

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



Université de Jijel.  
Faculté des Sciences.  
Département de Biologie  
Moléculaire et Cellulaire.



BC. 18/08

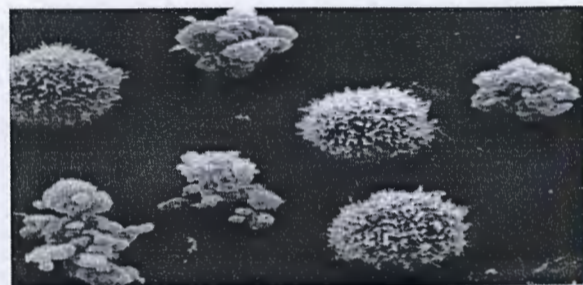
# Memoire

En vue de l'obtention du diplôme des études supérieures  
en Biologie.

Option : Biochimie

## Thème

Apoptose: Etude biochimique, physiologique et pathologique



### Jury :

- Encadreur : Mr KEBIECHE M.
- Examinatrice : M<sup>lle</sup> KEBSA W.

### Travail réalisé par :

- BOUDJIRA Mounia.
- BOUSBARA Mounira.
- HAMADUCHE Fatima  
Zohra.

Année Universitaire : 2007- 2008.





## REMERCIEMENT

*Nous remercions et louons Dieu qui nous a donné la force, la patience et la volonté tout au long des années de nos études et nous a honoré de sa science pour la réalisation de ce travail de recherche.*

*Nous tenons au terme de ce travail à exprimer notre plus grand remerciement à monsieur KEBIECHE Mohamed qui a suivi et dirigé notre travail avec patience et beaucoup d'intérêt, nous lui exprimons vivement notre grand respect.*

*Nos remerciements s'adressent également à notre examinatrice M<sup>lle</sup> KESBA Widad pour avoir accepté de critiquer notre travail.*

*Sans oublier les professeurs du département de Biologie pour leurs efforts et leurs sincérité.*



## Dédicace

*A mes parents les personnes les plus chères  
dans mon cœur pour leur soutien moral  
et matériel durant toutes mes années  
d'étude que dieu me les gardes.*

*Mon père : Ali.*

*Ma mère : Halima.*

*A ma chère grand-mère.*

*A mes chers frères : Abdennour, Nasradine et  
Abdelghani.*

*A mes chères sœurs : Nadjia, Assia et son mari  
Yazid.*

*A ma belle sœur : Mira.*

*Sans oubliant la bougie de la famille :*

*DJABER ISLAM.*

*A mon oncle : Messaoud qui n'a cessé de  
m'encouragé.*

*A toute la famille de BOUDJIRA et  
HIZZIR.*

*A mes collègues : Fatima et Mounira  
qu'on a partagé ce travail ensemble.*

*A mes très chères amies : Siham, Farida,  
Meriem, Hanane, Rokaya, Imen.D,  
Imen.Z.*

*A mon professeur d'anglais au CEM : Mr  
Khalfaoui et son épouse.*

*A tous ceux et celles que j'aime et  
respecte*

*Je dédie ce modeste travail.*

*MOUNIA.*



## Dédicace

*Je dédie ce travail à mes chers parents pour  
leurs encouragements et leur soutien  
moral et matériel durant toutes mes  
années d'étude que dieu le tout  
puissant me les gardes.*

*Mon cher père : Hocine.*

*Ma chère mère : Samia.*

*A mes chères sœurs : Amina, Aicha et Meriem.*

*A mon cher frère : Mohammed.*

*A ma chère cousine : Bochra.*

*A mes deux chères grands-mères ainsi qu'à tout  
les membres de la famille HAMADOUCHE et  
CHIKHI.*

*A mes chères collaboratrices Mounia et  
Mounira  
à l'élaboration de ce travail.*

*A mes amies : Sawsen, Nawal, Amina et  
Messaouda.*

*Et à tous ceux et celles que  
j'aime dans ma vie.*

**FATIMA  
ZOHRA.**



## *Dédicace*

*Je tiens tout d'abord de remercier très sincèrement mes parents pour leur soutien moral et matériel et pour leurs encouragements.*

*Mon père : Salah.*

*Ma mère : Fatiha.*

*Mes frères : Djamel, Abdelhak et Mohamed.*

*Mon frère Lakhidar, sa femme Ratiba et ses enfants :*

*Nassrine, Abdo et Tark,*

*Mon frère Khaled, sa femme Aziza et sa fille Marwa.*

*Ma sœur Leila, son mari Ahsen et ses enfants :*

*Zaki, Sara et Fadi.*

*Mes chères amies : Hoda, Akila, Farida, Mounia et Fatima.*

*En fin je dédie ce travail à toute la famille BOUSBARA et GHABGHOUB.*

*MOUNIRA.*

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique.  
**AIF**: Apoptosis Inducing Factor.  
**ANT**: Adenine Nucleotide Translocase.  
**Apaf-1**: Apoptotic-Protease-Activating-Factor 1.  
**ARN** : Acide Ribonucléique.  
**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger.  
**Asp-x**: Acide Aspartique.  
**ATP**: Adénosine Triphosphate.  
**Bad**: Bcl-2 Antagonist of cell Death protein.  
**Bak**: Bcl-2 homologous Antagonist /Killer.  
**Bax**: Bcl-2 Associated X protein.  
**BBC 3**: Bcl-2 Binding Component 3.  
**Bcl-2**: B Cell Lymphoma protein 2.  
**BH**: Bcl-2 Homology.  
**Bid**: BH3-Interacting Domain death agonist.  
**Bik**: Bcl-2 Interacting killer.  
**Bim**: Bcl-2 Interacting Mediator of cell death.  
**Bim EL** : Bim isoforme Extra-Longue.  
**Bim f**: Bcl-2 modifying factor.  
**Bim L** : Bim isoforme Longue.  
**Bim S**: Bim isoforme courte.  
**BIR**: Bacuioviscus IAP Repeat.  
**CAD**: Caspase Activated DNase.  
**CARD** : Caspase Reruitement Domain.  
**Caspase** : cysteinyl aspartyl proteases.  
**CD**: Classe de Diversification.  
**Ced**: Cell death abnormal.  
**CrmA**: Cytokine response modifier A.  
**Cyp-D**: Cyclophiline D.  
**DD**: Death Domain.  
**DED**: Death Effector Domain.  
**DIABLO**: Direct IAP biding protein with low pI.  
**DISC**: Death Inducing Signaling Complex.  
**FADD**: Fas Associated Death Domain.  
**Fas**: Fibroblast-associated.  
**FasL**: Fibroblast-associated Ligand.  
**FLIP**: FLICE-Inhibitory Protein.  
**Gas-2**: Growth arrest spesific-2.  
**HtrA2**: High temperature requirement.  
**IAP**: Inhibitor of Apoptosis Protein.  
**ICE**: Interleukin-1 Converting Enzyme.  
**IL** : Interleukine.  
**JNK** : c-Jun N-terminal Kinase.  
**Kpb**: Kilo paires de bases.  
**MC (159-160)**: Molluscum Contagiosum (159-160).

**Mcl-1:** Myeloid cell lymphoma 1.  
**MTP:** Membrane Transition Permeability.  
**NGF:** Nerve Growth Factor.  
**P53:** Protéine 53.  
**pH :** potentiel Hydrogène.  
**PS:** Phosphatidylsérine.  
**PARP:** Poly (ADP-ribose) Polymerase.  
**PTP :** Pore de Transition de Perméabilité.  
**PUMA:** P53-Upregulated Modulator of Apoptosis.  
**RAIDD:** RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with DD.  
**RIP:** Receptor Interacting Protein.  
**ROS:** Reactive Oxygen Species.  
**SIDA:** Syndrome d'immunodéficience acquise.  
**SIMP :** Soluble Inter membrane mitochondrial Protein.  
**Smac:** Second mitochondria-derived factor activator of caspases.  
**tBid:** Truncated Bid.  
**TNF:** Tumor Necrosis Factor.  
**TNF-R:** Tumor Necrosis Factor- Receptor.  
**TRADD:** TNF-R Associated protein with DD.  
**TRAIL:** TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand.  
**VDAC :** Voltage-Dependent –Anion Canal.  
**VIH:** Virus d'Immunodéficience Humaine.  
**XIAP:** X-Linked IAP.  
 **$\Delta\Psi_m$  :** potentiel transmembranaire mitochondrial

# ***SOMMAIRE***



# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## *Chapitre I: Généralités*

I-1- Définition de l'apoptose .....	2
I-2- Nécrose et apoptose.....	2
I-3- Intérêt de l'apoptose.....	4
I-4- Caractéristiques de l'apoptose.....	4
I-4-1- Les stigmates morphologiques.....	4
I-4-2- Les stigmates biochimiques.....	6
I-4-2-1- L'externalisation des marqueurs membranaires .....	6
I-4-2-2- La fragmentation de l'ADN.....	6
I-4-2-3- L'atteinte mitochondriale.....	7

## *Chapitre II: Biochimie de l'apoptose*

II-1- Déroulement de l'apoptose.....	8
II-2- <i>Caenorhabditis elegans</i> : Un modèle d'étude .....	9
II-2-1- Les homologues mammifères de <i>Ced-3</i> .....	9
II-2-2- Les homologues mammifères de <i>Ced-9</i> .....	9
II-2-3- Les homologues mammifères de <i>Ced-4</i> .....	9
II-3- Les voies de l'apoptose.....	11
II-3-1- La voie extrinsèque.....	12
II-3-1-1- Les récepteurs de mort.....	13
II-3-1-2- Les acteurs cytoplasmiques de l'apoptose.....	14
A- Apaf-1.....	14
B- Les caspases .....	15

B-1- La nomenclature et les différentes classifications des caspases.....	15
B-2- Les mécanismes d'activation des caspases.....	15
B-2-1- L'autoactivation des caspases initiatrices .....	17
B-2-2- La transactivation des caspases effectrices.....	18
B-3- Les substrats protéolysés par les caspases.....	18
B-4- Invalidation génique .....	20
II-3-2- La voie intrinsèque.....	21
II-3-2-1- Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose.....	22
II-3-2-2- Mécanisme de relargage.....	22
II-3-2-3- Les protéines mitochondriales de l'apoptose.....	24
A- Les protéines de la voie caspase-dépendante.....	24
A-1- Le cytochrome C .....	24
A-2- La protéine Smac/DIABLO.....	24
B- Les protéines de la voie caspase-indépendante.....	25
B-1- La protéine AIF.....	25
B-2- La protéine Omi/HtrA2.....	25
II-3-2-4- Les protéines de la famille Bcl-2 contrôlant la phase mitochondriale de l'apoptose.....	25
A- Le rôle des protéines de la famille de Bcl-2.....	27
B- Classification des protéines de la famille Bcl-2.....	27
B-1- Les anti-apoptotiques.....	29
B-2- Les pro-apoptotiques.....	29
B-2-1- Les protéines à multiples domaines BH.....	29
B-2-2- Les protéines à domaine BH3 seulement.....	30
C- Invalidation génique.....	32
II-4- Les protéines inhibitrices de l'apoptose.....	33

II-4-1- p35 et CrmA.....	33
II-4-2- FLIP, protéine E8, MC159 et MC160.....	34
II-4-3- Les IAPs.....	34

***Chapitre III: Apoptose en physiologie et pathologie.***

III-1- Apoptose physiologique.....	35
III-1-1- Développement du système nerveux.....	35
III-1-2- Développement du système immunitaire.....	37
III-1-3- Apoptose chez l'adulte.....	37
III-2- Apoptose pathologique.....	38
III-2-1- Cancer et apoptose.....	38
III-2-2- Maladie alcoolique du foie.....	39
III-2-3- Stress oxydant.....	40
<b>Conclusion.....</b>	<b>41</b>

**Références bibliographiques.**

## Liste des tableaux

<b>Tab.1.</b> Comparaison biochimique et morphologique entre l'apoptose et la nécrose.....	3
<b>Tab.2.</b> Substrats des caspases.....	19

## Liste des figures

<b>Fig.1.</b> Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose.....	5
<b>Fig.2.</b> Illustration des principales altérations de la cellule pendant l'apoptose.....	5
<b>Fig.3.</b> Les trois phases de l'apoptose.....	10
<b>Fig.4.</b> Les protéines impliquées dans l'apoptose chez <i>C. elegans</i> et chez les mammifères.....	10
<b>Fig.5.</b> Les deux voies principales du déclenchement de l'apoptose.....	11
<b>Fig.6.</b> Voie apoptotique des récepteurs de mort.....	12
<b>Fig.7.</b> Représentation schématique de la formation de l'apoptosome.....	14
<b>Fig.8.</b> Les différentes classifications de caspases.....	16
<b>Fig.9.</b> Mécanisme général d'activation des caspases.....	16
<b>Fig.10.</b> L'autoactivation des caspases initiatrices 2,8 et 10.....	17
<b>Fig.11.</b> Structure tridimensionnelle des caspases 1 et 3.....	21
<b>Fig.12.</b> Représentation des voies apoptotiques mitochondriales.....	23
<b>Fig.13.</b> Structure de Bcl-xL (A) et de Bcl-2 (B).....	26
<b>Fig.14.</b> Les membres de la famille Bcl-2 .....	28
<b>Fig. 15.</b> Mort par apoptose des cellules de la commissure des doigts durant le développement embryonnaire.....	36
<b>Fig. 16.</b> Intervention de l'apoptose dans le développement du système nerveux.....	36



# ***INTRODUCTION***

## INTRODUCTION

Le terme d'apoptose ou mort cellulaire programmée a été introduit en 1972 pour définir une forme de mort cellulaire morphologiquement, biochimiquement et moléculairement différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire connue jusqu'alors (Kerr et al., 1972). « Apoptose » est un nom qui signifie « chute » en grec ancien et qui a été utilisé en référence à la chute des feuilles des arbres en automne, la chute des pétales de fleurs qui se fanent, une métaphore pour une mort à la fois naturelle, inéluctable et programmée. Le terme apoptose désigne un tableau morphologique associant condensation cytoplasmique et chromatinienne, fragmentation de l'ADN (Acide désoxyribonucléique), bourgeonnement de la membrane plasmique et perte de l'asymétrie membranaire ; la synthèse de macromolécules est parfois requise et ces changements sont rapidement suivis de la phagocytose des cellules mortes (Ameisen, 1999).

L'apoptose est considérée comme un processus programmé en ce sens que lorsqu'une cellule reçoit un signal de mort ou perd un signal de survie, elle effectue plusieurs étapes intracellulaires stéréotypées aboutissant à sa dégénérescence. Ces étapes semblent codées dans le génome de la cellule puisque l'expression d'ARNm (Acide ribonucléique messager) nouveaux est très souvent nécessaire au déclenchement et à la poursuite de l'apoptose (Oppenheim et al., 1990).

En effet, l'apoptose est un processus de mort cellulaire hautement régulé qui se déroule tout au long de la vie d'un organisme. Elle est essentielle au cours du développement du fœtus, entre autre pour sculpter les doigts et les orteils. Au cours de la vie adulte, elle est essentielle pour maintenir l'homéostasie des tissus et joue un rôle important dans le système immunitaire, que ce soit pour éliminer les cellules infectées par un virus ou encore pour détruire les lymphocytes auto-réactifs (Strasser, 2005).

Il a été noté que toute anomalie de l'apoptose peut être responsable du déclenchement et de la progression de nombreuses pathologies. Une résistance accrue contre l'apoptose entraîne l'apparition de maladies comme les cancers ou syndromes lymphoprolifératifs ; à l'inverse, un excès d'apoptose participe à l'émergence de maladies neurodégénératives chroniques (l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson.....), syndromes d'immunodéficiences comme le SIDA (Syndrome d'immunodéficiences acquise) (Groux et al., 1991 ; Mapara et al., 1993 ; Fisher, 1994 ; Griffith et al., 1995) et d'autres atteintes comme les accidents vasculaires cérébraux, les hépatites fulminantes ou alcooliques et enfin les lésions causées par des méningites (Thompson, 1995).

Cependant, si l'apoptose paraît un phénomène cellulaire ayant des conséquences de grandes importances tant sur le plan physiologique que sur le plan pathologique, il est prépondérant de faire une approche biochimique afin d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus de mort programmé. C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail bibliographique ayant pour objectifs essentiels: d'aborder la question de l'apoptose par des généralités ; d'étudier les mécanismes biochimiques d'initiation et d'exécution de l'apoptose ; ainsi de mettre en évidence l'impact de cette dernière, sur la physiologie et la pathologie de l'organisme.

*Chapitre I :*

*Généralités*

## I-1- Définition de l'apoptose

L'apoptose est un cas de mort cellulaire programmée suivant une séquence d'événements cellulaires bien précis, décrits en 1972 par Kerr, Wyllie et Curie. Elle concerne les animaux et constitue le cas le plus étudié de mort cellulaire programmée. Elle permet l'élimination d'une cellule sans provoquer de dommages aux cellules environnantes. Apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles en automne (du grec *apo* pour éloignement, *ptose* pour chute) (Kerr et al., 1972).

Cette dernière est un type de mort cellulaire actif qui désigne une séquence de modifications morphologiques caractéristiques : condensation du cytoplasme et de la chromatine, fragmentation de la cellule et du noyau en corps apoptotiques qui vont ensuite relargués, et vont être phagocytés sans aucune réaction inflammatoire, par opposition à la nécrose qui est une mort incontrôlée, violente et rapide, se manifeste souvent comme un éclatement immédiat de la cellule provoquant l'effondrement de l'homéostasie interne et est associée à des réactions inflammatoires (Clarke, 1996).

L'apoptose est une forme physiologique de mort cellulaire hautement régulée et elle est nécessaire à la survie des organismes typiquement multicellulaires. Ces derniers s'autodétruisent lorsque ceux-ci ne sont plus utiles, lorsqu'ils sont endommagés ou lorsqu'ils sont en dysfonctionnement. L'apoptose apparaît donc comme une fonction cellulaire normale, comme la division cellulaire ou la différenciation cellulaire (Meier et al., 2000).

## I-2- Nécrose et Apoptose

L'apoptose et la nécrose sont différentes d'un point de vue mécanistique : la nécrose est la conséquence passive d'une agression de la cellule alors que l'apoptose est parfaitement intégrée dans les processus physiologiques normaux de la cellule (Groux et al., 1991 ; Mapara et al., 1993 ; Fisher, 1994 ; Griffith et al., 1995) (Tab.1).

La nécrose est considérée comme une mort cellulaire "désordonnée". En effet au cours de la nécrose, les cellules vont se gorger d'eau au point que cela va entraîner la lyse de leurs membranes plasmiques. 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" (Bicknell and Cohen, 1995 ; Dong et al., 1997) par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong et al., 1997). Les fragments ainsi générés sont dépourvus d'extrémité 3' sortante.

Par opposition, l'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée rapide (quelques heures) et discrète mettant en œuvre une véritable machinerie interne de destruction de la cellule, procédant par différentes phases chronologiques (Kerr et al., 1972 ; Duvall and Wyllie, 1986) (Fig.1).



**Tab.1:** Comparaison biochimique et morphologique entre l'apoptose et de nécrose (Thomas et al., 2004).

	<i>APOPTOSE</i>	<i>NECROSE</i>
<b>Origine du terme</b>	Du grec <i>Apo</i> "loin de" et <i>ptôsis</i> "chute"	Du grec <i>nekros</i> "mort"
<b>Causes</b>	Mort cellulaire physiologique "naturelle" par suicide provoquer 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 provoquée par une agression physique ou chimique de l'environnement cellulaire.
<b>Morphologie</b>	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). 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 réactions inflammatoires, les corps apoptotiques non phagocytés peuvent provoqués une nécrose secondaire.	1- Gonflement et éclatement de la cellule et de ses organites par rupture membranaire. 2- Déversement du contenu cellulaire dans le milieu environnant provoquant une réaction inflammatoire.
<b>Biochimie</b>	1- Processus actif, requit de l'énergie, nécessitant la synthèse de protéines spécifiques. 2- Au cours de la condensation cellulaire : perte des contacts cellulaires avec les cellules voisines, translocation des phosphatidylsérines 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) 3- Libération par la mitochondrie de divers facteurs (cytochrome c, AIF.....) 4- Activation de la cascade des caspases. 5- Au cours de la condensation nucléaire : fragmentation spécifique de l'ADN (clivage internucléosomique) (Thomas et al., 2004).	1- Processus passif, ne requerrant pas d'énergie. 2- Perte de la régulation de l'homéostasie cellulaire de l'eau et des ions. 3- Fragmentation aléatoire de l'ADN (Thomas et al., 2004).
<b>Nature</b>	Mort silencieuse par « implosion ».	Mort bruyante par « explosion ».

### I-3- Intérêt de l'apoptose

L'apoptose est une réponse hautement conservée qui joue un rôle déterminant dans le développement (embryogenèse) et l'homéostasie tissulaire. Paradoxalement, elle contribue à la "sculpture du vivant" à l'image du modelage progressif de nos doigts "transformant une moufle en gant" (Ameisen, 1999).

Elle est impliquée aussi dans le développement du système nerveux et participe notamment à l'élimination de cellules surnuméraires lors du développement embryonnaire (Groux et al., 1991 ; Mapara et al., 1993 ; Fisher, 1994 ; Griffith et al., 1995). Au niveau du système immunitaire, elle participe au processus de sélection négative des lymphocytes (élimination des lymphocytes immatures auto-réactifs), configurant un système de défense spécifique capable de dialoguer avec le soi sans l'agresser.

### I-4- Caractéristiques de l'apoptose

Les premières descriptions de l'apoptose ont attribué beaucoup d'importance aux aspects morphologiques des modifications que subissent les cellules pendant ce phénomène. Pendant longtemps, la seule façon d'identifier l'apoptose fut d'observer les bourgeonnements de la membrane cellulaire, la condensation de la chromatine dans le noyau et l'apparition des corps apoptotiques (Kerr et al., 1972 ; Duvall et Wyllie, 1986). Puis viennent la description moléculaire spécifique de l'apoptose, telle que la fragmentation intranucléosomale de la chromatine, des changements de la composition membranaire ou l'atteinte mitochondriale (Fig. 2).

#### I-4-1- Les stigmates morphologiques

Lorsqu'une cellule entre en apoptose, les premiers événements d'atteintes structurales observables sont la ségrégation de la chromatine à la périphérie de l'enveloppe nucléaire, la condensation du cytoplasme malgré une intégrité apparente de la membrane plasmique, et la formation d'invagination des membranes plasmiques et nucléaires, donnant un aspect de bourgeon à la surface membranaire périphérique.

L'apparition de ces modifications morphologiques s'accompagne d'un isolement de la cellule apoptotique des cellules voisines. L'évolution des invaginations membranaires aboutit à la fragmentation de la cellule en petits éléments, appelés corps apoptotiques, composés de membrane plasmique qui englobe du cytoplasme, des organites et parfois des fragments nucléaires. Ce n'est que dans cette deuxième étape du processus apoptotique qu'une altération morphologique d'organites cytoplasmiques peut être observée, telle que la dilatation du réticulum endoplasmique ou la désagrégation des polysomes (Kerr et al., 1972).

Les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines avant l'altération des membranes dégradées par les lysosomes et réduits en résidus "non-reconnaissables", évitant ainsi toute réaction inflammatoire.

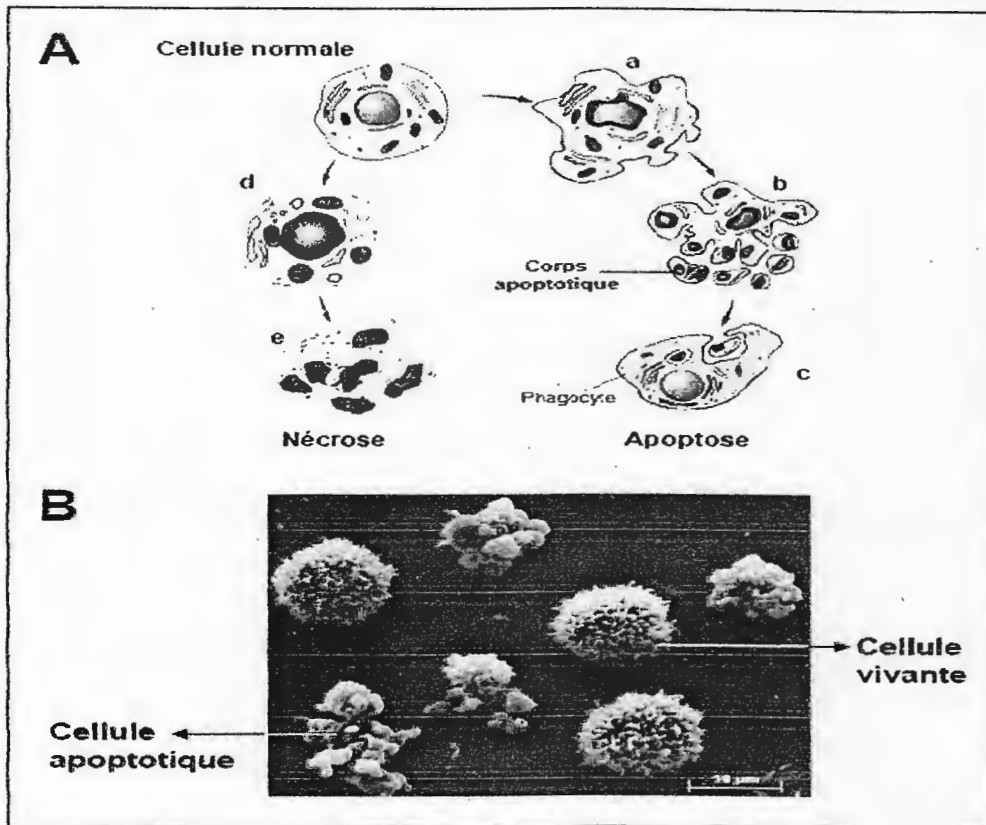


Fig. 1 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose.

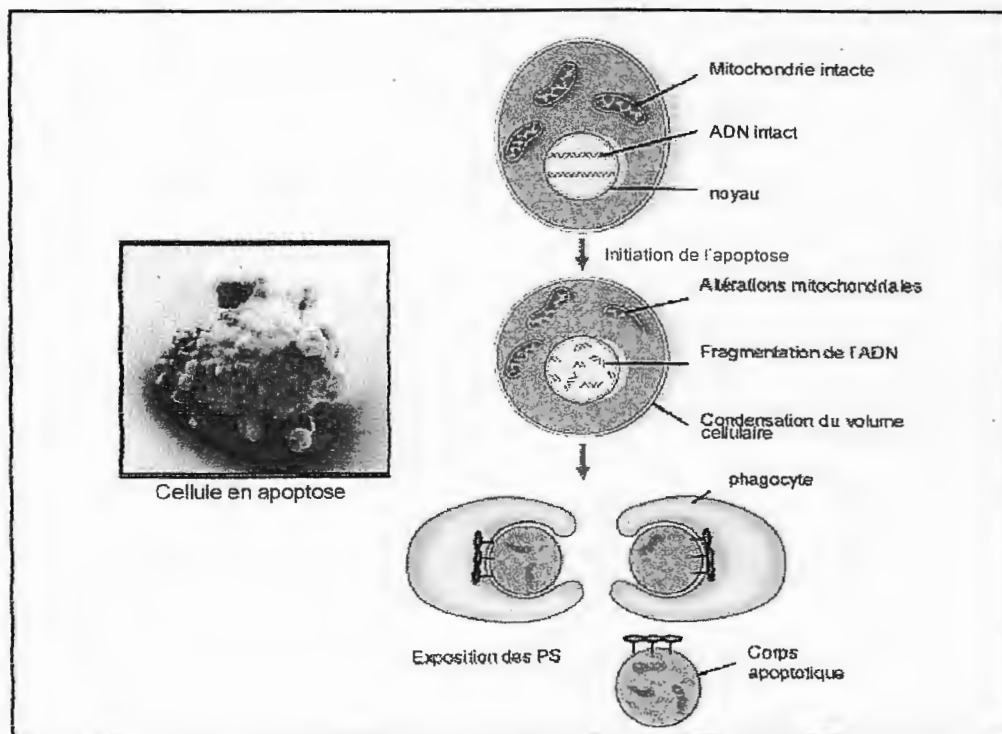


Fig. 2 : Illustration des principales altérations de la cellule pendant l'apoptose (Duvall and Wyllie, 1986)

### **I-4-2- Les stigmates biochimiques**

De nombreux changements biochimiques sont observés dans les cellules apoptotiques. Il s'agit par exemple d'une modification des flux calciques responsables de l'activation de nombreuses enzymes, dont des nucléases qui induisent la fragmentation de l'ADN (Ucker et al., 1992 ; Wu et al., 2000), de l'activation de transglutaminases impliquées dans la réorganisation des éléments du cytosquelette menant aux invaginations membranaires et à la formation des corps apoptotiques, de l'activation de protéases à cystéine (les caspases), de la production accrue des céramides ou encore de la génération de radicaux libres.....(Gentile et al., 1992).

#### **I-4-2-1- L'externalisation de marqueurs membranaires**

Si l'intégrité de la membrane plasmique des cellules apoptotiques est préservée, la membrane est néanmoins modifiée. Elle perd en effet son asymétrie et expose un phosphatidylsérine (PS), sur le feuillet externe de la membrane. Les mécanismes d'une telle translocation sont encore mal définis, mais pourraient être liés à l'inhibition d'une translocase (qui transporte les PS sur le feuillet interne) et à la stimulation  $Ca^{2+}$ -dépendante d'une "scramblase" responsable du phénomène flip-flop des phospholipides (Bratton et al., 1997). Ce phénomène apparaît tôt dans l'apoptose et semble indépendant du type cellulaire. Un changement de l'expression de sucres est également observé à la surface des cellules apoptotiques ou de ces fragments (Duvall et al., 1985). Ces sucres sont reconnus par les récepteurs de la vitronectine et de la fibronectine des macrophages (Savill et al., 1990 ; Fadok et al., 1992). In vivo, l'expression précoce de ces différents marqueurs membranaires à la surface des cellules entrant en apoptose permet la reconnaissance des cellules apoptotiques et donc une élimination précoce afin d'éviter toute réaction inflammatoire.

#### **4-2-2- La fragmentation de l'ADN**

La mort par apoptose est caractérisée par un clivage de la chromatine nucléaire en fragments double-brins. L'activation de la première endonucléase décrite, une endonucléase calcium-dépendante, provoque la fragmentation de l'ADN au niveau des régions charnières entre les oligonucléosomes, sur lesquels s'enroule l'ADN, libérant ainsi des éléments nucléaires dont la taille est un multiple entier de 180-200 paires de bases (pb) et donnant ainsi un aspect d'échelle sur gel d'agarose (Wyllie, 1980). Cette "échelle d'ADN" a longtemps été considérée comme une caractéristique de l'apoptose. Cependant, des résultats plus récents ont montré que l'apoptose pouvait s'accompagner de fragmentation de l'ADN en éléments de grandes tailles (50-300 Kpb), visibles uniquement en électrophorèse en champ pulsé (Cohen et al., 1992).

Le clivage de l'ADN semble ainsi procédé par étapes successives : la première correspond à la fragmentation en éléments de grandes tailles due à l'activation d'endonucléases calcium-dépendantes, telles que l'ADNase II (Wu et al., 2000) et une nucléase de 40 KDa (DNase I-like endonucléase) (Ucker et al., 1992). La seconde étape fait intervenir des endonucléases magnésium et/ou calcium dépendantes, telles que l'ADNase I (Oliveri et al., 2001) ou CAD (Caspase Activated DNase) (Enari et al., 1998) aboutissant à la formation de fragments de petites tailles.



En revanche, des fragments de 100-300 Kpb (Kilo paires de bases) ont également été observés dans des cellules en nécrose (Bicknell and Cohen, 1995). La fragmentation d'ADN ne peut donc être considérée comme caractéristique de l'apoptose que lorsqu'elle est associée à une morphologie typique de l'apoptose.

#### **I-4-2-3- L'atteinte mitochondriale**

Depuis la découverte de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), protéine inhibant l'apoptose et située dans la membrane des mitochondries (Sentman et al., 1991), de nombreux auteurs ont mis en évidence l'implication des mitochondries au cours du processus apoptotique. Leur participation dans l'apoptose est associée à une transition de la perméabilité membranaire (MTP) (Membrane transition permeability) et un effondrement du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), résultant de l'ouverture de mégapores mitochondriaux.

Du fait de sa haute concentration en solutés, un gonflement osmotique progressif de la matrice est parfois observé, dont l'aboutissement ultime est la rupture physique de la membrane externe. L'ouverture de ces pores est décrite comme l'étape d'intégration du signal apoptotique et de non-retour de la cellule vers l'apoptose. La MTP peut en effet être induite directement par de nombreux facteurs apoptotiques tel que : le calcium, les espèces réactives de l'oxygène, un changement de pH (potentiel hydrogène) (Crompton, 1999) et Bax (Bcl-2 Associated X protein), protéine pro-apoptotique de la famille des Bcl-2 (Marzo et al., 1998), mais également de façon indirecte par : des caspases, des céramides, la protéine p53 (suppresseur de tumeur), capables de moduler l'activité de protéines de la familles des Bcl-2.

Les conséquences de l'ouverture des mégapores sont multiples : rupture du métabolisme énergétique, formation de radicaux libres lors du découplage de la chaîne respiratoire, libération de facteurs apoptotiques séquestrés dans la matrice, comme le cytochrome c, des caspases, AIF (Apoptosis Inducing Factor), augmentation de la concentration de  $Ca^{+2}$  intracellulaire..... Cette altération des mitochondries se produit avant les changements biochimiques de la membrane plasmique et la fragmentation de l'ADN (Petit et al., 1997 ; Gross et al., 1999).

*Chapitre II :*

*Biochimie de  
l'apoptose*

## II-1- Déroulement de l'apoptose

Au cours des dernières années, les recherches ont porté sur l'identification des éléments du programme de mort cellulaire. Cependant, malgré la découverte d'acteurs importants dans ce processus, peu d'éléments sont encore à notre disposition pour construire une image cohérente de la façon dont le programme apoptotique se déclenche et est régulé (Ameisen, 1999).

Ceci est dû au fait que beaucoup de facteurs susceptibles d'induire l'apoptose (par exemple les protéines oncogéniques, les protéines suppresseurs de tumeurs, les facteurs de croissances et certaines cytokines) sont aussi capables de l'inhiber dans certains cas. La réponse biologique de la cellule résulte de l'intégration des différentes signalisations de l'environnement qui lui sont perceptibles en fonction de son génotype et de son phénotype à ce moment donné.

Cependant, malgré l'extrême diversité des signaux intervenant dans l'exécution du programme apoptotique et sa régulation, on peut dégager des mécanismes généraux qui se sont conservés au travers de l'évolution et qui font intervenir des protéines dont l'expression conditionne la survie cellulaire comme par exemple des protéases intracellulaires spécifiques appelées caspases, des cytokines, les protéines de la famille Bcl-2, etc... (Ameisen, 1999).

Le processus apoptotique peut être divisé en trois phases chronologiques successives. Les deux premières dites d'initiation et de décision sont toutes les deux réversibles et modulables par des facteurs anti-apoptotiques. La troisième phase, dite d'exécution ou de dégradation protéique et nucléaire est irréversible et confère à la cellule les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose (Duneau, 2005) (Fig. 3).

### ❖ La phase d'initiation

Ou pré-mitochondriale, peut être déclenchée par des stimuli aussi variés que des radiations ionisantes (Farrell et al., 1998), une carence en facteurs de croissance, des drogues cytotoxiques, du glucose, des acides gras, des céramides ou des formes réactives de l'oxygène. Les cytokines, membres de la famille du TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) ainsi que leurs récepteurs jouent un rôle particulièrement important dans le contrôle de cette phase d'initiation (Goldkorn et al., 1998).

### ❖ La phase de décision

Ou mitochondriale, est l'étape au cours de laquelle les différents signaux de mort et/ou de survie sont intégrés par la cellule qui, en fonction de son état physiologique et de son contexte environnemental, va orienter la réponse vers la mort ou vers la survie. Cette intégration fait appel à un certain nombre de médiateurs intracellulaires anti-ou pro-apoptotiques tels que les caspases, les protéines de la famille Bcl-2, les céramides, etc (Duneau, 2005).

## ❖ 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 protéase (les caspases) et de nucléases : l'acquisition du morphotype apoptotique est contemporaine de cette phase (Duneau, 2005).

### II-2- *Caenorhabditis elegans* : un modèle d'étude

La majeure partie de nos connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'apoptose provient des travaux menés sur le nématode "*Caenorhabditis elegans*". Ces recherches ont montré que sur les 1090 cellules produites durant le développement embryonnaire de *C.elegans*, 131 meurent, certaines moins d'une heure après le dédoublement cellulaire qui leur a donné naissance. Ces cellules meurent par apoptose. L'analyse de mutants génétiques de *C.elegans* a permis de mettre en évidence 3 gènes qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de cette mort cellulaire programmée. Ils ont été nommés : *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* (Ced : Cell death abnormal), (Fig. 4). Dans les mutants où soit *ced-3* soit *ced-4* sont incapable de fonctionner, l'ensemble des 1090 cellules survit ; à l'inverse, dans les mutants où *ced-9* ne s'exprime pas, l'ensemble des cellules de l'embryon meurt. Les gènes *ced-3* et *ced-4* sont donc requis pour l'initiation et l'exécution de l'apoptose.

Les homologues des gènes *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* ont été identifiés chez les mammifères et correspondent chacun à une famille de gènes, ce qui aboutit à une grande diversification d'action de ces molécules pro ou anti-apoptotiques (Hengartner and Horvitz, 1994).

#### II-2-1- Les homologues mammifères de *ced-3*

Le gène *ced-3* code pour une cystéine protéase homologue à l'enzyme de conversion de l'interleukine-1- $\beta$ -humaine ou ICE (Interleukin-1 Converting enzyme), cette protéine rebaptisée plus tard caspase-1, constitue en fait le premier membre d'une famille de protéases nommées caspases (cysteinyl aspartyl proteases) (Yuan et al., 1993).

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

Les homologues mammifères du gène *ced-9* correspondent à une famille de gènes codant pour les protéines de la famille Bcl-2, régulateurs majeurs de l'apoptose notamment pour leur action au niveau de la mitochondrie (Hengartner and Horvitz, 1994).

#### II-2-3- Les homologues mammifères de *ced-4*

L'homologue mammifère du gène *ced-4* a été découvert en 1997 par l'équipe de Wang (Zou et al., 1997) et il correspond à l'Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1). L'Apaf-1 est un régulateur de l'apoptose au niveau des phases post-mitochondriales et son action est dépendante de son association au cytochrome c, pour former une structure particulière nommée apoptosome, elle-même responsable d'une activation en cascade de certaines caspases (caspase3).

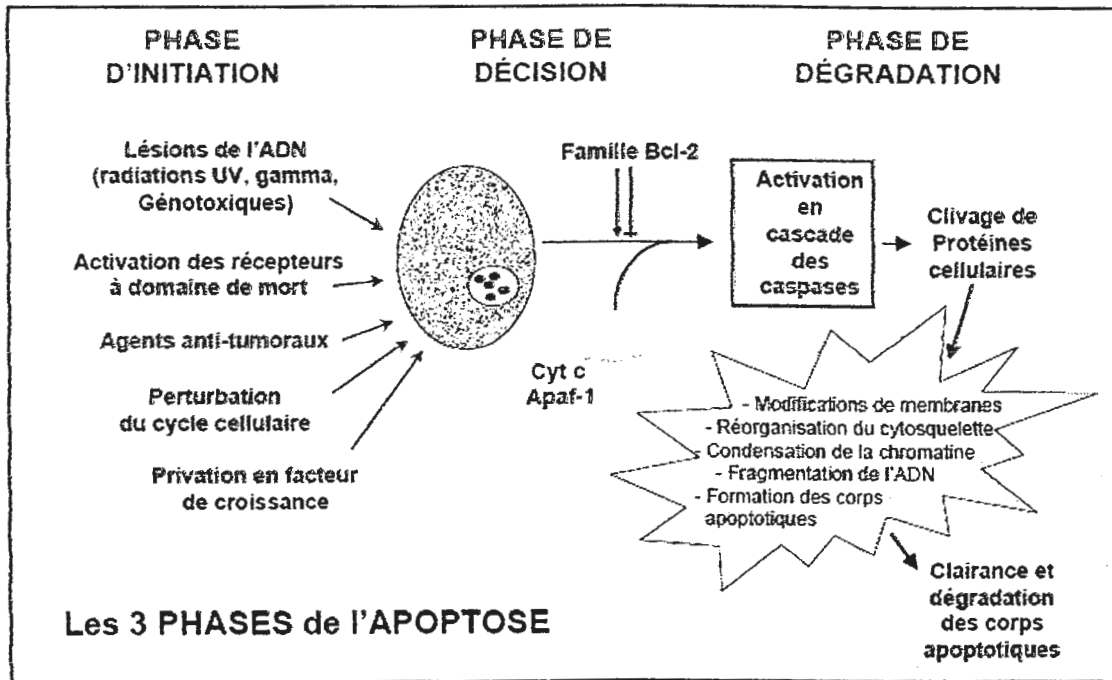


Fig.3: Les trois phases de l'apoptose (Duneau, 2005).

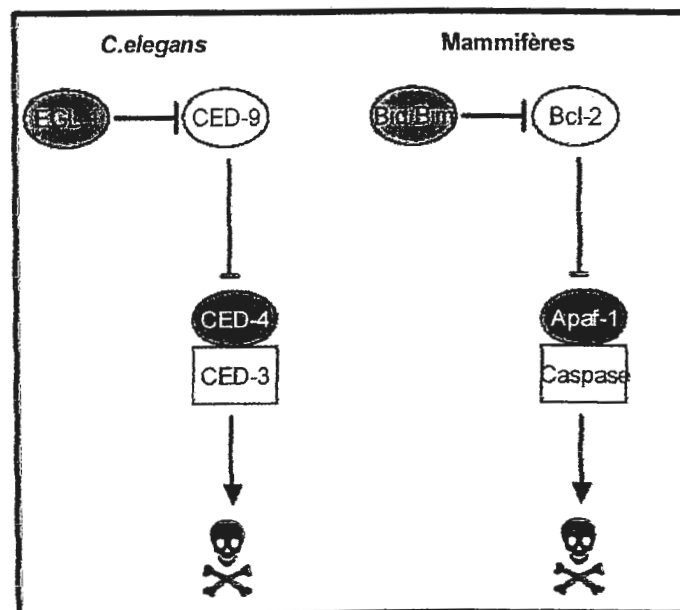


Fig. 4: Les protéines impliquées dans l'apoptose chez *C. elegans* et chez les mammifères (adapté de Couzinet et al., 2002).

II-3- Les voies de l'apoptose

Il existe deux grandes voies de signalisation aboutissant à la mort. La première appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. La deuxième voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort. Bien que les évènements initiaux menant à l'apoptose diffèrent dans chacun des cas et seront expliqués un peu plus loin, les deux voies 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) (Fig.5).

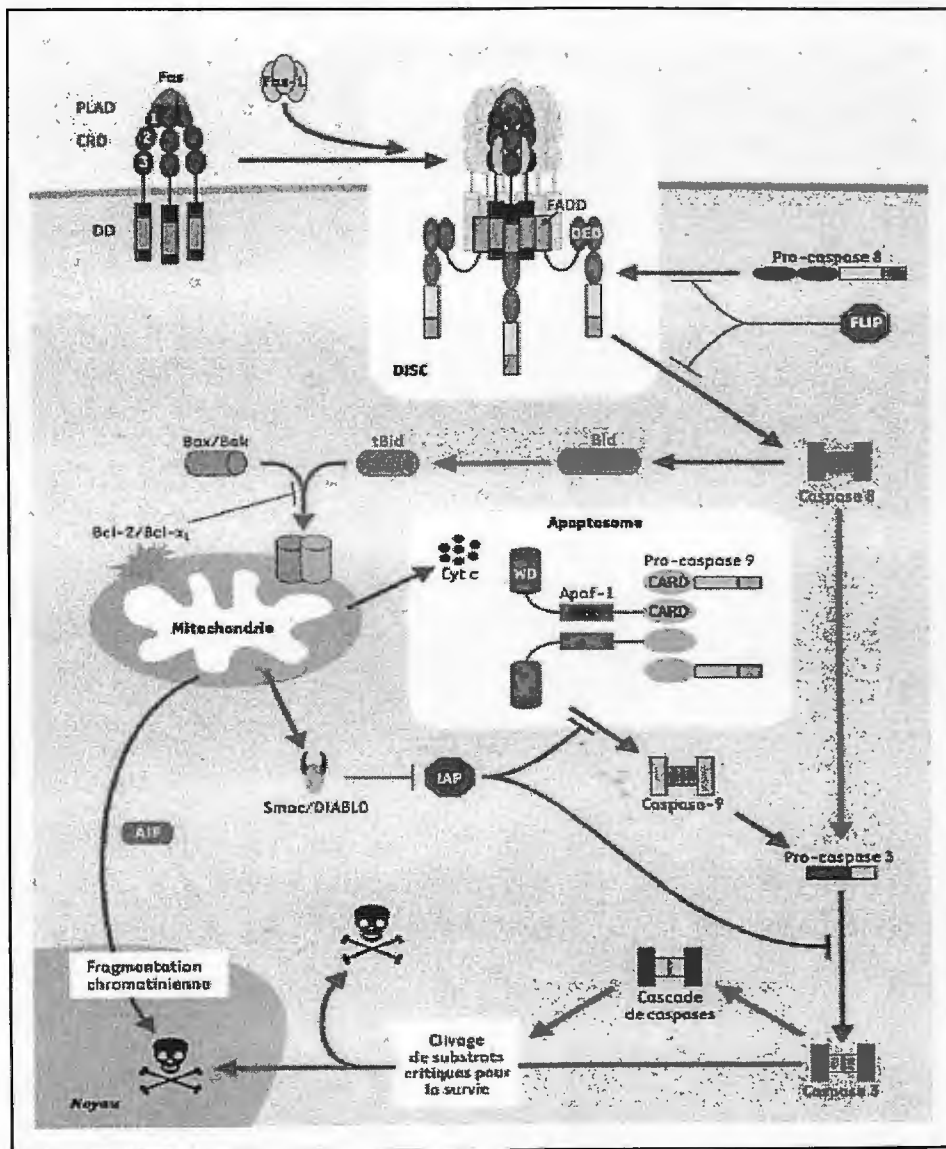


Fig. 5: Les deux voies principales du déclenchement de l'apoptose (Couzinet et al., 2002).

II-3-1- La voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose est souvent appelée voie 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 (Fig.6). 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 initiatrices. Ces caspases sont alors activées selon le modèle de la proximité induite. A 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 entrain de se produire (Debatin et al., 2004) : dans les cellules de type I, la caspase initiatrice ira activer immédiatement une caspase effectrice. Par contre dans les cellules de type II, la caspase initiatrice clivera la protéine à domaine BH3 Bid (Bid : BH3- Interacting Domain Death agonist) ce qui mènera au relargage de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie, à l'activation d'autres caspases et à l'induction de l'apoptose (Opferman and Korsmeyer, 2003).

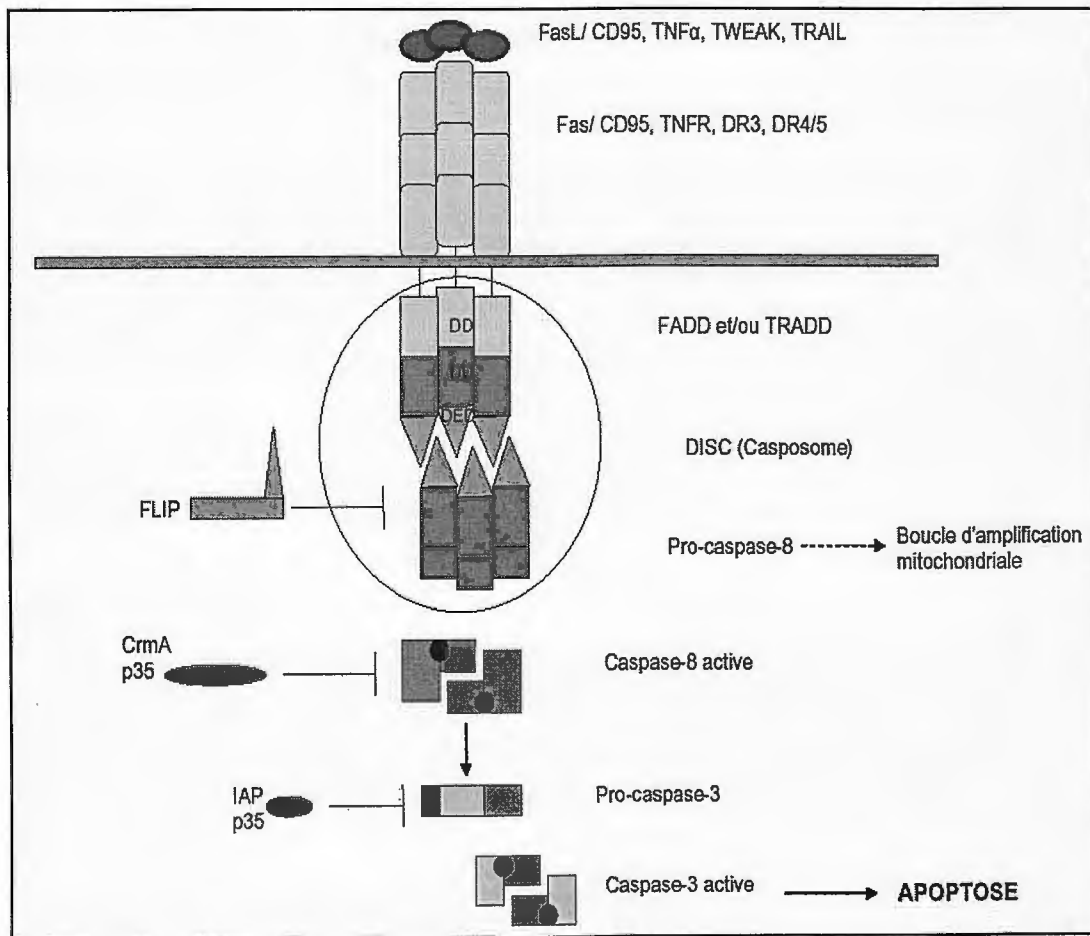


fig.6: Voie apoptotique des récepteurs de mort (Borner, 2003).



### II-3-1-1- Les récepteurs de mort

#### a- Généralités

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'apoptose. Toutes fois il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée : les récepteurs de mort. Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation des caspases. Cette voie d'activation est impliquée dans l'élimination des cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme et notamment les lymphocytes autoréactifs.

Les récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TNF-R) (Tumor Necrosis Factor- Receptor) (Nagata, 1997). Les TNF-R peuvent promouvoir selon le contexte cellulaire, soit la survie, soit la mort soit les deux. 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 cystéine, impliqués dans la liaison du ligand. Les récepteurs de mort possèdent dans leur partie intracellulaire une région conservée d'environ 80 acides aminés appelée domaine de mort cellulaire (DD) (Death Domain) (Tartaglia et al., 1993 ; Chaudhary et al., 1997 ; Nagata, 1997). L'apoptose médiée par Fas (Fibroblast-associated) et TNF-RI n'est pas modifiée par la présence d'inhibiteurs de la synthèse d'ARN ou de protéines (Itoh et al., 1991 ; Yonehara et al., 1989). De plus, des cellules énuclées peuvent enclencher un programme de mort cellulaire après stimulation du récepteur Fas. Ces résultats suggèrent que les différents protagonistes, nécessaires à l'induction de l'apoptose, sont constitutivement présents et que l'activation du récepteur par son ligand ne fait qu'induire l'association des protéines préexistantes nécessaires à la transmission du signal apoptotique (Schulze-Osthoff et al., 1994).

#### b- Des récepteurs à l'apoptose

La voie des récepteurs de mort est initiée par des ligands de mort extracellulaires de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) qui comprend une quinzaine de membres (TNF $\alpha$ , FasL (Fibroblast-associated ligand), CD30L (CD : Classe de Diversification), TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), Lymphotoxine.....) (Nagata and Golstein, 1995). Ces ligands sont, en grande majorité, des protéines transmembranaires de type II, qui présentent donc leur extrémité C-terminale du côté extracellulaire. (Kasibhatla et al., 1998).

La fixation du ligand sur les récepteurs entraîne leur trimérisation. Grâce au domaine de mort (DD), les récepteurs trimérisés recrutent, dans le cytoplasme, une protéine adaptatrice telle que TRADD (TNF-R Associated protein with DD) ou FADD (Fas Associated Death Domain). Ces protéines adaptatrices se lient à la caspase-8 (caspase initiateur) pour former le DISC (Death Inducing Signaling Complex) ou casposome, via un domaine DED (Death Effector Domain). Le DED est nécessaire et suffisant pour induire l'apoptose (Chinnaiyan et al., 1996). La proximité de TRADD ou FADD stimule l'autoprotéolyse/activation de la pro-caspase 8. La caspase 8 activée est libérée du DISC et active alors les caspases effectrices 3, 6 et 7 pour amplifier le signal de mort. Cette voie peut être bloquée par : des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) (Inhibitor Apoptosis Protein), par des inhibiteurs de caspases et par des FLIP (FLICE-inhibitory proteins) ; protéines homologues de la caspase 8 qui contiennent un domaine DED pour se lier à FADD sans pouvoir servir d'intermédiaire entre le signal apoptotique et les

caspases effectrices. Ces FLIP ne sont pas des caspases initiatrices.

### II-3-1-2- Les acteurs cytoplasmiques de l'apoptose

#### A- Apaf-1

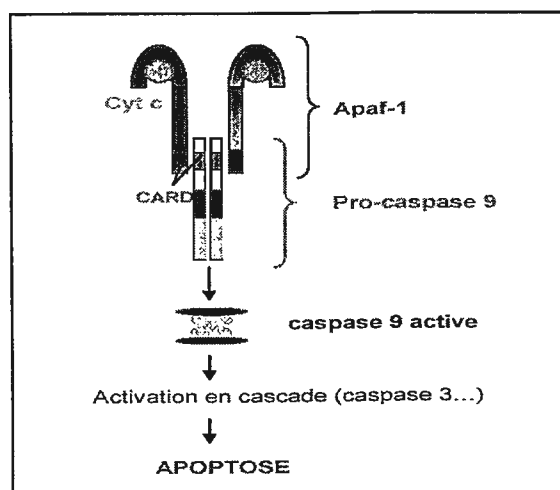
Apaf-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1) est un homologue mammifère du gène *ced-4*, il est régulateur de l'apoptose au niveau des phases post-mitochondriales. Des embryons déficients en Apaf-1 meurent avant la naissance. Ils présentent une réduction importante de l'apoptose au niveau du cerveau et des altérations dramatiques des yeux et du visage (Cecconi, 1999). L'Apaf-1 s'est révélé indispensable à l'activation de la caspase 9 et son action requiert absolument la présence du cytochrome c et de dATP (Li et al., 1997). En fait, le dATP va permettre un changement de conformation d'Apaf-1 de telle sorte qu'il puisse lier le cytochrome c libéré de la mitochondrie.

Ce pré-complexe peut alors recruter la procaspase 9 et ainsi conduire à son activation. Le complexe multimoléculaire ainsi formé est appelé apoptosome (Zou et al., 1999) (fig.7). Des études récentes ont montré que le clivage et donc l'activation de la procaspase 3 était également dépendant de son recrutement à l'apoptosome (Zou et al., 1999) (Cain et al., 1999) et que ce n'était donc pas un évènement cytoplasmique dû à la libération d'une caspase 9 active (Zou et al., 1999). La molécule Apaf-1 est composée de trois domaines distincts (Li et al., 1997 ; Zou et al., 1997) :

- Les 85 acides aminés N-terminaux possèdent des homologies avec *ced-3* et les caspases. Cette partie de la protéine est appelée domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) (Hofmann et al., 1997). Elle permet l'interaction d'Apaf-1 avec les caspases (Li et al., 1997). Ces CARDS sont aussi présents dans certaines molécules adaptatrices contenant un domaine de mort cellulaire (DD) telle que RAIDD (RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with DD) (Duan and Dixit, 1997).

- Un domaine de 320 acides aminés présentant des homologies avec *ced-4*. Ce domaine comporterait également une séquence de liaison des nucléotides.

- Un domaine C-terminal contenant 12 répétitions tryptophane/acide aspartique (Neer et al. 1994). Ce domaine C-terminal semble être essentiel pour la régulation négative d'Apaf-1 (Srinivasula et al., 1998).



**Fig.7:** Représentation schématique de la formation de l'apoptosome (Slee et al., 1999).

## B- Les caspases

Certaines protéases ne sont pas simplement des enzymes de dégradation mais des molécules de signalisation hautement régulées contrôlant des processus biologiques critiques pour la cellule par le biais de protéolyses limitées et spécifiques. Une famille de protéases, les caspases, illustre parfaitement ce concept. En effet, de nombreuses études, menées plus particulièrement au cours de la dernière décennie, ont mis en évidence que ces protéases jouaient un rôle clef dans la signalisation de l'apoptose. Les caspases, présentes sous la forme de zymogènes inactifs et activées en réponse à des signaux apoptotiques induisent le démantèlement et la déstructuration de la cellule en clivant de façon spécifique des protéines cellulaires clefs (Alnemri et al., 1996).

### B-1- Nomenclature et différentes classifications des caspases

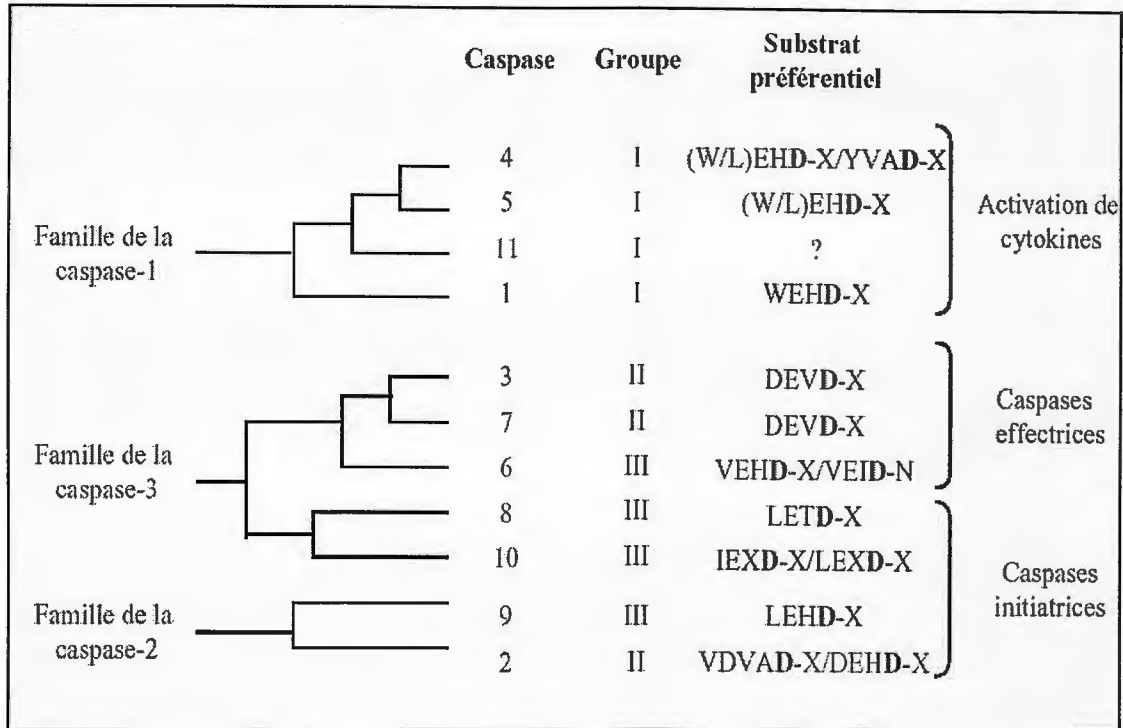
Les caspases ont été impliquées dans l'apoptose avec la découverte du gène *ced-3* et l'identification d'un analogue de son produit (CED-3) chez les mammifères, la protéase à cystéine ICE (Yuan et al., 1993). Ces travaux précurseurs ont conduit à l'identification d'un nombre croissant de protéases à cystéine, présentant des homologies de séquences avec CED-3. Ces protéases présentent une spécificité stricte de clivage de leur substrat après un résidu acide aspartique. Une nouvelle nomenclature proposée par (Alnemri et al., 1996) les regroupe désormais sous le nom de caspases. On connaît aujourd'hui 14caspases différentes dont 11 chez les mammifères (Ferri, 2000). Différentes classifications de ces protéases ont été proposées en fonction du critère de comparaison (fig.8) :

1) L'analyse phylogénétique des caspases a permis de définir trois sous familles : la famille de la caspase-1 (les caspases-1, 4, 5, 11), la famille de la caspase-2 (les caspases-2, 9) et la famille de la caspase-3 (les caspases-3, 6, 7, 8, 10) (Alnemri et al., 1996).

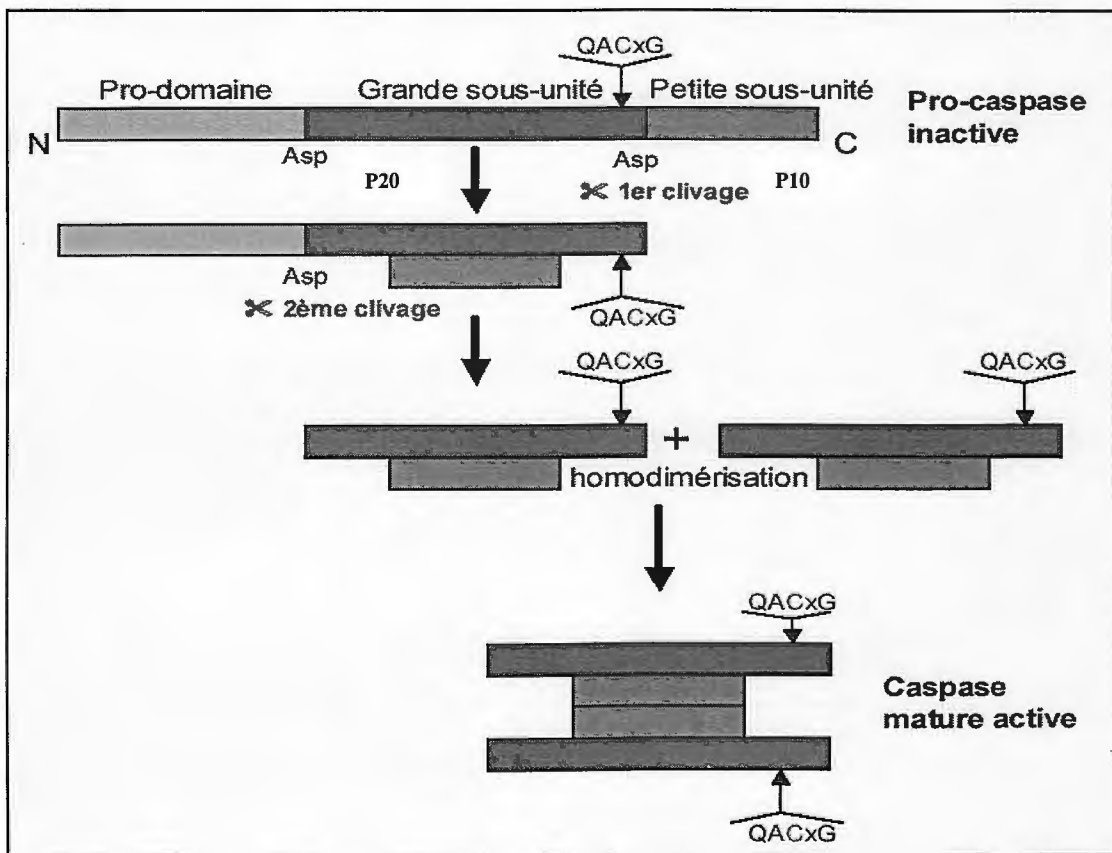
2) La deuxième classification proposée tient compte de la fonction des différentes caspases. Deux grands groupes ont été ainsi définis : les caspases impliquées dans l'inflammation, responsables de l'activation de cytokines et les caspases apoptogènes activées au cours de la transduction d'un signal de mort. Se distinguant par leur temps d'implication dans la voie de signalisation de l'apoptose, ces dernières ont été classées en deux sous-groupes : les caspases initiatrices, activées au cours de la phase d'initiation de l'apoptose (caspases-2, 8, 9, 10) et les caspases effectrices, activées en cascade par des caspases initiatrices et impliquées dans la phase de dégradation de l'apoptose (caspase-3, 6, 7) (Alnemri et al., 1996).

### B-2- Les mécanismes d'activation des caspases

La conversion de la caspase de l'état de zymogène en une enzyme mature nécessite au moins deux clivages protéolytiques limités au niveau des résidus acides aspartiques (Asp-x), flanquant chacun la grande sous-unité, libérant tout d'abord la petite sous unité puis la grande. Les éléments protéiques de l'enzyme ainsi libérés vont pouvoir s'assembler de sorte à former un hétérodimère actif de structure générale (p10/p20)<sub>2</sub>, dont le domaine catalytique contient la séquence consensus QACXG (Gln-Ala-Cys-X-Gly) (Walker et al., 1994) (fig.9).



**Fig.8:** Les différentes classifications des caspases (Alnemri et al., 1996 ; Thornberry et al., 1997).



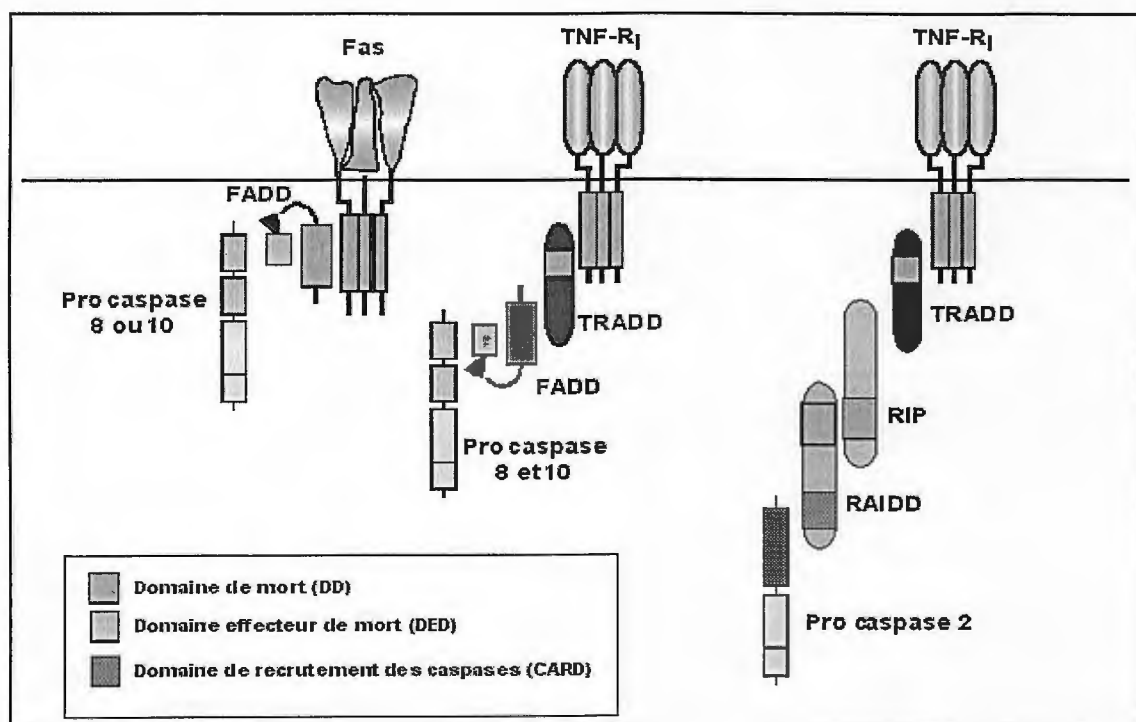
**Fig.9:** Mécanisme général d'activation des caspases (Adapté de Couzinet et al., 2002).

### B-2-1- L'autoactivation des caspases initiatrices

L'autoactivation des caspases initiatrices implique l'oligomérisation des zymogènes, sous le contrôle de protéines adaptatrices. Ces molécules adaptatrices couplent les procaspases aux senseurs apoptotiques, tels que les récepteurs de mort ou la mitochondrie. Il en résulte une concentration locale élevée en pro-enzymes permettant la protéolyse inter- et intra-moléculaire (Kischkel et al., 1995).

#### ❖ L'activation des procaspases-2, 8, 10

L'activation des caspases-2, 8 et 10 résulte de la stimulation de récepteurs membranaire de mort. En réponse à un ligand, le récepteur se trimérise et recrute des protéines adaptatrices par son domaine de mort DD. La procaspase-8 (Kischkel et al., 1995) ou la procaspase-10 (Kischkel et al., 2001) oligomérisent par l'intervention de la protéine adaptatrice FADD au niveau de leur domaine DED. FADD, par son domaine DD, peut être directement couplé au récepteur Fas (Chinnaiyan et al., 1995) ou indirectement au TNF-RI par l'intermédiaire de TRADD (Hsu et al., 1995) (fig.10). Le complexe, ainsi constitué du récepteur, de FADD et du procaspase, est nommé DISC. Le recrutement de la caspase-2 au récepteur se fait par l'interaction séquentielle de TRADD sur le domaine CARD de la caspase (Hsu et al., 1995) avec d'autres protéines, sur les domaines DD, la sérine/thréonine kinase RIP (Receptor Interacting Protein) (Stanger et al., 1995) et la protéine RAIDD (Duan and Dixit, 1997) (fig.10).



**Fig.10:** L'autoactivation des caspases initiatrices 2, 8 et 10 (Rathmell et al., 1999).

### ❖ L'activation de la procaspase-9

Le mécanisme de maturation de la caspase-9 est comparable à celui des caspases initiatrices 2, 8 et 10. Son activation dépend de la formation d'un complexe multiprotéique, l'apoptosome (Li et al., 1997) constitué du cytochrome c libéré de la mitochondrie, d'Apaf-1, d'ATP et de la procaspase-9 (Zou et al., 1999). Dans ce complexe, Apaf-1 joue le rôle de protéine adaptatrice. Il possède en effet une région de liaison CARD, impliquée directement dans le recrutement de la procaspase-9 (Li et al., 1997). Lorsque les cellules sont quiescentes, Apaf-1, est séquestré à la surface de la mitochondrie (Zou et al., 1997) dans une conformation tridimensionnelle inactive. Dans un contexte apoptotique, le cytochrome c et l'ATP lient l'Apaf-1, induisant un changement conformationnel permettant de démasquer alors la région CARD : la procaspase-9 est ainsi recrutée.

### B-2-2- La transactivation des caspases effectrices

Les caspases-3, 6 et 7, regroupées sous le nom de caspases effectrices ne peuvent pas être activées par un mécanisme d'autoactivation. En effet, ces protéases disposent d'un prodomaine court incapable d'initier leur oligomérisation et leur activation. Ainsi leur clivage protéolytique est pris en charge par d'autres caspases, généralement des caspases initiatrices.

Des études, menées sur des extraits cellulaires (Srinivasula et al., 1996 ; Muzio et al., 1997) ou sur des cellules de levures transfectées (Kang et al., 1999), ont en effet démontré que les caspases initiatrices sont capables d'activer efficacement les caspases effectrices. Dans ces systèmes, l'activation protéolytique des procaspases 3 et 7 par l'action directe des caspases-8 et 10 a été mise en évidence (Nagata, 1997 ; Stennicke et al., 1999). De même, la caspase-9 est capable d'induire l'activation des procaspases-3 et 7 (Li et al., 1997 ; Srinivasula et al., 1998).

Ainsi, les caspases-8, 9, 10 sont décrites comme les protéases gouvernant l'activation séquentielle des caspases effectrices dans l'apoptose médiée par les récepteurs ou par la mitochondrie. Ce type d'activation en cascade permettrait la régulation et l'amplification du signal apoptotique (Slee et al., 1999).

### B-3- Les substrats protéolysés par les caspases

Le rôle fondamental des caspases est d'éteindre les systèmes de protection cellulaire en inactivant des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire ou la résistance à l'apoptose et d'activer des protéines qui participent à la destruction cellulaire. L'action des caspases sur leurs différents substrats induit l'isolement des cellules apoptotiques des cellules environnantes, des perturbations du cytosquelette, des altérations de la réplication et de la réparation de l'ADN, la fragmentation nucléaire et enfin la désintégration générale de la cellule. C'est en ce sens que les caspases, notamment les caspases effectrices, sont considérées comme les acteurs moléculaires principaux de la phase de dégradation au cours du processus apoptotique (Tab.2).

Les protéines cibles, clivées après un résidu Asp, regroupent des protéines impliquées dans la dégradation et la réparation de l'ADN ou dans certaines cascade de signalisation,

des protéines cytoplasmiques, nucléaires, ou encore des protéines des membres de la famille du Bcl-2 (Lazebnik et al., 1994).

La dégradation de l'ADN est un phénomène associé à une baisse de la réparation de l'ADN. Par exemple, le clivage de la protéine PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) conduit à une perte de l'activité de cet enzyme à réparer l'ADN (Lazebnik et al., 1994). Les caspases clivent également les protéines de la lamina nucléaire, telle que la lamine A (Takahashi et al., 1996), contribuant à la condensation chromatidienne observée lors du phénomène apoptotique.

Des protéines du cytosquelette, telle que l'actine (Mashima et al., 1997) ou des protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette, comme Gas-2 (Growth arrest specific-2) (Brancolini et al., 1995), sont également clivées, menant à la déstructuration et au réarrangement du cytosquelette et au bourgeonnement de la membrane plasmique. Des protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 sont également clivées. Cette protéolyse permet d'abolir leurs propriétés protectrices et de produire également des fragments capables d'induire l'apoptose (Bcl-2 : Cheng et al., 1997) alors que le clivage de certains membres pro-apoptotiques potentialise leurs effets (Bid : Li et al., 1998).

**Tab .2:** Substrats des caspases (d'après Earnshaw et al., 1999).

<i>SUBSTRATS</i>	<i>EFFETS</i> (supposés du clivage)
Protéines associées au cytosquelette membranaire : -Actine, $\beta$ -caténine, Cohesine, Cytokératine, Desmine, FAK ( <i>Focal adhesion kinase</i> ), Fordine, Gas-2 ( <i>Growth arrest specific-2</i> ), ROCK-1 ( <i>Rho-associated coiled-coil protein kinase-1</i> ).	-Réarrangement du cytosquelette, bourgeonnement de la membrane plasmique, isolement cellulaire.
Protéines du cytosquelette de l'enveloppe nucléaire : - Lamine A et B.	-Déstabilisation du cytosquelette nucléaire, condensation de la chromatine.
Protéines interagissant avec l'ADN : -Inhibiteur de DFF40/CAD (DFF45/ICAD [ <i>caspase-activated desoxyribonuclease</i> ]). -PARP ( <i>poly-adenosyl-ribose polymerase</i> ), topoisomerase 1. -NuMA ( <i>nuclear protein that associates with the mitotic apparatus</i> ).	-Libération de DFF40/CAD, fragmentation de l'ADN. -Inactivation, L'ADN n'est plus réparé. -Modification de la chromatine, altération de l'enveloppe nucléaire.
Facteurs de transcription : -SRF ( <i>serum response facteur</i> ), STAT-1, NF- $\kappa$ B.	-Inhibition de la transcription de gènes anti-apoptotique et/ou mitogéniques.
Protéines régulatrices de l'apoptose : -Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Bid.	-Génération de fragments pro-apoptotiques.
Protéines de l'inflammation : -Pro-Il-1 $\beta$ . -Pro-Il-16. -Pro-Il-18.	-Libération d'Il-1 $\beta$ . -Augmente le chimiotactisme des lymphocytes T. -Stimule la synthèse d'IFN- $\gamma$ .



#### B-4- 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 (Wang et al., 1998).

##### ➤ Caspases 1 et 11

Les souris caspases 1<sup>-</sup> et caspase 11<sup>-</sup> présentent un développement normal (Kuida et al., 1995 ; Li et al., 1995 ; Wang et al., 1998). Cependant, elles présentent une production défectueuse d'IL-1a et b (IL:Interleukine), d'IL-18 et d'interféron-g. De plus, elles représentent une résistance accrue au choc septique. En fait, il semble bien établi que la caspase 1 (fig. 11) 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 (caspase murine) (Wang et al., 1998). La caspase 11 présente des homologies avec les caspases humaines 4 et 5.

##### ➤ Caspase 2

Les souris caspase 2<sup>-</sup> présentent un développement normal jusqu'à l'âge adulte et ne présentent aucun phénotype sévère (Bergeron et al. 1998). En revanche, la caspase 2 semble être requise pour la mort des cellules germinales femelles. A la naissance, les souris déficientes présentent une diminution du nombre de motoneurons 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. 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 est 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

Les souris invalidées pour la caspase 3 (fig. 11) furent les premières à présenter des profonds bouleversements de l'apoptose (Kuida et al., 1996 ; Woo et al., 1998). Elles sont plus petites que les souris contrôles et meurent entre la première et la troisième semaine après la naissance. En revanche, la caspase 3 semble être requise pour l'apoptose des neutrophiles et des lymphocytes T activés (Woo et al., 1998). De plus, des études ont décrit que la caspase 3 était absolument nécessaire à la dégradation internucléosomale de l'ADN ainsi qu'à la condensation de la chromatine (Woo et al., 1998). La caspase 3 pourrait jouer un rôle différent selon le type de cellules et de stimuli considérés.

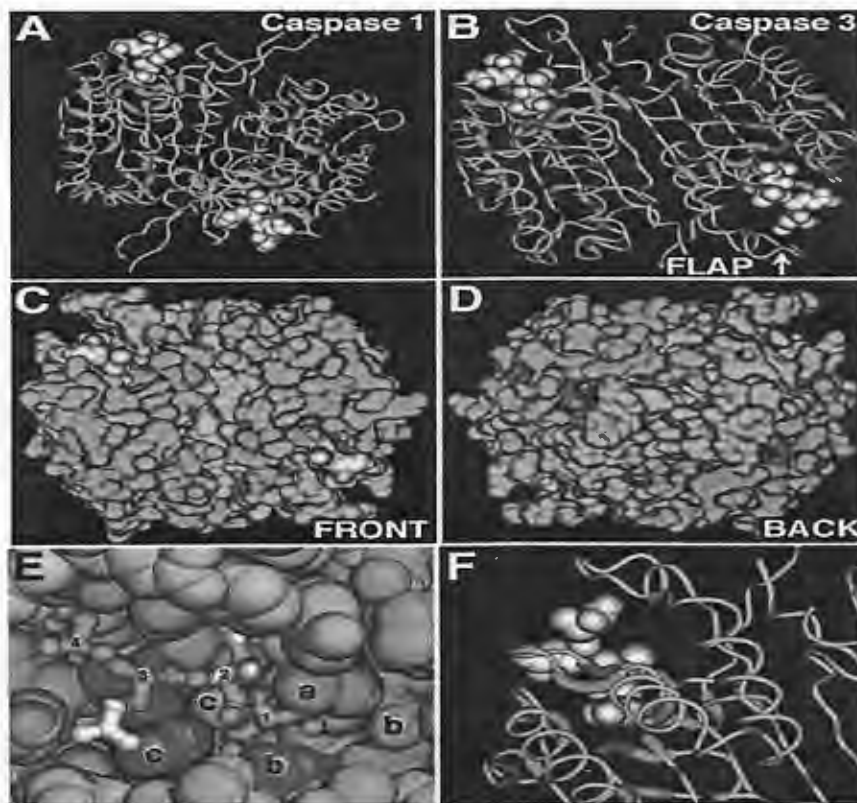
### ➤ Caspase 8

Les souris caspase 8<sup>-</sup> se développent normalement durant les 11 premiers jours suivant la fécondation puis meurent, probablement des suites de malformations cardiaques importantes. Le cœur de ces animaux est hypotrophique, suggérant que la caspase 8 pourrait être impliquée dans la transmission des signaux de survie plutôt que des signaux de mort, au moins au niveau de cet organe. De plus, ces embryons produisent très peu de précurseurs myéloïdes (Varfolomeev et al., 1998).

En définitive, la caspase 8 est un élément essentiel et non redondant de l'apoptose initiée par les récepteurs de mort, mais aussi elle joue un rôle essentiel (et à ce jour grandement incompris) dans le développement cardiaque et dans l'hématopoïèse (Varfolomeev et al., 1998).

### ➤ Caspase 9

Le phénotype de ces souris est semblable mais cependant plus sévère que celui des souris caspase 3<sup>-</sup>. Elles meurent au 16<sup>ème</sup> jour de développement. Elles souffrent de malformation cérébrale avec un excès cellulaire au niveau du système nerveux central. En définitive, le fait que les souris invalidées pour la caspase 3, la caspase 9 ou Apaf-1 présentent toutes un phénotype très semblable, indique que ces molécules interviennent probablement dans une voie commune au cours de l'apoptose (Kuida et al., 1998 ; Hakem et al., 1998).



**Fig. 11:** Structure tridimensionnelle des caspases 1 et 3 (Earnshaw et al., 1999).

### II- 3-2- La voie intrinsèque

Alors que la voie extrinsèque de l'apoptose est déclenchée par des facteurs extérieurs à la cellule, la voie intrinsèque a pour éléments déclencheurs des insultes intracellulaires, comme l'augmentation du niveau des ROS (Reactive Oxygen Species), des dommages à l'ADN, stress du réticulum endoplasmique, l'activation d'oncogènes etc... (Opferman and 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 survie 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 largage de plusieurs protéines dans le cytosol, dont le cytochrome c, Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/ direct IAP binding protein with low pI), Omi/HtrA2 (High temperature requirement protein A2) et AIF (Apoptosis Inducing Factor). Bien que chacune ait son rôle à jouer dans l'apoptose, seulement le cytochrome c, Omi/HtrA2 et les protéines Smac/DIABLO ont un effet sur l'activation des caspases (Saelens et al., 2004) (fig. 12).

#### II-3-2-1- Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose

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

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

Le regroupement de différents travaux permet d'établir une configuration minimale au PTP qui regrouperait : la translocase des nucléotides adényliques (ANT (Adenine nucleotide translocase) : membrane interne), le canal anionique voltage-dépendant (VDAC (Voltage-Dependent Anion Chanel) : membrane externe) et la cyclophiline D (Cyp-D : matrice). Ces protéines coopèrent pour former un pore responsable de la transition de perméabilité membranaire mitochondriale (Zoratti and Szabo, 1994 ; Marzo et al., 1998 ; Halestrap, 1999).

#### II-3-2-2- Mécanisme de relargage

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

Le premier modèle « *PTP-induced mitochondrial swelling model* » se caractérise par l'ouverture du VDAC et un gonflement de la matrice mitochondriale. Ce concept implique que l'agent apoptotique interagisse directement avec le PTP, provoquant son

ouverture, puis une dépolarisation rapide de la mitochondrie et un gonflement de la matrice, une rupture de la membrane externe mitochondriale et par conséquent le relargage des facteurs apoptogènes comme le cytochrome c, l'AIF.

Le deuxième modèle « *PTP-non swelling model* » ne mettrait pas en jeu le gonflement de la matrice. Des travaux ont montré à partir de mitochondries isolées que le relargage du cytochrome c peut être induit par de faibles concentrations de Bax recombinant ou de Bid tronqué, sans observer de gonflement de la matrice mitochondriale ou de rupture de la membrane externe mitochondriale (Jurgensmeier et al., 1998 ; Pastorino et al., 1999). Récemment, il a été montré que l'ouverture du pore (sans gonflement de la matrice mitochondriale) induit l'effondrement de  $\Delta\Psi_m$  par un processus de dissipation des protons. Ceci provoque un changement conformationnel de Bax et sa translocation à la mitochondrie, induisant le relargage du cytochrome c (De Giorgi et al., 2002).

Le troisième modèle « *formation of conducting channels model* » mettrait en jeu des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ces protéines sont capables de s'insérer dans la membrane externe mitochondriale où une fois oligomérisées, elles forment des pores de façon autonome (Shimizu et al., 2000 ; Antonsson et al., 2000 ; Korsmeyer et al., 2000). Enfin, il est important de noter que Bossy-Wetzel et al, ont décrit un système où la libération du cytochrome c et l'activation des caspases pouvaient avoir lieu sans aucune dissipation de  $\Delta\Psi_m$  et dans lequel l'ouverture du PTP est consécutive à la formation de l'apoptosome (Bossy-Wetzel et al., 1998).

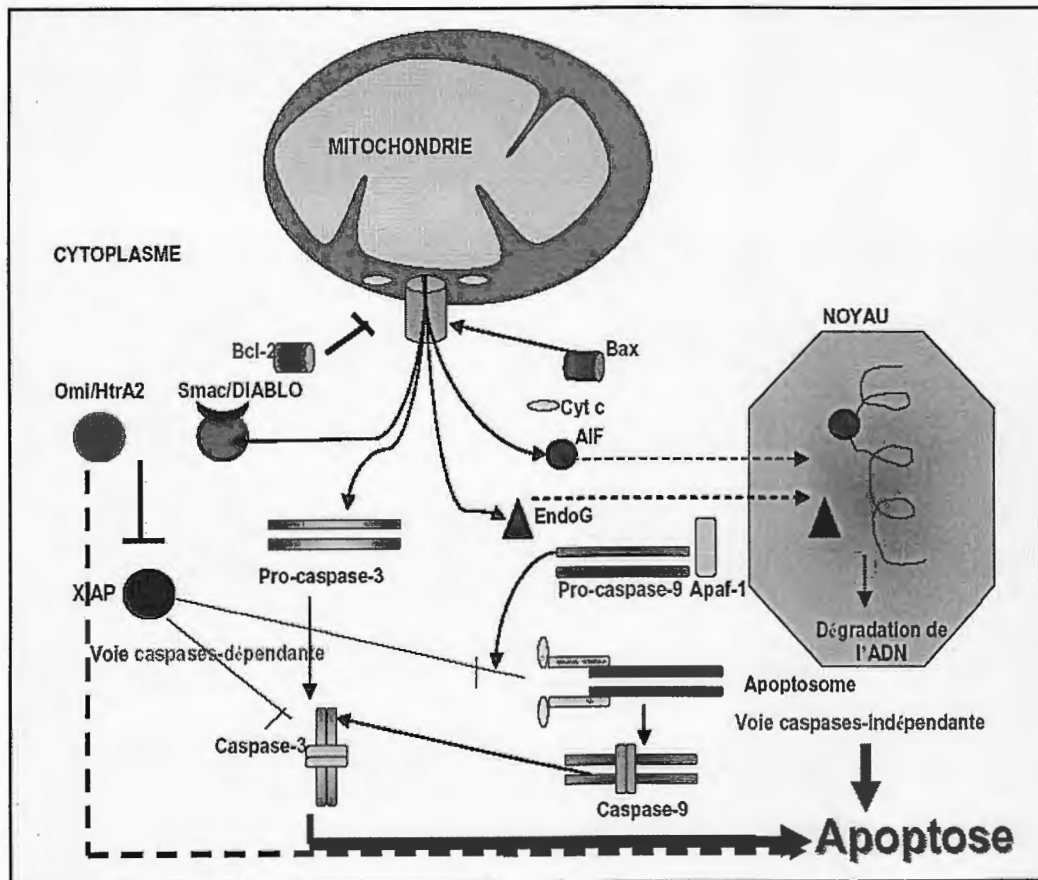


fig. 12: Représentation des voies apoptotiques mitochondriales (Bellet, 2003).

### II-3-2-3- Les protéines mitochondriales de l'apoptose

Les protéines mitochondriales libérées lors du processus apoptotique sont regroupées sous le nom générique de SIMP (soluble inter membrane mitochondrial proteins) et possèdent toutes une activité pro-apoptotique. Elles sont associées soit à une voie mitochondriale caspase-dépendante, soit à une voie mitochondriale caspase-indépendante (Rosenquist, 2003).

#### A- Les protéines de la voie caspase-dépendante

##### A-1- Le cytochrome c

Le cytochrome c a été identifié pour la première fois en 1930 par Keilin et coll (Keilin., 1930). Il est synthétisé dans le cytosol sous la forme d'apo-cytochrome c est transloqué dans la membrane externe de la mitochondrie. Il est ensuite transformé en holo-cytochrome c suite à son attachement à un noyau hème.

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 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. L'association entre le cytochrome c et l'Apaf-1 facilite le recrutement d'ATP. La protéine Apaf-1 contient un domaine CARD dans la région N-terminal par lequel elle recrute la procaspase-9, ce qui mène à l'activation de la procaspase-9, selon le modèle de la liaison à une sous unité régulatrice. Ce complexe de 1MDa, appelé apoptosome, contient sept molécules d'Apaf-1, de cytochrome c et caspase 9 (Acekan et al., 2002).

##### A-2- La protéine Smac/DIABLO

La protéine murine Smac (Second Mitochondrial Activator of Caspases) et son homologue humain DIABLO (direct IAP binding protein with low pI) sont des protéines mitochondriales synthétisées sous la forme de précurseurs de 29 Kda (Kilo dalton); après protéolyse, elles deviennent des protéines matures de 23 Kda, pouvant être libérées en réponse à un stimulus apoptotique. Cette protéine, une fois synthétisée, est importée dans la mitochondrie.

Au cours de l'apoptose, Smac/DIABLO est libérée et se lie aux IAPs empêchant leur action protectrice et permettant ainsi aux caspases contenue dans l'apoptosome de s'activer. Il est à noter que Smac/DIABLO est particulièrement abondante dans le cœur, le foie et les testicules et peu présente dans les autres tissus, impliquant l'existence probable d'autres protéines homologues (Verhagen et al., 2000).

## **B- Les protéines de la voie caspase-indépendante**

L'implication des caspases dans le processus apoptotique est bien établie. Certaines études, menées au sein du groupe de G.Kroemer, ont montré cependant que l'apoptose peut être induite sans la participation de caspases. Ce type d'apoptose semble être contrôlé par des facteurs protéiques libérés de la mitochondrie : AIF (Susin et al., 1996 ; Susin et al., 1999 ; Daugas et al., 2000) et Omi/HtrA2 (Faccio et al., 2000).

### **B-1- La protéine AIF**

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

### **B-2- La protéine Omi/HtrA2**

La protéase Omi aussi appelée HtrA2 (High temperature requirement protein A2) a été identifiée comme une sérine protéase de 49 Kda, homologue à l'endoprotéase bactérienne HtrA2 (Faccio et al., 2000). Omi/HtrA2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 49 kDa portant en position N-terminale un domaine signal de localisation mitochondriale. Une fois introduite dans l'espace intermembranaire mitochondrial, elle est clivée et devient une protéine mature de 37 kDa (Savopoulos et al., 2000). Après un stimulus apoptotique, Omi/HtrA2 est libérée dans le cytosol et peut induire une mort soit dépendante soit indépendante des caspases (van Loo et al., 2002 ; Verhagen et al., 2002). En effet, Omi/HtrA2 présente une dualité fonctionnelle. Elle peut soit se lier et inhiber les IAPs déclenchant alors la cascade de caspases, soit elle dégrade, grâce à son activité de sérine protéase, des protéines intracellulaires nécessaires à la survie de la cellule.

### **II-3-2-4- Les protéines de la famille Bcl-2 contrôlant la phase mitochondriale de l'apoptose**

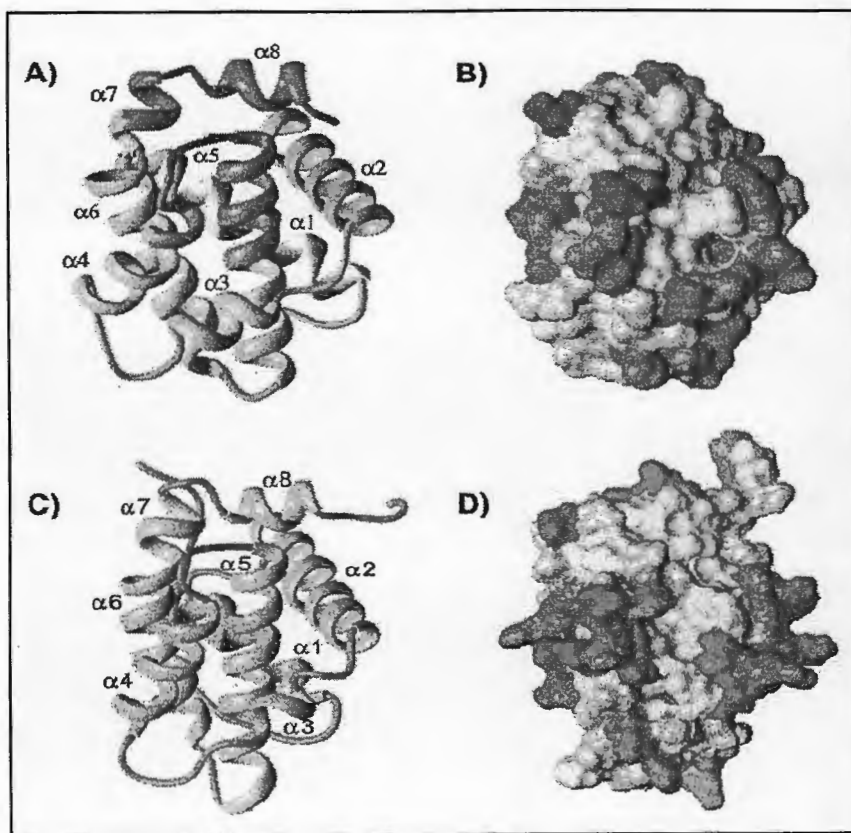
Les protéines de la famille de Bcl-2 sont les principales actrices de la régulation du processus apoptotique. Bcl-2 a été le premier homologue de CED - 9 décrite chez les mammifères (Vaux et al., 1988). Si on se réfère à leur fonction biologique, les protéines de la famille de Bcl-2 peuvent être classées en deux sous familles : des protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2 (Hockenbery et al., 1990), Bcl-xL (Boise et al., 1993), Bcl-W (Gibson et al., 1996) et des protéines pro-



apoptotiques, telles que Bax (Oltvai et al., 1993), Bad (Bcl-2 Antagonist of cell death protein) (Yang et al., 1995), Bid (Wang et al., 1996).

Tous les membres de la famille de Bcl-2, à l'exception de Bad et Bid, sont des protéines membranaires, présentes principalement dans la membrane externe mitochondriale mais également dans le réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire externe (Nguyen et al., 1993 ; Akao et al., 1994). A l'inverse, Bad et Bid sont des protéines cytosoliques dont la translocation vers la mitochondrie et l'insertion dans la membrane mitochondriale s'effectue au cours du processus apoptotique (Del Peso et al., 1997 ; Li et al., 1998 ; Wang et al., 1999).

Des études structurales des protéines de la famille de Bcl-2 par diffraction de rayon X (Muchmore et al., 1996) ont permis de mettre en évidence leur mécanisme d'action et d'interaction réciproque. Leur structure tridimensionnelle se compose de 2 hélices  $\alpha$  hydrophobes centrales, entourées de 6 à 7 hélices  $\alpha$  amphipatiques de taille variable, le long desquelles sont répartis les domaines BH (Bcl-2 homology). Une longue boucle flexible et hydrophile est présente entre les deux premières hélices, elle interviendrait dans la régulation des phénomènes de modifications post-traductionnelles des protéines de la famille de Bcl-2 comme la phosphorylation. Enfin, la proximité spatiale des domaines BH1, BH2 et BH3 et leur organisation à la surface de la protéine en une poche hydrophobe, permet de recevoir des peptides mimant le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques comme Bax ou Bad (Petros et al., 2004) (fig. 13).



**Fig. 13:** Structures de Bcl-xL (A) et de Bcl-2 (B).  
(Adapté de Petros et al., 2004).



### A- Le rôle des protéines de la famille de Bcl-2

Le mécanisme prédominant par lequel les membres de la famille Bcl-2 régulent l'apoptose semble être le contrôle de la formation de l'apoptosome en modulant la fuite mitochondriale du cytochrome c. En effet, alors que Bcl-2 (Kluck et al., 1997) ou Bcl-xL (Vander Heiden et al., 1997) inhibent l'apoptose en bloquant directement la sortie du cytochrome c, la surexpression ou l'activation de Bax dans des cellules (Pastorino et al., 1998) conduit à la libération du cytochrome c. Deux mécanismes de régulation de la libération du cytochrome c par les protéines de la famille de Bcl-2 ont été proposés, ces protéines contrôlèrent l'ouverture des mégapores mitochondriaux en se liant avec une protéine constitutive de ce complexe : l'ANT (Marzo et al., 1998) induisant ainsi la transition de la perméabilité mitochondriale, l'effondrement de  $\Delta\Psi_m$  et menant à la membrane externe mitochondriale. Mais la formation de grands canaux à cytochrome c est également proposée. L'équipe de Martinou a démontré récemment la capacité de Bax à polymériser (Antonsson et al., 2000) et à s'insérer dans la membrane mitochondriale pour former des grands canaux permettant le passage du cytochrome c (Antonsson et al., 2001), sans gonflement osmotique ni rupture physique de la membrane (Martinou et al., 1999).

### B- Classification des protéines de la famille Bcl-2

Les homologues mammifères du gène *ced-9* correspondent à une famille de gènes codant pour les protéines de la famille Bcl-2. L'alignement des séquences protéiques de la famille Bcl-2 a permis d'identifier quatre régions hautement conservées chez les mammifères appelées domaines BH : BH1 à BH4. On peut ainsi classer les membres de la famille Bcl-2 en trois groupes (Adams et al., 1998 ; Tsujimoto and Shimizu, 2000) (Fig.14).

- Le premier groupe « Bcl-2 like survival factors » rassemble les membres anti-apoptotiques. Ils contiennent les domaines BH1, 2, 3 et 4. On peut citer Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W.

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

- Le troisième groupe « BH3-only death factors » fait partie des membres pro-apoptotiques. Les protéines de ce groupe possèdent uniquement le domaine BH3. On peut citer Bad, Bid, Bik (Bcl-2 Interacting Killer), Bim (Bcl-2 Interacting mediator of cell death), Bmf (Bcl2 Modifying Factor), Noxa et Puma (p53-Upregulated Modulator of Apoptosis)

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

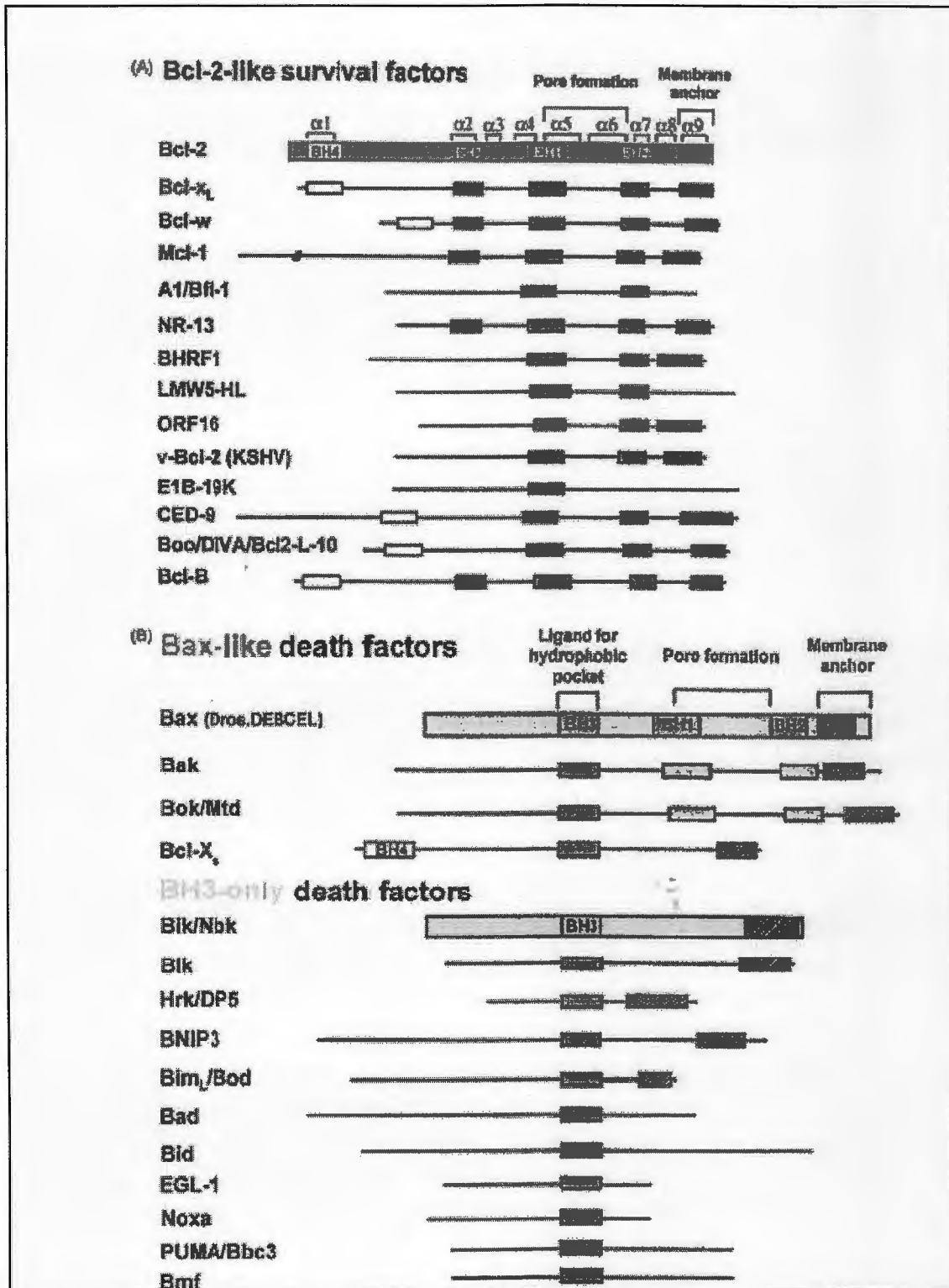


Fig. 14: Les membres de la famille Bcl-2 (d'après Borner, 2003).

## B-1- Les anti-apoptotiques

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, et Mcl-1 (Myeloid Cell Lymphoma 1), Bcl-2, 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 anti-apoptotiques, 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 condition 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), ce qui la rend inactive.
- Bcl-xL, quand à elle, démontre une spécificité pour la membrane externe de la mitochondrie (Kaufmann et al., 2003). Tous 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 phosphorylée par JNK et que cela menait à son inactivation ( Kharbanda et al., 2000).

## B-2- Les pro-apoptotiques

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

### B-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 lesquelles Bcl-xS, Bcl-GL, Bflk et Bok induisent l'apoptose. C'est cependant différent pour Bax et Bak.

### ➤ **Bax et Bak**

Bax et Bak 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 ou 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 ou 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 seraient également capables d'induire l'activation de Bax (Cartron et al., 2004).

### **B-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 and Strasser, 2000 ; Zong et al., 2001). Chacune des protéines BH3 réside dans un compartiment cellulaire distinct et répond à un stimulus apoptotique précis (Opferman and Korsmeyer, 2003). Suite à ce stimulus, elles se dirigent vers la mitochondrie ou 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 anti-apoptotiques.

### ➤ **Bid**

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- $\alpha$  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 le granzyme B pour générer un fragment plus court, tBid (Truncated Bid = Bid tronquée) (Li et al., 1998 ; Barry et al., 2000).

Le rôle de Bid a été étudié surtout dans le contexte des récepteurs de mort cellulaire, ou 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).

### ➤ **Bad**

Bad fut première protéine BH3 à être découverte en 1995 par le groupe de Stanley Korsmeyer (Yang et al., 1995). 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).

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).

### ➤ **Bim/BOD (BOD = Bcl-2 Ovarian Death synonym de Bim)**

Les protéines Bim 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 longue) 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). Bim est capable de se lier à toutes les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Chen et al., 2005). Jusqu'à maintenant, Bim a été impliquée dans l'apoptose des neurones suite à une réduction en NGF (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 (Putchu et al., 2001 ; Biswas et al., 2002 ; Bouillet et al., 2002).

### ➤ **PUMA/BBC3**

PUMA 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 and Vousden, 2001 ; 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-  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ , par contre seulement les deux

premières contiennent un domaine BH3 (Nakano and Vousden, 2001). Lors de sa découverte, PUMA semblait être exprimée seulement suite à un stress causant une accumulation de p53, par exemple des agents transcriptionnels.

Le rôle 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, ou elle démontre une très bonne affinité de liaison pour toutes les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Nakano and Vousden, 2001 ; Chen et al., 2005).

### ➤ 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).

## C- Invalidation génique

### C-1- Bcl-2

Les souris invalidées pour le gène de Bcl-2 sont viables. Cependant la majorité d'entre-elles meurent quelques semaines après la naissance. Les souris Bcl-2 développent une insuffisance rénale sévère due à un nombre diminué de néphrons (Veis et al., 1993 ; Nakayama et al., 1994). De plus, les souris deviennent grises à l'âge de 5 ou 6 semaines, période qui correspond au deuxième cycle des follicules pileux. Cette hypopigmentation reflète la diminution de la survie des mélanocytes (Veis et al., 1993 ; Nakayama et al., 1994 ; Kamada et al., 1995). Bien que les souris Bcl-2 présentent une différenciation normale des lignages T et B, elles sont incapables de maintenir l'homéostasie du système immunitaire. Le thymus et la rate subissent une apoptose massive quelques semaines après la naissance (Veis et al., 1993 ; Nakayama et al., 1994).

### C-2- Bcl-X

L'invalidation du gène Bcl-X est létale au jour 13 de développement embryonnaire (E13) (Motoyama et al., 1995). Les souris Bcl-X présentent une apoptose massive au

niveau du cerveau, de la moelle épinière et du thymus. L'effet létal de l'inactivation de ce gène est probablement dû à la mort cellulaire massive des cellules hématopoïétiques et des neurones (Motoyama et al., 1995). Contrairement à Bcl-2, la fonction de Bcl-X semble être capitale pour la survie des lymphocytes immatures.

### C-3- Bax

Les souris Bax sont viables, indiquant donc que Bax n'est pas essentiel pour le développement de l'organisme (Knudson et al., 1995). Les souris mâles invalidées pour Bax sont infertiles en raison d'une exacerbation des phénomènes apoptotiques au niveau des cellules germinales. Les ovaires des souris Bax présentent un excès cellulaire dans les follicules primaires, consécutif à un défaut d'apoptose. De plus, les neurones isolés à partir de ces souris peuvent proliférer en absence de facteur de croissance. En conclusion, bien que les neurones expriment la plupart des membres de la famille Bcl-2, il semble que la mort induit par la déprivation en facteur de croissance soit strictement dépendante de Bax (Deckwerth et al., 1996).

### C-4- Bcl-W

Les souris Bcl-W sont variables. Alors que les femelles possèdent des fonctions reproductrices normales, les mâles sont infertiles. Les testicules se développent normalement mais la maturation des spermatozoïdes ne peut se faire jusqu'à terme en raison d'un grand nombre de cellules apoptotiques au niveau du tube séminifère (Print et al., 1998).

## II-4- Les protéines inhibitrices de l'apoptose

Les virus ont développé diverses stratégies très efficaces afin d'inhiber la mort cellulaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées dans le but d'achever son cycle de réplication et ainsi d'infecter de nouvelles cellules. À ce jour, de nombreuses molécules virales, cellulaires animales et même végétales (Thatte et al., 2000), ont été décrites comme ayant une activité inhibitrice de l'apoptose.

### II-4-1- p35 et CrmA

P35 est une des protéines de baculovirus. Elle est capable d'inhiber une grande variété des caspases mais n'exerce pas d'effet inhibiteur sur le granzyme B. CrmA (Cytokine response modifier A) est issu d'un gène précoce du cowpox virus (virus de la vaccine). CrmA a un effet inhibiteur sur l'inflammation ainsi que sur le recrutement des macrophages au site de l'infection (Palumbo et al., 1989). Sa surexpression permet d'inhiber l'apoptose induite par la déprivation en facteur de croissance, CD95 ou le TNF (Gagliardini et al., 1994 ; Tewari and Dixit, 1995). CrmA inhibe l'activité protéolytique des caspases 1, 8 et dans une moindre mesure la caspase 6. D'autres caspases, comme la 3 ou 7, ne sont que peu affectées par cette molécule (Nicholson et al., 1995 ; Zhou et al., 1997). Ces deux protéines virales (p35 et CrmA) sont des inhibiteurs compétitifs. Une fois clivées par une caspase, elles vont se lier à ces enzymes et ainsi empêcher la dégradation de nouveaux substrats (Komiyama et al., 1994 ; Bump et al., 1995).



### II-4-2- FLIP, protéine E8, MC159 et MC160

La stimulation des récepteurs de mort va conduire au recrutement de molécules adaptatrices puis au clivage de zymogènes de caspases initiateuses et enfin, à l'activation des caspases effectrices. Cette étape de recrutement peut être régulée par une protéine appelée, selon les auteurs FLIP (FLICE inhibitory protein). Elle contient deux domaines effecteurs de mort cellulaire (DEDs) qui vont lui permettre de se lier aux prodomaines des caspases 8 ou 10 et ainsi empêcher leur recrutement aux récepteurs de mort (notamment Fas et TNF-RI) (Bump et al., 1995). FLIP a été décrit comme pouvant protéger de l'apoptose (Hu et al., 1997 ; Irmeler et al., 1997 ; Srinivasula et al., 1997 ; Rasper et al., 1998) ou induire l'apoptose (Han et al., 1997 ; Inohara et al., 1997 ; Shu et al., 1997) selon la nature du transcrit et le type cellulaire considéré. La protéine E8 (issue du virus équin de l'herpès de type II), ainsi que MC159 et MC160 (issues du virus *Molluscum contagiosum*) utilisent une stratégie similaire afin d'inhiber l'apoptose. En effet, ces protéines possèdent, tous comme FLIP, deux DEDs qui leur permettent d'inhiber le recrutement des procaspases 8 et 10 à leurs récepteurs (Duckett et al., 1996 ; Uren et al., 1996 ; Deveraux et al., 1997).

### II-4-3- Les IAPs

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

# *Chapitre III :*

## *Apoptose en physiologie et pathologie*

### III-1- Apoptose physiologique

La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme. Ainsi au cours des nombreuses mitoses et différenciations cellulaires qui permettant de créer un organisme à partir d'un œuf. Elle permet l'élimination des structures inutiles, des cellules âgées ou endommagées et dans la dégénérescence des cellules surnuméraires (Wood et al., 2000).

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 (Evan and Littlewood, 1998). Elle sculpte la forme interne et externe de l'embryon, puis la forme des bras, des jambes et elle élimine les tissus qui séparent les doigts, permettant leur individualisation (Meier et al., 2000) (Fig.15). De même au cours du développement des amphibiens, l'augmentation des quantités d'hormones thyroïdiennes circulantes induit l'apoptose des cellules de la queue et fait disparaître cet organe (Nishikawa and Hayashi, 1995). La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait également appel à l'apoptose, où elle assure qu'un nombre correct de cellules souches se différencie (Clarke et al., 1998).

#### III-1-1- Développement du système nerveux

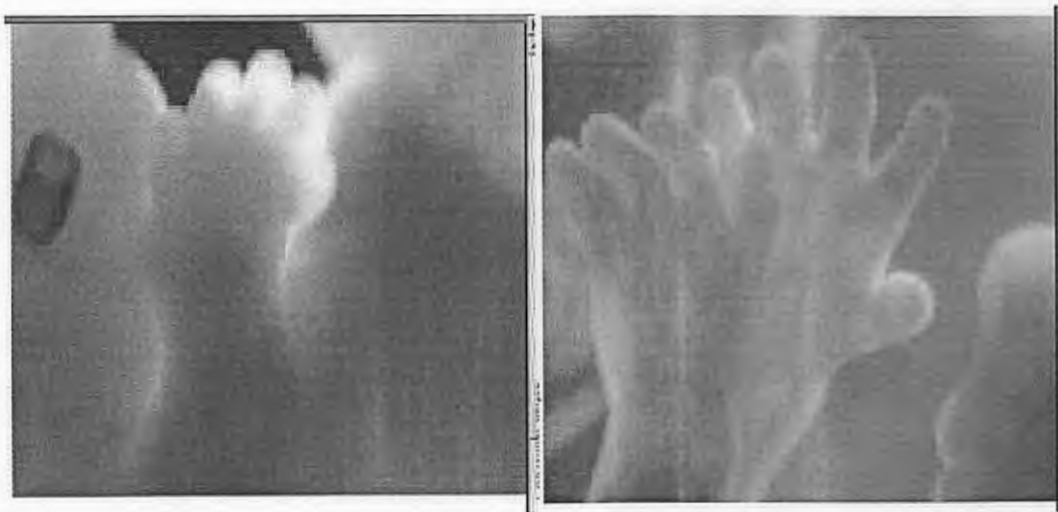
L'apoptose s'avère un phénomène très important au cours du développement du système nerveux des vertébrés, puisqu'elle permet d'assurer l'établissement correct de toutes les connexions synaptiques entre les neurones, en évitant l'impossibilité moléculaire de programmer chacune génétiquement. En effet, le système nerveux en développement produit beaucoup plus de neuroblastes que ce qui est nécessaire pour le fonctionnement du cerveau adulte et donc, de 20 à 80% d'entre eux, selon la région, mourront avant la fin du développement. Par exemple, la moitié des neurones sympathiques et sensoriels générés au cours de l'ontogenèse meurent par apoptose (Raff et al., 1993).

Les neurones subissent une sorte de sélection naturelle par une compétition entre eux pour l'obtention d'une quantité limitée de neurotrophines (facteurs de croissance, cytokines, etc.) libérées de façon paracrine par leur cible. Le premier facteur neurotrophique a été mis en évidence dans les années 1950 et a valu à Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen le prix Nobel pour la découverte du NGF (nerve growth factor). Ces chercheurs ont montré que le NGF améliorait la survie de certaines populations neuronales et permettait l'expansion de neurites et leurs connexions avec leurs cibles (Levi-Montalcini, 1987). Le signal de l'acquisition d'une quantité suffisante de neurotrophines au niveau des terminaisons synaptiques par le neurone en tentative d'implantation, est transduit au noyau comme un signal de survie. On croit que cette survie résulterait de l'inhibition des gènes effecteurs du programme d'apoptose dont la libre action conduit inévitablement vers la mort du neurone (Fig.16).

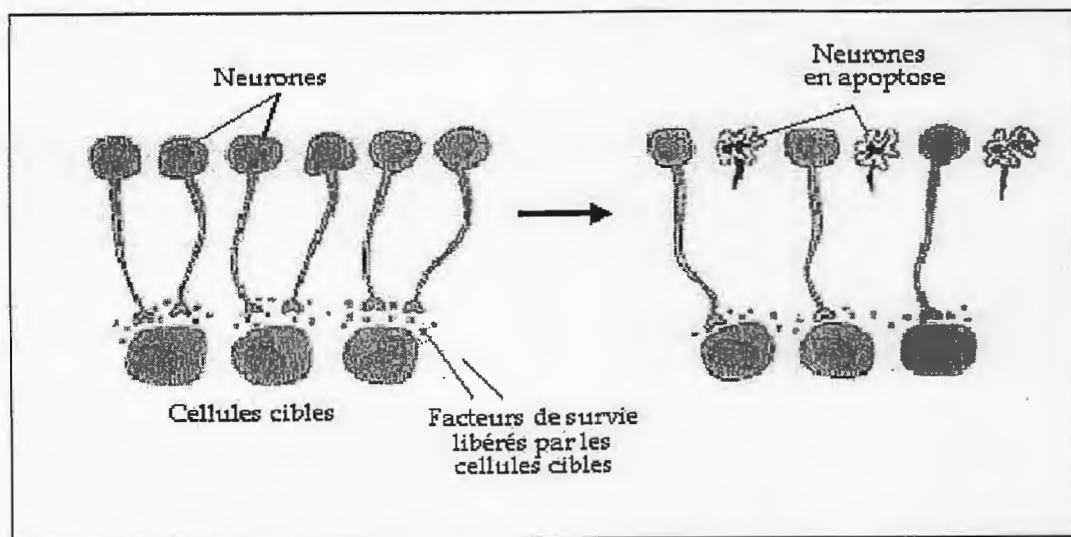
C'est ainsi que des neurones qui naissent plus tôt, qui possèdent une plus grande vitesse de croissance axonale, qui développent plus de ramifications axonales, qui présentent un besoin métabolique moindre pour les neurotrophines ou qui expriment un plus grand nombre de récepteurs pour leurs neurotrophines, sont avantagés et survivent bien au détriment de leurs infortunés compétiteurs. Le résultat de ce processus de sélection des neurones les plus performants, est donc la maximisation d'efficacité des survivants et de leurs synapses tout en éliminant les erreurs de connexion (Davies, 1994).

Il est toutefois important de noter que l'effet des afférences neuronales, de molécules dérivées des cellules gliales ou de la matrice extracellulaire, d'interactions cellule-cellule avec des cellules non-neuronales et de l'activité électrique du neurone, représentent autant d'autres facteurs considérés comme étant impliqués dans la survie des neurones face à l'apoptose (Linden, 1994).

Le processus apoptotique neuronal s'il n'est pas respecté durant le développement embryonnaire, peut conduire à des anomalies létales. Ceci a été démontré chez des souris déficientes en caspase 3 qui ont un développement cérébral anormal consistant en des hyperplasies variées associées à une anarchie cellulaire. Ces souris meurent au cours des trois premières semaines de vie (Kuida et al., 1996).



**Fig. 15:** Mort par apoptose des cellules de la commissure des doigts durant le développement embryonnaire (Jacobson et al., 1997).



**Fig. 16:** Intervention de l'apoptose dans le développement du système nerveux (Clarke et al., 1998).

### III-1-2- Développement du système immunitaire

L'efficacité remarquable de nos défenses contre la multitude des agents infectieux environnants est due à l'extraordinaire diversité des mécanismes de reconnaissance du système immunitaire. Chacun des quelques centaines de millions de lymphocytes qui le compose porte un récepteur qui lui est propre et qui lui permet de reconnaître un agent infectieux capté par les cellules de l'organisme. Pour créer cette diversité, l'organisme utilise la formidable puissance du hasard : il permet à un nombre limité de gènes de s'associer de toutes les façons possibles.

Toutefois, cette solution crée un problème grave : un lymphocyte dont le récepteur a été produit à la suite d'une telle loterie risque de se tromper d'adversaire et d'attaquer les constituants de l'organisme. Chaque récepteur lymphocytaire doit être capable de distinguer les molécules qui appartiennent à l'individu (les molécules du soi) et qui ne doivent pas activer le système immunitaire, et les molécules des agents infectieux (le non-soi) qui doivent activer le système immunitaire : la survie de l'individu en dépend (Ameisen et al., 1994).

La mort cellulaire programmée au niveau du système immunitaire, est essentielle à l'établissement du répertoire de lymphocytes et au maintien du pool de cellules lymphoïdes pendant toute la vie. Au cours de leur développement, les lymphocytes T et B réarrangent au hasard leur récepteur, générant de multiples clones, exprimant chacun un récepteur unique et spécifique. L'obtention de cette diversité requiert des mécanismes empêchant la reconnaissance d'auto-antigènes. L'élimination des cellules auto-réactives (sélection négative) est un point critique à la prévention de l'auto-immunité. Des travaux réalisés sur des souris génétiquement modifiées par la perte ou la surexpression de régulateurs de l'apoptose montre que l'échec d'apoptose dans les lymphocytes entraîne des maladies auto-immunes.

L'inhibition de l'apoptose par l'expression de transgène de Bcl-2 ou la perte de Bim, empêche la sélection négative à la fois des lymphocytes T et B et permet donc la survie des cellules potentiellement auto-réactives (Marsden and Strasser, 2003).

### III-1-3- Apoptose chez l'adulte

L'apoptose intervient aussi chez l'adulte, pour maintenir l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Elle permet à l'organisme de contrôler le nombre de cellules et la taille des tissus. C'est le cas par exemple lors du renouvellement des kératinocytes de la peau (Weil et al., 1999) ou à la fin de la réaction immunitaire, où les lymphocytes T activés en surnombre, meurent par apoptose, de même que les lymphocytes dysfonctionnels ou autoréactifs.

Donc, l'apoptose peut être activée par des signaux physiologiques normaux, intra- ou extracellulaires, mais aussi par des stimuli pathologiques. En effet, elle est responsable de l'élimination des cellules endommagées par un stress oxydatif, par des altérations génétiques, par un choc thermique ou par l'exposition à des agents génotoxiques (chimiothérapie et radiothérapie). Elle permet le bon fonctionnement du système immunitaire, les cellules infectées par des virus ainsi que les cellules tumorales étant détruites par apoptose, par les lymphocytes T cytotoxiques.

### III-2- Apoptose pathologique

Etant donné l'importance biologique de l'apoptose, on comprendra aisément que des dérèglements de ce processus ou de son contrôle, aboutissant à une mort cellulaire excessive ou insuffisante, sont à l'origine d'anomalies du développement et de certaines pathologies (maladies neurodégénératives (cas d'excès), cancer (cas d'inhibition).....) (Follezou et al., 1999).

Un excès d'apoptose dans le système nerveux central peut induire des maladies neurodégénératives caractérisées par une mort neuronale massive comme la maladie d'Alzheimer (Mattson, 2004), la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Sathasivam et al., 2001) ou la maladie de Parkinson (Tatton et al., 2003). Au cours de la maladie d'Alzheimer, la perte neuronale découlant de l'apoptose des neurones conduit à une atrophie cérébrale. De même, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) active l'apoptose des cellules T-auxiliaires (TH) nécessaires à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques responsables de la défense contre les virus (Roshal et al., 2001).

Un déficit de l'apoptose peut aussi causer diverses affections telles que les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) qui se traduisent par une apoptose insuffisante des cellules auto-immunes réactives. Une absence d'apoptose peut également favoriser la survie et la croissance de cellules anormales, normalement destinées à mourir, et ainsi induire des processus de cancérogenèse (Thompson, 1995 ; Reed, 1999). Certaines cellules cancéreuses ont d'ailleurs développé des mécanismes de résistance aux processus physiologiques de l'apoptose (Igney and Krammer, 2002).

Au cours du cancer, le blocage anormal de l'apoptose est important dans le développement des métastases, permettant à des cellules cancéreuses de se propager dans le corps sans s'autodétruire et de survivre dans un organe qui n'est pas le leur (Thompson, 1995 ; Evan and Littlewood, 1998).

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 cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives, tous liés à un excès ou un défaut d'apoptose (Johnson et al., 1999).

#### III-2-1- Cancer et apoptose

On a longtemps cru que la transformation cancéreuse d'une cellule résulterait uniquement de l'expression anormale de proto-oncogènes, des gènes qui déclenchent la multiplication cellulaire.

Plusieurs découvertes ont remis en questions les gènes : premièrement le gène *bcl-2*, dont l'expression anormale est à l'origine des cancers lymphocytaires humains les plus fréquents, ne déclenche pas la multiplication cellulaire, mais inhibe le déclenchement de la mort. Deuxièmement, l'expression anormale de proto-oncogènes suffit, à elle seule, à déclencher la mort cellulaire. Ces gènes n'entraînent la multiplication cellulaire qu'à condition que d'autres gènes soient aussi exprimés pour bloquer la mort cellulaire. Ainsi, l'inhibition anormale de la mort cellulaire est une étape essentielle de la cancérisation (Thompson, 1995).

La transformation cancéreuse peut être liée à l'inactivation anormale d'une autre famille de gènes, les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, qui normalement, freinent la multiplication cellulaire. Or, le gène suppresseur de tumeur p53, dont

l'inactivation par mutation survient dans plus de la moitié des cancers humains, participe au déclenchement de la mort cellulaire. Comme l'activation du gène *bcl-2*, l'inactivation du gène *p53* favorise la survie anormale des cellules. Le gène *p53* veille à l'intégrité du génome cellulaire : lorsque survient une altération génétique, il oblige la cellule soit à interrompre sa multiplication et à réparer la lésion génétique, soit à déclencher sa mort. La plupart des traitements anticancéreux, de la radiothérapie aux chimiothérapies, agissent en forçant les cellules à s'autodétruire. Toutefois, l'accumulation d'altérations génétiques, en inhibant la mort, favorise la résistance aux traitements anticancéreux.

Le blocage anormal des programmes de mort cellulaire participe aussi à la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme, un des mécanismes qui font la gravité des cancers. Une cellule normale qui migre dans un organe autre que le sien s'y suicide, parce qu'elle n'y trouve pas les signaux de survie nécessaire au blocage de son programme d'autodestruction. En revanche, une cellule cancéreuse dont le programme de mort est bloqué, peut survivre en l'absence de signaux appropriés, et coloniser de nouveaux organes en formant des métastases (Thompson, 1995).

### III-2-2- Maladie alcoolique du foie

Au cours de la maladie alcoolique du foie, la destruction hépatocytaire peut être le résultat d'une nécrose par toxicité directe de l'alcool et de ces métabolites, mais également d'une apoptose. La maladie alcoolique expérimentale induite chez le rat et chez le porc miniature s'accompagne d'une augmentation de l'apoptose hépatocytaire. En pathologie humaine, des corps acidophiles sont observés dans l'hépatite alcoolique et leur présence est prise en compte dans un score histologique de gravité de l'hépatite (Orrego et al., 1983). De plus, un article récent (Kawahara et al., 1994) suggère que les hépatocytes ballonnés et les corps de Mallory des lésions d'hépatite alcoolique seraient éliminés par apoptose malgré un aspect peu évocateur en morphologie standard.

Différents inducteurs de l'apoptose hépatocytaire sont susceptibles d'intervenir au cours de l'hépatite alcoolique : le TNF alpha, le NO, les métabolites réactifs de l'oxygène, le TGF bêta-1 (Transforming growth factor beta-1) sécrété par les cellules périsinusoïdales activées et par les cellules de Küpffer (Kamimura et al., 1995), et la voie de Fas/FasL. La libération de TNF alpha par les cellules de Küpffer activées est due à l'endotoxémie présente au cours de la maladie alcoolique du foie (Adachi et al., 1994). En outre, l'ingestion chronique d'alcool chez le rat induit une augmentation de l'expression des récepteurs hépatocytaires du TNF alpha (Deaciuc et al., 1995). Parallèlement à son rôle pro-apoptotique sur les hépatocytes, le TNF alpha entraîne une augmentation de la production de NO par induction de la NO synthase dans les cellules sinusoïdales (Harbrecht et al., 1994) et est susceptible d'activer Fas (French, 1996). Au cours de la cirrhose alcoolique, il a été montré par hybridation *in situ* une forte expression de Fas-L dans les hépatocytes. Fas-L pourrait soit être sous forme transmembranaire et induire la mort de la cellule voisine, soit être produit sous forme soluble et induire la mort hépatocytaire par un processus paracrine ou autocrine en interagissant avec Fas-R qui est exprimé à son niveau constitutionnel (Galle et al., 1995). D'autres mécanismes plus directement liés à l'alcool peuvent également intervenir. Les adduits de l'acétaldéhyde, produits au cours du métabolisme intra-hépatique de l'alcool, seraient capables de retarder la progression du cycle cellulaire et d'induire une apoptose hépatocytaire (Zimmerman et al., 1993).

### III-2-3- Stress oxydant

Le stress oxydant, résultant d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) et leur destruction par les défenses antioxydantes, est décrit aujourd'hui comme un mécanisme impliqué dans la réponse apoptotique (Chandra et al., 2000 ; Andrieu-Abadie et al., 2001).

Une faible concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène, une espèce oxydante dérivée des ROS (Hampton and Orrenius, 1997 ; Goldkorn et al., 1998) ou des peroxydes lipidiques (Sandstrom et al. 1994) sont en effet capable de provoquer l'apoptose des cellules en culture. Par ailleurs, de nombreux inducteurs de l'apoptose, comme le TNF- $\alpha$  (Liu et al., 1998), peuvent altérer les défenses antioxydantes. D'autres inducteurs, tels que les céramides exogènes (Quillet-Mary et al., 1997), des drogues cytotoxiques comme la daunorubicine (Mansat-de Mas et al. 1999) ou encore le glucose (Kaneto et al., 1996) peuvent entraîner la formation de radicaux libres. De plus, de nombreux antioxydants cellulaires, comme la N-acétyl-L-cystéine (Liu et al., 1998), et des enzymes antioxydantes, comme la glutathion peroxydase (Nomura et al., 1999), ou la catalase (Sandstrom and Buttke, 1993) sont capable de prévenir l'apoptose.

- **Relation entre l'apoptose et le stress**

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 bat mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par massif, soit par un mauvais fonctionnement des systèmes de réparation chez des sujets déficients en cofacteurs (zinc, thioredoxines) 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 apoptose (Esterbauer et al., 1992 ; Cadet et al., 2002).

- **La formation des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) dans l'apoptose**

Les ROS peuvent être produits dans la cellule par différentes voies, la principale source étant la réduction d'une molécule d'O<sub>2</sub> en radical anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> peut être formé dans certains organites cellulaires, comme les mitochondries lors d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire (Kane et al., 1993). Divers travaux ont montré une production de ROS au niveau mitochondrial dans les cellules apoptotiques (Wong and Goeddel, 1988). Bien que les mécanismes moléculaires exacts mis en jeu dans le dysfonctionnement du transfert d'électrons restent mal définis, la formation de ROS pourrait notamment résulter de la libération du cytochrome c (Ghafourifar et al., 1999). La libération mitochondriale du cytochrome c, observée dans de nombreux modèles apoptotiques en réponse à différents agents de mort, s'accompagnerait donc d'une production parallèle de ROS. D'ailleurs, la protéine Bcl-2, protéine capable de bloquer la fuite du cytochrome c, inhibe également la génération de ROS (Kane et al., 1993 ; Cai and Jones, 1998). Des enzymes, comme les NO synthases (Binder et al., 1999 ; Ghafourifar et al., 1999) ou les lipoxigénases (O'Donnell et al., 1995), peuvent également être responsable de la formation de ROS au cours du processus apoptotique.



# ***CONCLUSION***

## **Conclusion**

Cette étude montre que l'apoptose est une forme active de mort cellulaire. Elle constitue une réponse de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques provoquant un déséquilibre entre production et élimination de cellules. A partir de l'étude bibliographique que nous avons effectué sur l'apoptose, nous avons abouti à relever qu'il y a deux mécanismes exécutant cette mort programmée, à savoir la voie extrinsèque principalement constituée de récepteurs à domaine de mort activant des protéases à cystéine, les caspases, et une voie intrinsèque mettant en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. Ce phénomène de mort est totalement différent de la nécrose principalement par l'absence de l'inflammation.

Dans cette étude il paraît que les mécanismes d'exécution de l'apoptose sont assez complexes. Ils commencent par l'induction, la décision puis l'exécution. La première étape est caractérisée par des effecteurs ou inducteurs de signalisation de nature chimique tel que l'excès de stress oxydatif ou encore des signaux d'origine génétique. La deuxième étape est décisionnelle, dans ce cas la cellule est réparable ou non et la décision sera prise en fonction du degré de désorganisation cellulaire produite par les pro-apoptotiques d'origines diverses. Pour l'exécution, le processus fait appel à des protéases qui fragmentent et hydrolysent les macromolécules et conduit à la mort de la cellule.

Il s'avère que dans cette étude, l'apoptose est un phénomène tant physiologique que pathologique. Elle joue un rôle déterminant dans l'embryogenèse, dans certains changements morphologiques et dans l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Cependant, tout dérèglement pathologique du processus apoptotique dans le sens d'accélération ou d'inhibition, ainsi que la perte de son contrôle par des facteurs pro-apoptotiques, est à l'origine de nombreuses maladies comme les cancers, certains désordres immuns et les maladies neuro-dégénératives.

*Références  
Bibliographiques*

- Acekan D., Jiang X., Morgan D.G., Heuser J.E., Wang X., Akey G.W. (2002). Three dimensional structure of the apoptosome: implication for assembly procaspase-9 binding and activation. *Molecular. Cell*; 9: 423-432.
- Adachi Y., Bradford B.U., Gao W., Bojes H.K., Thurman R.G. (1994). Inactivation of Küpffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology*; 20: 453-60.
- Adams J.M, Cory S. (1998). The Bcl-2 protein family arbiters of cell survival. *Science*; 281: 322-326.
- Akao Y., Otsuki Y., Kataoka S., Ito Y., Tsujimoto Y. (1994). Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane and mitochondrial membranes. *Cancer. Res*; 54: 2468-2471.
- Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. (1996). Protein human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*; 87: 171.
- Ameisen J.C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of billion years. *Cell. Death. Differ*; 9: 367-93.
- Ameisen J.C. (1999). La sculpture du vivant. Le suicide cellulaire ou la mort créatrice. 2nd ed. 2000, Paris. Editions du seuil.
- Ameisen J.C., Estaquier J., Idziorek T. (1994). From AIDS to parasite infection: pathogenmediated subversion of programmed cell death as a mechanism for immune dysregulation. *Immunol Reviews*; 142: 9-51.
- Andrieu-Abadie N., Gouaze V., Salvayre R., Levade T. (2001). Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free. Radic. Biol. Med*; 31: 717-728.
- Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R., Martinou J.C. (2000). Bax oligomérisation is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J*; 345.2: 271-8.
- Antonsson B., Montessuit S., Sanchez B., Martinou J.C. (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem*; 276: 11615-11625.
- Bakhshi A., Jensen J.P., Goldman P., Wright J.J., McBride D.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., Heibin 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 caspase8 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 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.
- Bellet V (2003). Les différentes voies apoptotiques induites par le lentivirus visna. Inhibition par l'AZT et corrélation avec l'apoptose, in vitro. *Thèse de doctorat « Virologie-Biologie cellulaire et moléculaire-Biochimie », Limoges (300 D/1)*.
- 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.
- Bergeron L., Perez G.I., Macdonald G., Shi L., Sun Y., Jurisicova A., Varmuza S., Latham K. E, Flaws J. A, Salter J. C, Hara H, Moskowitz M. A, Li E, Greenberg A, Tilly J. L, and Yuan J. (1998). Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes. Dev*; 12:1304-14.
- Bicknell G.R., Cohen G.M.. (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occur some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 207: 40-7.

- Binder C., Schulz M., Hiddemann W., Oellerich M. (1999). Caspase activation and induction of inducible nitric oxide-synthase during TNF alpha-triggered apoptosis. *Anticancer Res*; 19: 1715-1720.
- Biswas S.C., Green 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.
- Boise L.H., Gonzalez-Garcia M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka L.A., Mao Xiaohong., Nunez G., Thompson C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*; 74: 597-608.
- Borner C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol*; 39: 615-47.
- Bossy-Wetzel E., Newmeyer D.D., Green D.R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation 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. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*; 415: 922-926.
- Brancolini C., Benedetti M., Schneider C. (1995). Protein microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas-2 a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO. J*; 14: 5179-5190.
- Bratton D.L., Fadok V.A., Richter D.A., Kailey J.M., Guthrie L.A., Henson P.M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated non specific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem*; 272: 26159-26165.
- Bump N.J., Hackett M., Hugunin M., Seshagiri S., Brady K., Chen P., Ferenz C., Franklin S., Chayur T., Li P. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*; 269: 1885-1888.
- 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. *J. Biol. Chem*; 383 (6): 93.
- Cai J., Jones D.P. (1998). Superoxide in apoptosis mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J. Biol. Chem*; 273: 11401-11404.
- Cain K., Brown D.G., Langlais C., Cohen G.M. (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 KDa) caspase-activating complex. *J. Biol. Chem*; 274: 22686-92.
- 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.
- Cecconi F. (1999). Apaf-1 and the apoptotic machinery. *Cell. Death. Differ*; 6: 1087-98.
- Chandra J., Samali A., Orrenius S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxydative stress. *Free. Rad. Biol. Med*; 29: 323-333.
- Chaudhary P.M., Eby M., Jasmin A., Bookwalter A., Myrray I., Hood L. (1997). Death receptor 5 a new member of the TNF-R family and DR4 induce FADD dependent apoptosis and activate the NF-kappa B 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 E.H., Sheiko T.V., Fisher J.K., Craigen W.J., Korsmeyer S.J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and apoptosis mitochondrial. *Science*; 301: 513-517.

- Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V.M. (1995). FADD a novel death domain-containing protein interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*; 81: 505-512.
- Chinnaiyan A.M., Tepper C.G., Seldin M.F., O'Rourke K., Kischkel F.C., Hellbardt S., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*; 271: 4961-4965.
- Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayse 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., Clark S. (1996). Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat. Embryols*; 193: 81-99.
- Clarke P.G., Posada A., Primi M.P., Castagne V. (1998). Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed. Pharmacoth*; 52: 356-362.
- Cleary M.L., Sklar J. (1985). Nucleotide sequence of a t (14:18) chromosomal breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 82: 7439-7443.
- Cohen G.M., Sun X.M., Snowden R.T., Dinsdale D., Skilleter D.N. (1992). Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J*, 286: 331-334.
- 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.
- Couzinet A., Herincs Z., Hueber A.O. (2002). Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Medecine/ Sciences* ; 18 : 841-52.
- Crompton M. (1999). Mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J*; 341: 233-249.
- Crook N.E., Clem R.J., Miller L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like. *J. Virol*; 67: 2168-74.
- Datta S.R., Ranger A.M., Lin M.Z., Stuegill J.F., Ma Y.C., Cowan C.W., Dikkes P., Korsmeyer S.J., Geenberg M.E. (2002). Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev. Cell*; 3: 631-643.
- Daugas E., Susin S.A., Zamzami N., Ferri K.F., Irinopoulou T., Larochette N., Prevost M.C., Leber B., Andrews D., Penninger J., Kroemer G. (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J*; 14: 729-739.
- Davies A.M. (1994). The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J Neurobiology*; 25 (1t): 1334-1348.
- Deaciuc I.V., D'Souza N.B., Spitzer J.J. (1995). Tumor necrosis factor-alpha cell-surface receptors of liver parenchymal and non parenchymal cells during acute and chronic alcohol administration to rats. *Alcohol. Clin. Exp Res*; 19: 332-5.
- Debatin K.M and Krammer P.H. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*; 23: 2950-2966.
- Deckwerth T.L., Elliott J.L., Knudson C.M., Johnson E.M., Snider W.D., Korsmeyer S.J. (1996). BAX is required for neuronal death after tropic factor deprivation and during development. *Neuron*; 17: 401-11.
- De Giorgi F., Lartigue L., Bauer M.K., Schubert A., Grimm S., Hanson G.T., Remington S.J., Youle R.J., Ichas F. (2002). The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB. J*; 16: 606-9.
- Del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R., Nunez G. (1997). Interleukin-3 induced phosphorylation of BAD through the protein Akt. *Science*; 278: 687-689.
- Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature*; 388: 300-304.

- Dong Z., Saikumar P., Weinberg J.M., and Venkatachalam M.A (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not system proteases. *Am. J. Pathol*; 151: 1205-13.
- Duan H., Dixit V.M. (1997). RAIDD is a new death adaptor molecule. *Nature*; 385: 86-89.
- Duckett C.S., Nava V.E., Gedrich R.W., Clem R.J., Van Dongen J.L., Giffillan M.C., Shiels H., Hardwick J.M., Thompson C.B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus IAP gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo. J*; 15: 2685-94.
- Duneau M. (2005). Galig: un nouveau gène humain inducteur de la mort cellulaire. Thèse de doctorat de l'université de l'université d'Orléans. pp 18-61.
- Duvall E. and Wyllie A.H. (1986). Death and the cell. *Immunol. Today*; 7: 115-119.
- Duvall E., Wyllie A.H., Morris R.G. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology*; 56: 351-358.
- 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.
- Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. A caspase- activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. (1998). *Nature*; 391:43-50.
- Esterbauer W.C., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free. Rad. Biol. Med*; 13: 341.
- Evan G., Littlewood T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*; 281: 1317-1322.
- Faccio L., Fusco C., Chen A., Martinotti S., Bonventre J.V., Zervos A.S. (2000). Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA2 is regulated by kidney ischemia. *J. Biol. Chem*; 275: 2581-8.
- Fadok V.A., Savill J.S., Haslett C., Bratton D.L., Doherty D.E., Campbell P.A., Henson P.M. (1992). Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol*; 149: 4029-4035.
- Farrell A.M., Uchida Y., Nagiec M.M., Harris I.R., Dickson R.C., Elias P.M., Holleran W.M. (1998). UVB irradiation up-regulates serine palmitoyl-transferase in cultured human keratinocytes. *J. Lipid. Res*; 39: 2031-2038.
- Ferri K.F., Jacotot E., Blanco J., Este J.A., Zamzami N., Susin S.A., Xie Z., Brothers G., Reed J.C., Penninger J.M., Kroemer G. (2000). Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type I envelope complex: role of mitochondria and caspases. *J. Exp. Med*; 192: 1081-92.
- Fernandez Y., Verhaegen M., Miller T.P., Rush J.L., Steiner P., Opipari A.W., Lowe S.W., Soengas M.S. (2005). Differential regulation of Noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implication. *Cancer. Res*; 65: 6294-6304.
- Fisher D.E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold cell; 78: 539-42.
- Follezou J.Y., Emerit J., Bricaire F. (1999). Neuro-degenerative diseases: role of reactive oxygen species and of apoptosis. *Press. Med*; 28: 1661-1666.
- Footz T.K., Birren B., Minoshima S., Asakawa S., Shimizu N., Riazi M.A., Mc Dermid 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.
- French S.W. (1996). Ethanol and hepatocellular injury. *Clin. Lab. Med*; 16: 289.
- Gagliardini V., Fernandez P.A., Lee R.K., Drexler H.C., Rotello R.J., Fishman M.C., Yuan J. (1994). Prevention of vertebrate neuronal death by the CrmA gene [see comments] [published erratum appears in science 1994 Jun 3, 264 (5164): 1388]. *Science*; 263: 826-828.

- Galle P.R., Hofmann W.J., Walczak H., Schaller H., Otto G., Stremmel W. (1995). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J. Exp. Med.*; 182: 1223-30.
- Gentile V., Thomazy V., Piacentini M., Fesus L., Davies P.J. (1992). Expression of tissue transglutaminase in Balb-C 3T3 fibroblasts: effects on cellular morphology and adhesion. *J. Cell. Biol.*; 119: 463-474.
- Ghafourifar P., Schenk U., Klein S.D., Richter C. (1999). Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intermitochondrial peroxynitrite formation. *J. Biol. Chem.*; 274: 31185-31188.
- Gibson L., Holmgren S.P., Huang D.C., Bernard O., Copeland N.G., Jenkins N.A., Sutherland G.R., Baker E., Adams J.M., Cory S. (1996). Bcl-w, a novel member of the bcl-2 family promotes cell survival. *Oncogene*; 13: 665-675.
- Goldkorn T., Balaban N., Shannon M., Chea V., Matsukuma K., Gilchrist D., Wang H., Chan C. (1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts on cellular membranes to generate céramides signaling and initiate apoptosis in trancheobronchial epithelial cells. *J. Cell. Sci.*; 111: 3209-3220.
- Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M., Green D.R. and Ferguson T.A. (1995). Fas-ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*; 270: 1189-92.
- Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*; 13: 1899-1911.
- Groux H., Moute D., Bounez J.M., Capron A. and Ameisen J.C. (1991). Activation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in asymptomatic HIV infected patients induce the program action of lymphocyte death by apoptosis. *CR. Acad. Sci. III*; 312: 599-606.
- Ha S.H., Lee S.R., Lee T.H., Kim Y.M., Baik M.G., Choi Y.J. (2001). Expression of Bok is regulated by serum in HC11 mammary epithelial cells. *Mol. Cells*; 12: 368-371.
- Hakem R., Hakem A., Duncan G.S., Henderson J.T., Soengas M.S., Elia A., de la pompa Z.L., Kagi D., Khoo W., Potter J., Yoshida R., Kaufman S.A., Lowe S.W., Penninger J.M., Mak T.W. (1998). Differential requirement for caspase-9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*; 94: 339-52.
- Halestrap A.P. (1999). The mitochondrial permeability, its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem. Soc. Symp*; 66: 181-203.
- Hampton M.B., Orrenius S. (1997). Dual regulation of caspase activity by drogen proxide : implication of apoptosis. *FEBS. Lett*; 414: 552-556.
- Han J., Flemington C., Houghton A.B., Gu Z., Zambetti G.P., Lutz R.J., Zhu L., Chittenden T. (2001). Expression of bbc3, a proapoptotic BH3-only gene is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 98: 11318-11323.
- Han Z., Hendrickson E.A., Bremmer T.A., Wyche J.H. (1997). A sequential tow-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *J. Biol. Chem*; 272: 13432-13436.
- Harbrecht B.G., DiSilvio M., Demetris A.J., Simmons R.L., Billiar T.R. (1994). Tumor necrosis factor-alpha regulates in vivo nitric oxide synthesis and induces liver injury endotoxemia. *Hepatology*; 20: 1055-8.
- Hengartner M.O. and Horvitz H.R. (1994). Programmed cell death in Caenorhabditis elegans. *Curr. Opin. Genet. Dev*; 4: 581-586.
- Hinds M.G., Norton R.S., Vaux D.L., Day C.L. (1999). Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeats. *Nat. Struct. Biol*; 6: 648-51.
- Hockenbery D., Nunez G., Millinan C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*; 348: 334-336.
- Hofmann K., Bucher P., Tschopp J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends. Biochem. Sci*; 22: 155-6.
- 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., Mc Gee E., Lomeli M., Hsueh A.J. (1997). Bak 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: 12401-6.
- Hu S., Vincenz C., Ni J., Gentz R., Dixit V.M. (1997). I-FLICE a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1 and CD-95 induced apoptosis. *J. Biol. Chem*; 272: 17255-17257.
- Huang D.C.S., Strasser A. (2000). BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*; 103: 839-842.
- Igney F.H., Krammer P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*; 2: 277-288.
- Inohara N., Koseki T., Hu Y., Chen S., Nunez G. (1997). CLARP, a death effector domain containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 94: 10717-22.
- Irmeler M., Hofmann K., Vaux D., Tshopp J. (1997). Direct physical interaction between the caenorhabditis elegans "death proteins" CED-3 and CED-4. *FEBS. Lett*; 406: 189-90.
- Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Negata 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. Neuro. Chem*; 85: 1500-1512.
- Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*; 88: 347-54.
- Johnson F.B., Sinclair D.A., Guarente L. (1999). Molecular biology of aging. *Cell*; 96: 291-302.
- 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. USA*; 95: 4997-5002.
- Kamimura S., Tsukamoto H. (1995). Cytokine gene expression by Küpffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology*; 22: 1304-9.
- Kamada S., Shimono A., Shinto Y., Tsujimura T., Takahashi T., Noda T., Kitamura Y., Kondoh H., Tsujimoto Y. (1995). Bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation and distorted small intestine. *Cancer Res*; 55: 354-359.
- Kane D.J., Sarafian T.A., Anton R., Hahn H., Gralla E.B., Valentine J.S., Ord T., Bredesen D.E. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*; 262: 1274-1277.
- Kaneto H., Fujiti J., Myint T., Miyazawa N., Islam K.N., Kawaki Y., Suzuki K., Nakamura M., Tatsumi H., Yamasaki Y., Taniguchi N. (1996). Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glutation reaction. *Biochem. J*; 320: 855-863.
- Kang J.J., Schaber M.D., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Litwack G., Hall D.J., Bjornsti M.A. (1999). Cascades of mammalian caspases activation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*; 274: 3189-3198.
- 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: 543-551.
- Kaufmann T., Schilipf S., Sanz Z., Neubert K., Stein R., Borner C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-xL, but not Bcl-2, to mitochondrial outer membrane. *J. Cell. Biol*; 160: 53-64.
- Kawahara H., Matsuda Y., Takase S. (1994). Is apoptosis involved in alcoholic hepatitis? *Alcohol*; 29: 113-8.
- Keilin D. (1930). Cytochrome and intercellular oxidase. *Proc. R. Soc. Lond*; B106: 418-44.

- Kerr J.F., Wyllie A.H. and Curie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue Kinetics. *Br. J. cancer*; 26: 239-257.
- Kharbanda S., Saxena S., Yoshida K., Pandey P., Kaneki M., Wang O., 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-xL 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 factor beta induces apoptosis through cleavage of BAD in a smad3-dependent mechanism in FaO hepatoma cells. *Mol. Cell. Biol*; 22: 1369-1378.
- Kirsch D.G., Doseff A., Chau B.N., Lin D.S., de Souza-pinto N.C., Hansford R., Kastan M.B., Lazebnik Y.A., Hardwick J.M. (1999). Caspase-3 dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J. Biol. Chem*; 274: 21155-21161.
- Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95) associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO. J*; 14: 5579-5588.
- Kischkel F.C., Lawrence D.A., Tinel A., leBlanc H., Virmani A., Schow P., Gazdar A., Blenis J., Arnott D., Ashkenazi A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem*; 276: 46639-46646.
- Klein J.A., Longo-Guess C.M., Rossman M.P., Seburn K.L., Hurd R.E., Frankel W.N., Bronson R.T., Ackerman S.L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*; 419: 367-74.
- 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. *Science*; 275: 1132-1136.
- Knudson C.M., Tung K.S., Tourtellotte W.G., Brown G.A., Korsmeyer S.J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*; 270: 96-99.
- Komiyama T., Ray C.A., Pickup D.J., Howard A.D., Thornberry N.A., Peterson E.P., Salvesen G. (1994). Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox-virus serpin CrmA an example of cross-class inhibition. *J. Biol. Chem*; 269: 19331-7.
- Korsmeyer S.J., Wei M.C., Saito M., Weiler S., Oh K.J., Schlesinger P.H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell. Death. Differ*; 7: 1166-73.
- 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 Z.A., Ku G., 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.
- Kuida K., Zheng T.S., Na S., Kuan C., Yang D., Karasuyama H., Rakic P., Flavell R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*; 384: 368-372.
- 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 Bax-mediated mitochondrial membrane perméabilisation both directly and indirectly. *Mol. Cell*; 17: 525-535.
- Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G., Earnshaw W.C. (1994). Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*; 371: 346-347.
- Levi-Montalcini R. (1987). The growth factor 35 years later. *Science*; 237: 1154-62.
- Levkau B., Garton K.J., Ferri N., Kloke K., Nofer J.R., Baba H.A., Rains E.W., Breithardt G. (2001). XIAP induces-cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappa B: new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial

- cells. *Circ. Res*; 88: 282-290.
- 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: 491-591.
  - Li P., Allen H., Banerjee S., Franklin S., Herzog L., Johnston C., Mc Dowell 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.
  - Li P., Nijhawan D.E., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*; 91: 479-489.
  - Linden R. (1994). The survival of developing neurons: a review of afferent control. *Neuroscience*; 58 (4): 671-682.
  - 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 B., Andrieu-Abadie N., Levade T., Zhang P., Obeid L.M., Hunnun Y.A. (1998). Glutathione regulation of neuronal sphingomyelinase in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *J. Biol. Chem*; 273: 11313-11320.
  - Liu J.W., Chandra D., Tang S.H., Chopra D., Tang D.G. (2002). Identification and characterization of Bim gamma, a novel proapoptotic BH3-only splice variant of Bim. *Cancer Res*; 62: 2976-2981.
  - Ly J.D., Grubb D.R., Lawen A. (2003). The mitochondrial membrane potential in apoptosis; an update. *Apoptosis*; 8: 115-28.
  - Mansat-de Mas V., Bezombes C., Quillet-Mary A., Bettaieb A., D'orgeix A.D., Laurent G., Jaffrezou J.P. (1999). Implication of radical oxygen species in ceramide generation, c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis induced by daunorubicin. *Mol. Pharmacol*; 56: 867-874.
  - Mapara M.Y., Bargou R., Zugck C., Dohner H., Ustaoglu F., Jonker R.R., Krammer P.H., Dorken B. (1993). APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukaemia: correlation with Bcl-2 oncogene expression. *Eur. J. immunol*; 23: 702-8.
  - Marsden V.S., Strasser A. (2003). Control of the apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3 only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol*; 21: 71-105.
  - Martinou I., Desagher S., Eskes R., Antonsson B., Andre E., Fakan S., Martinou J.C. (1999). The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J. Cell. Biol*; 144: 883-889.
  - Mashima T., Naito M., Noguchi K., Miller D.K., Nicholson D.W., Tsuruo T. (1997). Actin cleavage by CP32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene*; 14: 1007-1012.
  - Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Susin S.A., Bunter G., Britzka D., Remy R., Xiao Z.H., Reed J. C., Kroemer G. (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2 related proteins. *J. Exp. Med*; 187: 1261-1271.
  - Mate M.J., Ortiz-lombardia M., Biotel B., Haouz A., Tello D., Susin S.A., Penninger J., Kroemer G., Alzari P.M. (2002). The crystal of the mouse apoptosis inducing factor AIF. *Nat. Struct. Biol*; 9: 442-6.
  - Mattson M.P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*; 430: 631-639.
  - Meier P., Finch A., Evan G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*; 407: 796-801.
  - Miller L.K. (1999). An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends. Cell. Biol*; 9: 323-328.

- Motoyama N., Wang F., Roth K.A., Sawa H., Nakayama K., Negishi I., Senju S., Zhang Q., Fujii S. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*; 267: 1506-10.
- Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wong S.L., Ng S.L., Fesik S.W. (1996). X ray and NMR structure of human Bcl-xL an inhibitor of programmed cell death. *Nature*; 381: 335-341.
- 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. *Cells Death Differ*; 7: 102-111.
- Muzio M., Salvesen G.S., Dixit V.M. (1997). FLICE induced apoptosis in a cell-free system cleavage of caspase zymogens. *J. Biol. Chem*; 272: 2952-2956.
- Nagata S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*; 88: 355-365.
- Nagata, S., and Golstein P. (1995). The Fas death factor. *Science*; 267: 1449-56.
- Nakano K., Vousden K.H. (2001). Puma, a novel proapoptotic gene is induced by p53. *Mol. Cell*; 7: 683-694.
- Nakayama K., Negishi I., Kuida K., Sawa H., Loh D.Y. (1994). Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of grey hair, polycystic kidney disease and lymphocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 91: 3700-4.
- Neer E.J., Schmidt C.Z., Nambudripad R., Smith T.F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD repeats proteins. *Nature*; 27: 371 (6500):812.
- Nguyen M., Millar D.G., Yong V.W., 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: 25265-8.
- Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A.. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [see comments]. *Nature*; 376: 37-43.
- Nishikawa A., Hayashi H. (1995). Spatial, temporal and hormonal regulation of programmed muscle cell death during metamorphosis of the frog *Xenopus levis*. *Differentiation*; 59: 207-214.
- Nomura K., Imai H., Koumura T., Arai M., Nakagawa Y. (1999). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem*; 274: 29294-29302.
- 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.
- O'Donnell V.B., Spucher S., Azzi A. (1995). Involvement of oxidants and oxidant-generating enzyme (s) in tumor necrosis factor alpha mediated apoptosis: role of lipoxygenases pathway but not mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J*; 310: 133-141.
- Oliveri M., Daga A., Cantoni C., Lunardi C., Millo R., Puccetti A. (2001). DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol*, 31: 743-751.
- Oltvai Z.N., Millman C.L., Korsmeyer S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog-Bax that accelerates programmed cell death. *Cell*; 74: 609-619.
- Opferman J.T., Korsmeyer S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology*; 4: 410-415.
- Oppenheim R.W., Prevette D., Tytell M., Homma S. (1990). Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev. Biol*; 138: 104-113.
- O'Reilly L.A., Cullen L., Visvader J., Lindeman G.J., Print C., Bath M.L., Huang D.C., Strasser A. (2000). The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in haematopoietic, epithelial, neuronal and germ cells. *Am. J. Pathol*; 157: 449-461.

- Orrego H., Israel Y., Blake J.E., Medline A. (1983). Assessment of prognostic factors in alcoholic liver disease: toward a global quantitative expression of severity. *Hepatology*; 3: 896-905.
- Palumbo G. J., Pickup D. J., Fredrickson T. N., McIntyre L. J., Buller R. M. (1989). Inhibition of an inflammatory response is mediated by a 38-kDa protein of cowpox virus. *Virology*; 172: 262-73.
- Pastorino J.G., Chen S.T., Tafani M., Snyder J.W., Farber J.L. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem*; 273: 7770-7775.
- Pastorino J.G., Tafani M., Rothman R.J., Marcinkeviciute A., Hoek J.B., Farber J.L., Marcineviciute A. (1999). Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem*; 274: 31737-9.
- Petit P.X., Zamzami N., Vayssiere J.L., Mignotte B., Kroemer G., Castedo M. (1997). Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol. Cell. Biochem*; 174: 185-188.
- Petros A.M., Olejniczak E.T., Fesik S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochem. Biophys. Acta*; 1644: 83-94.
- Print C.G., Loveland K.L., Gibson L., Meeham T., Stylianou A., Wreford N., Kretser D., Metcalf D., Kontgen F., Adams J.M., Cory S. (1998). Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 95: 12425-31.
- 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.
- 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.
- Quillet-Mary A., Jaffrezou J.P., Mansat V., Bordier C., Naval J., Laurent G. (1997). Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*; 272: 21388-21395.
- Raff M.C., Barres B.A., Bume J.F., Coles H.S., Ishizaki Y., Jacobson M.D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*; 262: 695-700.
- Rasper D.M., Vaillancourt J.P., Hadano S., Houtzager V.M., Seiden I., Keen S.L., Tawa P., Xanthoudakis S., Nasir J., Martindale D., Koop B.F., Peterson E.P., Thornberry N.A., Huang J., MacPherson D.P., Black S.C., Hornung F., Lenardo M.J., Hayden M.R., Roy S., Nicholson D.W. (1998). Cell death attenuation by "Usurpin", a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas/APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ*; 5: 271-88.
- Rathmell J.C., Thompson C.B. (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol*; 17: 781-828.
- Reed J.C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol*; 17:2941-2953.
- Rosenquist M. (2003). 14-3-3 proteins in apoptosis. *Braz. J. Med. Biol. Res*; 36: 403-8.
- Roshal M., Zhu Y., Planelles V. (2001). Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*; 6: 103-16.
- Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., Van Gorp M., Van Loo G., Vandenabeele P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*; 23: 2861-74.
- Sandstrom P.A., Buttke T.M. (1993). Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEMT-cell line in serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 90: 4708-4712.
- Sandstrom P.A., Tebbey P.W., Van cleare S., Buttke T.M. (1994). Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxydase

- deficiency. *J. Biol. Chem*; 269: 798-801.
- Sathasivam S., Ince P.G., Shaw P.J. (2001). Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*; 27: 257-274.
  - Sattler M., Liang H., Nettesheim D., Mezdows 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: 983-986.
  - Savill J., Dransfield I., Hogg N., Haslett C. (1990). Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature*; 343: 170-173.
  - Savopoulos J.W., Carter P.S., Turconi S., Pettman G.R., Karran E.H., Gray C.W., Ward R.V., Jenkins D., Creasy C.L. (2000). Expression, purification, functional analysis of the human serine protease HtrA2. *Protein. Expr. Purif*; 19: 227-34.
  - Sawada M., Sun W., Hayes P., Leskov k., boothman D.A., Matsuyama S. (2003). Ku 70 suppresses the apoptosis translocation of Bax mitochondria. *Nat. Cell. Biol*; 5: 320-329.
  - 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.
  - Schulze-Osthoff K., Walczak H., Droge W., Krammer P. H. (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. Cell. Biol*; 127: 15-20.
  - Sentman C.L., Shutter J.R., Hockenbery D., Kanagawa O., Korsmeyer S.J. (1991). Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*; 67: 879-888.
  - Sharpe J.C., Arnoult D., Youle R.J. (2004). Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochimica. Acta*; 1644: 107-113.
  - Shimizu S., Ide T., Yanagida T., Tsujimoto Y. (2000). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem*; 275: 12321-5.
  - Shu H.B., Halpin D.R., Goeddel D.V. (1997). Casper is a FADD and caspase inducer of apoptosis. *Immunity*; 6: 751-63.
  - Silke J., Vaux D.L. (2001). Two kinds of BIR-containing protein-inhibitors of apoptosis or required for mitosis. *J. Cell. Sci*; 114: 1821-1827.
  - Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S. (1999). Ordering the cytochrome c initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspase-2, 3, 6, 7, 8 and 10 in a caspase-9 dependent manner. *J. Cell. Biol*; 144: 281-292.
  - 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.
  - Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandez-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E.S. (1996). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO1 protease Mch5 is a CrmA inhibitable protease that activates multiple ced-3/ICE like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93: 14486-14491.
  - Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandez-Alnemri E.S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1 mediated oligomerization. *Mol. Cell*; 1: 949-957.
  - Srinivasula S. M., Ahmad M., Otilie S., Bullrich F., Banks S., Wang Y., Fernandes-Alnemri T., Croce C. M., Litwack G., Tomaselli K. J., Armstrong R. C., Alnemri E. S. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*; 272: 18542-5.
  - Stanger B.Z., Leder P., Lee T.H., Kim H., Kim E., Seed B. (1995). BIP a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*; 81: 513-523.

- 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 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. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*; 397: 441-446.
- Susin S.A., Zamzami N., Gastedo M., Hirsch T., Marchetti P., Marcho A., Daugas E., Geuskens M., Kroemer G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med*; 184: 1331-1341.
- Takahashi A., Alnemri E.S., Lazebnik Y.A., Fernandez-Alnemri T., Litwak G., Moir R.D., Goldman R.D., Poirier G.G., Kaufmann S.H., Earnshaw W.C. (1996). Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93: 8395-8400.
- Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H., Goeddel D.V. (1993). A novel domain with the 55 Kd TNF receptor signals cell death. *Cell*; 74: 845-53.
- Tatton W.G., Chalmers-Redman R., Brown D., Tatton N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*; 53 Suppl 3: 561-570. Discussion 570-572.
- Tewrai M., Dixit V.M. (1995). Fas- and tumor necrosis factor- induced apoptosis is inhibited by the poxvirus CrmA gene product. *J. Biol. Chem*; 270: 3255-60.
- Thatte U., Bagadey S., Dahanukar S. (2000). Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*; 46: 199-214.
- Thomas D., Pollard M.D., William C., Earnshaw Ph.D. (2004). In Biology cellular. *El. Sevier*; 819-821.
- Thompson C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; 267: 1456-1462.
- Thornberry N.A., Rano T.A., Peterson E.P., Rasper D.M., Tinkey T., Garcia-Calvo M., Houtzager V.M., Nordstrom P.A., Roy S., Vaillancourt J.P. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem*; 272: 17907-17911.
- Torcia M., De chiara G., Mencioni L., Ammendola S., Labardi D., 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. and Shimizu S. (2000). Bcl-2 family: life or death switch. *FEBS Lett*; 466: 6-10.
- Tsujimoto Y., Gorham J., Jaffe E., Croce C.M. (1985). The t (14:18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistake in VDJ joining. *Science*; 229: 1390-1393.
- Tsurata F.J., Sunayama Y., Mori S., Hottori S., Shimizu Y., Tsujimoto K., Yoshioka N., Masuyama and Gotoh Y. (2004). JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO. J*; 23: 1889-1899.
- Ucker D.S., Obermiller P.S., Eckhart W., Apgar J.R., Berger N.A., Meyers J. (1992). Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol*; 12: 3060-3069.
- Uren A.G., Pakusch M., Hawkins C.J., Plus K.L., Vaux D.L. (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homolog that function to inhibit apoptosis and/or bind



- tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93: 4974-8.
- Van loo G., Van Gorp M., Depuydt B., Srinivasula S.M., Rodriguez I., Alnemri E.S., Gevaert K., Vandekerckhove J., Declerc W., Vandennebeele P. (2002). The protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase inhibitor XIAP and induced enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*; 9: 20-6.
  - Vander Heiden 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 [see comments]. *Cell*; 91: 627-637.
  - Varfolomeev E.E., Schuchmann M., Luria V., Chiannikulchai N., Beckman J.S., Melt 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, DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*; 9: 267-76.
  - Vaux D.L., Cory S., Adams J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*; 335: 440-442.
  - Veis D.J., Sorenson C.M., Shutter J.R., Korsmeyer S.J. (1993). Bcl-2 deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys and hypopigmented hair. *Cell*; 75: 229-240.
  - Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., 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.
  - Verhagen A.M., Silke J., Ekert P.G., Pakusch M., Kaufman H., Connolly L.M., Day C.L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and activity to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem*; 277: 445-454.
  - Walker N.P., Talanian R.V., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.Z., Ferez C.R., Franklin S., Chayur T., Hackett M.C., Hammill L.D. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell*; 78: 343-52.
  - Wang H.G., Miyashita T., Takayama S., Sato T., Torigoe T., Krajewski S., Tanaka S., Hovey L., Troppmair Z., Rapp U.R. (1994). Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase oncogene. *Cell*; 9: 2751-6.
  - Wang H.G., Pathan N., Ethell I.M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., Mckee F., Bobo T., Frank T.F., Reed J.C. (1999). Ca<sup>2+</sup> induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*; 284: 339-343.
  - Wang K., Yin X.M., Chao D.T., Millman C.L., Korsmeyer S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes. Dev*; 10: 2859-2869.
  - Wang S., Miura M., Jung Y. K., Zhu H., Li E., Yuan, J. (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 92, 501-9.
  - Wei M.C., Zeng W.X., Cheng E.H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J., Roth K.A., Mac Gregor R.G., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. (2001). Pro-apoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*; 292: 727-730.
  - Weil M., Raff M.C., Braga V.M. (1999). Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol*; 9: 361-364.
  - Wong G.H., Goeddel D.V. (1988). Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science*; 242: 941-944.
  - Woo M., Hakem R., Soengas M.S., Duncan G.S., Shahinian A., Kagi D., Hakem A., Curran M., Khoo W., Kaufmann S.A., Senaldi G., Haward 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.
  - Wood W., Turmaine M., Weber R., Camp V., Maki R.A., McKercher S.R., Martin P. (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1

- null mouse embryos. *Development*; 127: 5245-5252.
- Wu Y.C., Stanfield G.M., Horvitz H.R. (2000). NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Dev*; 14: 536-548.
  - Wyllie A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*; 284: 555-556.
  - 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., Jackel J., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promote 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.
  - Yonehara S., Ishii A., Yonehara M. (1989). A cell killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med*; 169: 1747-56.
  - Yu J., Zhang L., Huang 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 rotein similar to mammalian interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*; 75: 641-652.
  - Zhou Q., Snipas S., Orth K., Muzio M., Dixit V.M., Salvesen G.S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA analysis of five caspases. *J. Biol. Chem*; 272: 7797-800.
  - Zimmerman B., Mapoles J., Simon F. (1993). Mechanisms of acetaldehyde mediated growth inhibition: delayed cell cycle progression and induction of apoptosis (abstract). *Hepatology*; 18: 152A.
  - Zong W.X., Listen 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.
  - Zoratti M., Szabo I. (1994). Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomambr*; 26: 543-53.
  - Zou H., Henzel W.J., Liu X., 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: 405-413.
  - Zou H., Li Y., Liu X., Wang X. (1999). An Apaf-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem*; 274: 11549-11556.

**Nom et prénom :**

- BOUDJIRA Mounia.
- BOUSBARA Mounira.
- HAMADOUCHE F.Z.

**Les jurys :**

- Encadreur : Mr. KEBIECHE Mohamed.
- Examinatrice : M<sup>lle</sup> KEBSA Widad.

**Date de soutenance :**

21-06-2008.

**Thème : Apoptose: Etude biochimique, physiologique et pathologique.****Résumé :**

La mort cellulaire programmée, est un des processus par lesquels des cellules surnuméraires, dysfonctionnelles ou ectopiques, disparaissent de l'organisme. Alors qu'on savait dès le milieu du XIX siècle que la disparition d'une cellule ne résultait pas d'une simple incapacité de résister à l'usure du temps ou aux agressions de l'environnement, mais plutôt d'une capacité de se détruire en quelques heures, ce n'est que depuis moins de trente ans que la mort cellulaire a été considérée par les biologistes comme une fonction à part entière.

Cette mort constitue le contexte de cette étude qui présente les caractéristiques biochimiques, physiologiques et pathologiques de l'apoptose. En effet, beaucoup de connaissances concernant sa définition, ses mécanismes moléculaires d'induction, de décision et d'exécution, son importance dans le développement embryonnaire et la modélisation de notre corps ainsi son implication dans les processus pathologiques chez l'homme ont été bien revus et bien documentés dans ce mémoire.

**Les mots clés :** Apoptose, mécanismes moléculaires, apoptose physiologique, processus pathologiques, cellules dysfonctionnelles.

**Summary:**

Programmed cellular death, is one of the processes by which cells supernumerary, dysfunctionals or ectopics, disappear from the body. So we knew from the mid-nineteenth century that the disappearance of a cell did not result from one simple inability to resist the passage of time or the aggressions of the environment, but rather of a capacity to destroy itself in a few hours, it is not that since less than thirty years that cellular death was considered by biologists like a function with whole share.

This death constitutes context of this study which show the biochemical, physiological and pathological characteristics of apoptosis. Indeed, much of knowledge concerning its definition, its molecular mechanisms of induction, decision and execution, sound importance in the embryonic development and the modeling of our bodies and its involvement in humans disease processes have been well reviewed and well documented in this memory.

**Key words:** Apoptosis, molecular mechanisms, physiological apoptosis, diseases processes, dysfunctionals cells.

**المخلص :**

الموت الخلوي المبرمج هو إحدى الوسائل المسؤولة عن اختفاء الخلايا الزائدة، غير الوظيفية و المشوهة من الجسم. وقد كان معروفا منذ منتصف القرن التاسع عشر أن اختفاء خلية لم يكن نتيجة لعدم القدرة على مقاومة مرور الزمن أو الاعتداءات البيئية وإنما هو القدرة على التخرب في بضع ساعات ولم يعتبر علماء الأحياء إلا منذ ثلاثين سنة أن الموت الخلوي وظيفية في حد ذاتها . هذا الموت يشكل محور دراستنا التي توضح الخصائص البيوكيميائية ، الفيزيولوجية و المرضية للموت الخلوي المبرمج . الكثير من المعارف فيما يتعلق بتعريفه، آلياته الجزيئية من: تحفيز، تقرير وتنفيذ، أهميته في التطور الجنيني و تعديل تمفصل أجسامنا وكذلك مشاركته في العمليات المرضية للإنسان كانت محطة تمحيص و إحاطة في هذه المذكرة.

**الكلمات المفتاحية :** الموت الخلوي المبرمج، الميكانيزمات الجزيئية، الوظائف الخلوية للموت الخلوي المبرمج، الطرق المرضية، الخلايا غير الوظيفية.