhang L, Dong F, Guo W, Wu S, Teraishi F, Davis J.J, Chiao P.J, Fang B. 2005 . Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene* 24; 4993-4999.
- Zong W.X, Lindsten T, Ross A.J, MacGregor G.R, Thompson C.B. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15; 1481-1486 .
- Zou H, Henzel, Liu I , Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 . *Cell* 90; 405-13.

Glossaire

Apoptose (mort cellulaire programmée) : Processus actif d'autodestruction par fragmentation de certaines cellules aboutissant à leur phagocytose. Note: Cette mort cellulaire, contrairement à la nécrose, n'est pas consécutive à une agression mais génétiquement programmée.

Bcl-2 : Régulateur de l'apoptose qui favorise la survie cellulaire en inhibant les adaptateurs requis pour l'activation des protéases.

Beta-amyloïde : Protéine impliquée dans la phase initiation et de progression de la maladie d'Alzheimer.

BH3 : Un des 4 domaines d'homologie de Bcl-2.

Caspases : Protéase hautement régulée. Coupe les protéines exclusivement après les résidus aspartate. Responsable de la régulation de la protéolyse durant l'apoptose

Cytochrome C : Chromoprotéine dont le groupement prosthétique est une porphyrine qui transporte des électrons en passant alternativement de l'état de ferroporphyrine (fer ferreux) à l'état de ferriporphyrine (fer ferrique)mphocyte CD4+e.

Corps apoptotiques : Résultent de la fragmentation de l'ensemble de la cellule qui contiennent des organites cellulaires et des fragments de noyau entourés de membranes.

DNA polymérase: Enzyme catalysant une polymérisation, particulièrement celle des nucléotides, dans la formation des acides nucléiques à partir de matrices d'ADN ou d'ARN lors des processus de transcription et de réplication.

Fluorochrome : Un colorant fluorescent caractérisé par deux spectres: son spectre d'absorption (de la lumière incidente) et son spectre d'émission de fluorescence.

Homéostasie : Tendance de l'organisme à maintenir ses différentes constantes à des valeurs ne s'écartant pas de la normale (l'homéostasie assure, par exemple, le maintien de la température, du débit sanguin, de la tension artérielle, du pH, des volumes liquidiens de l'organisme, de la composition du milieu intérieur, etc.).

Inflammation : 1) Réponse fondamentale du corps humain envers une série d'agents exogènes ou endogènes. L'inflammation allergique prend une place très importante dans l'asthme, l'eczéma, la rhinite.

2) Réaction thermique d'un tissu irrité ou infecté provoquée par la congestion sanguine qui s'accompagne d'oedème et parfois de douleur. Ensemble des modifications vasculaires, tissulaires et humorales produites chez les êtres pluricellulaires par toute atteinte à leur intégrité tissulaire. Réaction d'un tissu vivant à une lésion; caractérisée par la rougeur, la douleur, la chaleur, l'oedème et par des altérations histologiques.

in vitro : Se dit d'un fait, d'une expérience ou d'une réaction qui se produit en milieu artificiel, en laboratoire sur une lame de verre ou dans de la verrerie de laboratoire.

in vivo : Se dit d'un fait qui évolue, d'une expérience ou d'une exploration qui est observée ou pratiquée dans l'organisme vivant. Note: La notion d'organisme vivant englobe l'atome des cellules, la cellule, la molécule, l'organe, l'appareil anatomique, le système physiologique et la structure anatomique.

Lymphocytes : Leucocyte mononucléaire présent dans le sang, la lymphe, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes.

Macrophages : Cellule qui dérive d'un monocyte ayant quitté la circulation sanguine pour passer dans un tissu et qui joue un rôle important dans l'immunité grâce, notamment, à son pouvoir de phagocytose.

Mitochondrie : Organite cytoplasmique constant dans toute cellule, de forme, taille et nombre variables, constitué d'une double membrane limitant une matrice amorphe, qui joue un rôle essentiel dans tous les phénomènes d'oxydation, qui emmagasine l'énergie cellulaire sous forme d'ATP et qui est susceptible de stocker certaines substances.

Nécrose : Processus de dégénérescence aboutissant à la mortification d'une cellule ou d'un tissu. Mortification cellulaire ou tissulaire.

Néoplasme : Formation pathologique (plus ou moins volumineuse) de tissu nouveau qui ressemble (plus ou moins) au tissu normal homologue (adulte ou embryonnaire) aux dépens duquel elle s'est développée, qui a tendance à persister et à s'accroître après l'arrêt des stimulus qui lui ont donné naissance, et qui échappe aux règles biologiques de la croissance et de la différenciation cellulaire.

Oligonucléosomaux (oligonucléosome) : Résultent de la fragmentation de l'ADN entre les nucléosomes.

Phosphatidylsérine : Phospholipide chargé négativement reconnu par les macrophages normalement confiné sur la face interne de la membrane plasmique.

Pro-domaine : Domaine amino-terminal d'une caspase.

SIDA : Stade ultime de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), caractérisé par une diminution du nombre de lymphocytes T4 (taux inférieur à 200 par millimètre cube de sang) qui entraîne une déficience du système immunitaire, laquelle favorise le développement d'infections opportunistes redoutables et de cancers.

Terminal transférase (TdT) : Enzyme capable d'ajouter un désoxynucléotide dans la partie 3'OH d'un brin d'ADN. De façon intéressante, PARP-1 est un substrat des caspases et subit un clivage dans son domaine de fixation à l'ADN ce qui isole la partie catalytique.

Nom et prénom :

- BOUANIKA Sakina
- BOURITA Chahida
- BOUSBIA Souad

Les jury :

- Encadreur: KEBAIECHE Mohamed
- Examinatrice: ROUIBEH Hassiba

Date de soutenance :

18/06/2007

Thème: Biochimie de l'apoptose**Résumé :**

L'apoptose est une notion plus ou moins récente dans les annales des laboratoires de recherche. Elle constitue un axe de recherche moléculaire appliquée tant à la physiologie qu'à la pathologie humaine et animales. Néanmoins, l'apoptose est peu documentée par les biologistes surtout du point de vue mécanismes moléculaires.

Ce présent travail consiste en l'ulicidation des principes physiologiques et pathologique de l'apoptose et ses mécanismes moléculaires. En effet, beaucoup de connaissances concernant sa définition, son importance dans le développement embryonnaire et modélisation de notre corps ainsi son implication dans les processus pathologiques chez l'homme ont été bien revues et bien documentées dans ce mémoire.

En fait, l'apoptose s'avère constituer un événement biologique indispensable pour combattre les cellules cancéreuses et certaine lymphocytes autoréactives. Par contre des implications pathologiques de l'apoptose pouvant être envisagés dans les cas du cancer, des maladies neuro-dégénératives et également dans le cas du diabète, des maladies cardiovasculaires et les maladies infectieuses.

Les mots clés : apoptose, cellules cancéreuses, mécanismes moléculaires, physiologiques et pathologique.

Summary :

The apoptosis is a more or less recent concept in annals of the research laboratories. It constitutes a molecular research orientation applied as well to physiology as with pathology human and animal. Nevertheless, the apoptose is documented little by the biologists especially in regard to the molecular mechanisms.

This present work consists of the ulicidation of the principles physiological and pathological of the apoptose and its molecular mechanisms. Indeed, much of knowledge concerning its definition, its importance in the development embryonnaire and modeling of our body. Thus its implication in the pathological processes in human, were well re-examined and documented in this memory.

In fact, the apoptose proves to constitute an essential to fight the cancerous cells and autoreactive lymphocytes. On the other hand pathological implications of the apoptose were considered in the cases of the cancer of the neuro-degenerative diseases and also in the case of diabetes and cardiovascular and infection diseases.

Key words: apoptosis, cancerous cells, molecular mechanisms, physiology and pathology.

المخلص:

الموت الخلوي المبرمج هو مفهوم حديث نوعا ما في التحاليل المخبرية للبحث، وهو يشكل محور البحث الجزئي المطبق في كل من الوظائف الخلوية والمرضية للإنسان والحيوان، إلا أنه أقل إحاطة من طرف البيولوجيين خاصة من ناحية الميكانيزم الجزئي. هذا العمل المقدم يعتمد على توضيح المبادئ الفيزيولوجية والمرضية للموت الخلوي المبرمج وآلياته الجزئية، والكثير من المعارف فيما يتعلق بتعريفه، أهميته في التطور الجنيني وتعديل تمفصل أجسامنا، أيضا مشاركته في العمليات المرضية للإنسان، كانت محطة تمحيص وإحاطة في مذكرتنا. في الواقع الموت الخلوي المبرمج يشكل حدثا بيولوجيا مهما في محاربة الخلايا السرطانية وبعض اللمفاويات ذاتية التفاعل. بالمقابل للموت الخلوي المبرمج تطبيقات مرضية يمكن أن تلاحظ في حالة السرطان، في تحلل الخلايا العصبية، وأيضا في حالة داء السكري، الأمراض القلبية والأمراض المعدية.

الكلمات المفتاحية: الموت الخلوي المبرمج، الخلايا السرطانية، الميكانيزم الجزئي، الوظائف الخلوية والمرضية.