

ANNEE: 2013

THESE N°:24

L' APOPTOSE
LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE

THESE

Présentée et soutenue publiquement le : 21 /03/2013

PAR

Mr. Omar Benkhai

Né le 31 Mai 1987 à Sidi Kacem

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES: apoptose, récepteur de mort, mitochondrie, caspase, cytométrie en flux.

JURY

Mr. Omar Chokairi

Professeur d'Histologie Embriologie

PRESIDENT

Mme. Saida Tallal

Professeur de Biochimie

RAPPORTEUR

Mme. Sakina El hamzaoui

Professeur de Bactériologie

Mme. Mona Nazjih

Professeur Agrégé d'Hématologie

JUGES

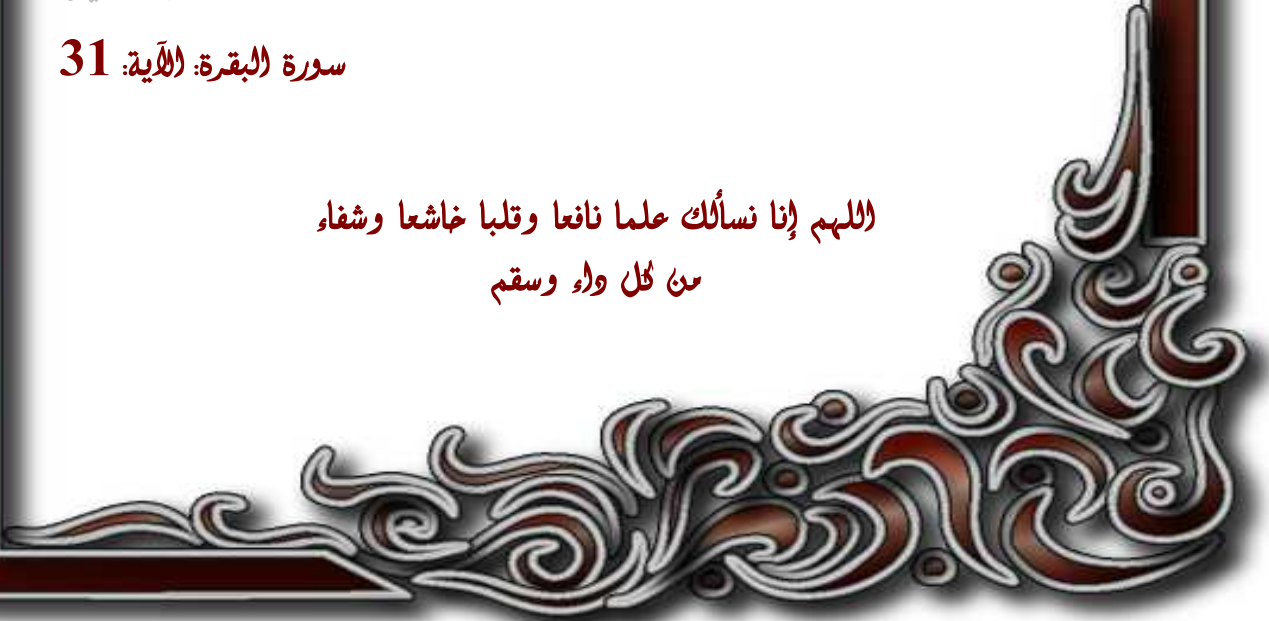
بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم الحكيم

اللَّهُ
صَلَّى
الْعَظِيمِ

سورة البقرة: الآية: 31

اللهم إنا نسألك علما نافعاً وقلبا خاشعاً وشفاءً
من كل واء وسقم





**UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

DOYENS HONORAIRES :

- 1962 – 1969 : Docteur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

- Doyen : Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines
Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Ali BENOMAR
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Février, Septembre, Décembre 1973

1. Pr. CHKILI Taieb Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

2. Pr. HASSAR Mohamed Pharmacologie Clinique

Mars, Avril et Septembre 1980

3. Pr. EL KHAMLICHI Abdeslam Neurochirurgie
4. Pr. MESBAHI Redouane Cardiologie

Mai et Octobre 1981

5. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid Cardiologie
6. Pr. EL MANOUAR Mohamed Traumatologie-Orthopédie
7. Pr. HAMANI Ahmed* Cardiologie
8. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
9. Pr. SBIHI Ahmed Anesthésie –Réanimation
10. Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

11. Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie
12. Pr. BENOMAR M'hammed Chirurgie-Cardio-Vasculaire

- | | | |
|-----|------------------------------|----------------------|
| 13. | Pr. BENSOUA Mohamed | Anatomie |
| 14. | Pr. BENOSMAN Abdellatif | Chirurgie Thoracique |
| 15. | Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma | Physiologie |

Novembre 1983

- | | | |
|-----|-------------------------------|--------------------|
| 16. | Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir* | Pneumo-ptisiologie |
| 17. | Pr. BALAFREJ Amina | Pédiatrie |
| 18. | Pr. BELLAKHDAR Fouad | Neurochirurgie |
| 19. | Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia | Rhumatologie |
| 20. | Pr. SRAIRI Jamal-Eddine | Cardiologie |

Décembre 1984

- | | | |
|-----|----------------------------------|-------------------------|
| 21. | Pr. BOUCETTA Mohamed* | Neurochirurgie |
| 22. | Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil | Radiothérapie |
| 23. | Pr. MAAOUNI Abdelaziz | Médecine Interne |
| 24. | Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi | Anesthésie -Réanimation |
| 25. | Pr. NAJIM' Barek * | Immuno-Hématologie |
| 26. | Pr. SETTAF Abdellatif | Chirurgie |

Novembre et Décembre 1985

- | | | |
|-----|---------------------------------------|---|
| 27. | Pr. BENJELLOUN Halima | Cardiologie |
| 28. | Pr. BENS Aid Younes | Pathologie Chirurgicale |
| 29. | Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa | Neurologie |
| 30. | Pr. IHRAI Hssain * | Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale |
| 31. | Pr. IRAQI Ghali | Pneumo-ptisiologie |
| 32. | Pr. KZADRI Mohamed | Oto-Rhino-laryngologie |

Janvier, Février et Décembre 1987

- | | | |
|-----|--------------------------------------|------------------------------|
| 33. | Pr. AJANA Ali | Radiologie |
| 34. | Pr. AMMAR Fanid | Pathologie Chirurgicale |
| 35. | Pr. CHAHED OUZZANI Houria ép.TAOBANE | Gastro-Entérologie |
| 36. | Pr. EL FASSY Fihri Mohamed Taoufiq | Pneumo-ptisiologie |
| 37. | Pr. EL HAITEM Naïma | Cardiologie |
| 38. | Pr. EL MANSOURI Abdellah* | Chimie-Toxicologie Expertise |
| 39. | Pr. EL YAACOUBI Moradh | Traumatologie Orthopédie |
| 40. | Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah | Gastro-Entérologie |
| 41. | Pr. LACHKAR Hassan | Médecine Interne |
| 42. | Pr. OHAYON Victor* | Médecine Interne |
| 43. | Pr. YAHYA OUI Mohamed | Neurologie |

Décembre 1988

- | | | |
|-----|---------------------------------|--------------------------|
| 44. | Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib | Chirurgie Pédiatrique |
| 45. | Pr. DAFIRI Rachida | Radiologie |
| 46. | Pr. FAIK Mohamed | Urologie |
| 47. | Pr. HERMAS Mohamed | Traumatologie Orthopédie |

48. Pr. TOLOUNE Farida*

Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

49. Pr. ADNAOUI Mohamed

Médecine Interne

50. Pr. AOUNI Mohamed

Médecine Interne

51. Pr. BENAMEUR Mohamed*

Radiologie

52. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali

Cardiologie

53. Pr. CHAD Bouziane

Pathologie Chirurgicale

54. Pr. CHKOFF Rachid

Pathologie Chirurgicale

55. Pr. FARCHADO Fouzia ép. BENABDELLAH

Pédiatrie

56. Pr. HACHIM Mohammed*

Médecine-Interne

57. Pr. HACHIMI Mohamed

Urologie

58. Pr. KHARBACH Aïcha

Gynécologie -Obstétrique

59. Pr. MANSOURI Fatima

Anatomie-Pathologique

60. Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Neurologie

61. Pr. SEDRATI Omar*

Dermatologie

62. Pr. TAZI Saoud Anas

Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

63. Pr. AL HAMANY Zaïtounia

Anatomie-Pathologique

64. Pr. ATMANI Mohamed*

Anesthésie Réanimation

65. Pr. AZZOUZI Abderrahim

Anesthésie Réanimation

66. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM

Néphrologie

67. Pr. BELKOUCHI Abdelkader

Chirurgie Générale

68. Pr. BENABDELLAH Chahrazad

Hématologie

69. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif

Chirurgie Générale

70. Pr. BENSOUA Yahia

Pharmacie galénique

71. Pr. BERRAHO Amina

Ophtalmologie

72. Pr. BEZZAD Rachid

Gynécologie Obstétrique

73. Pr. CHABRAOUI Layachi

Biochimie et Chimie

74. Pr. CHANA El Houssaine*

Ophtalmologie

75. Pr. CHERRAH Yahia

Pharmacologie

76. Pr. CHOKAIRI Omar

Histologie Embryologie

77. Pr. FAJRI Ahmed*

Psychiatrie

78. Pr. JANATI Idrissi Mohamed*

Chirurgie Générale

79. Pr. KHATTAB Mohamed

Pédiatrie

80. Pr. NEJMI Maati

Anesthésie-Réanimation

81. Pr. OUAALINE Mohammed*

Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène

82. Pr. SOULAYMANI Rachida ép. BENCHEIKH

Pharmacologie

83. Pr. TAOUFIK Jamal

Chimie thérapeutique

Décembre 1992

84. Pr. AHALLAT Mohamed

Chirurgie Générale

85. Pr. BENOUDA Amina

Microbiologie

86. Pr. BENSOUA Adil

Anesthésie Réanimation

- | | |
|---|-------------------------|
| 87. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib | Radiologie |
| 88. Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza | Gastro-Entérologie |
| 89. Pr. CHRAIBI Chafiq | Gynécologie Obstétrique |
| 90. Pr. DAOUDI Rajae | Ophtalmologie |
| 91. Pr. DEHAYNI Mohamed* | Gynécologie Obstétrique |
| 92. Pr. EL HADDOURY Mohamed | Anesthésie Réanimation |
| 93. Pr. EL OUAHABI Abdessamad | Neurochirurgie |
| 94. Pr. FELLAT Rokaya | Cardiologie |
| 95. Pr. GHAFIR Driss* | Médecine Interne |
| 96. Pr. JIDDANE Mohamed | Anatomie |
| 97. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine | Gynécologie Obstétrique |
| 98. Pr. TAGHY Ahmed | Chirurgie Générale |
| 99. Pr. ZOUHDI Mimoun | Microbiologie |

Mars 1994

- | | |
|--|---|
| 100. Pr. AGNAOU Lahcen | Ophtalmologie |
| 101. Pr. AL BAROUDI Saad | Chirurgie Générale |
| 102. Pr. BENCHERIFA Fatiha | Ophtalmologie |
| 103. Pr. BENJAAFAR Nouredine | Radiothérapie |
| 104. Pr. BENJELLOUN Samir | Chirurgie Générale |
| 105. Pr. BEN RAIS Nozha | Biophysique |
| 106. Pr. CAOUI Malika | Biophysique |
| 107. Pr. CHRAIBI Abdelmjid | Endocrinologie et Maladies Métaboliques |
| 108. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT | Gynécologie Obstétrique |
| 109. Pr. EL AOUAD Rajae | Immunologie |
| 110. Pr. EL BARDOUNI Ahmed | Traumato-Orthopédie |
| 111. Pr. EL HASSANI My Rachid | Radiologie |
| 112. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur | Médecine Interne |
| 113. Pr. EL KIRAT Abdelmajid* | Chirurgie Cardio- Vasculaire |
| 114. Pr. ERROUGANI Abdelkader | Chirurgie Générale |
| 115. Pr. ESSAKALI Malika | Immunologie |
| 116. Pr. ETTAYEBI Fouad | Chirurgie Pédiatrique |
| 117. Pr. HADRI Larbi* | Médecine Interne |
| 118. Pr. HASSAM Badredine | Dermatologie |
| 119. Pr. IFRINE Lahssan | Chirurgie Générale |
| 120. Pr. JELTHI Ahmed | Anatomie Pathologique |
| 121. Pr. MAHFOUD Mustapha | Traumatologie – Orthopédie |
| 122. Pr. MOUDENE Ahmed* | Traumatologie- Orthopédie |
| 123. Pr. OULBACHA Said | Chirurgie Générale |
| 124. Pr. RHRAB Brahim | Gynécologie –Obstétrique |
| 125. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR | Dermatologie |
| 126. Pr. SLAOUI Anas | Chirurgie Cardio-Vasculaire |

Mars 1994

127. Pr. ABBAR Mohamed*	Urologie
128. Pr. ABDELHAK M'barek	Chirurgie – Pédiatrique
129. Pr. BELAIDI Halima	Neurologie
130. Pr. BRAHMI Rida Slimane	Gynécologie Obstétrique
131. Pr. BENTAHILA Abdelali	Pédiatrie
132. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali	Gynécologie – Obstétrique
133. Pr. BERRADA Mohamed Saleh	Traumatologie – Orthopédie
134. Pr. CHAMI Ilham	Radiologie
135. Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae	Ophtalmologie
136. Pr. EL ABBADI Najia	Neurochirurgie
137. Pr. HANINE Ahmed*	Radiologie
138. Pr. JALIL Abdelouahed	Chirurgie Générale
139. Pr. LAKHDAR Amina	Gynécologie Obstétrique
140. Pr. MOUANE Nezha	Pédiatrie

Mars 1995

141. Pr. ABOUQUAL Redouane	Réanimation Médicale
142. Pr. AMRAOUI Mohamed	Chirurgie Générale
143. Pr. BAIDADA Abdelaziz	Gynécologie Obstétrique
144. Pr. BARGACH Samir	Gynécologie Obstétrique
145. Pr. BEDDOUCHE Amoqrane*	Urologie
146. Pr. BENZAOUZ Mustapha	Gastro-Entérologie
147. Pr. CHAARI Jilali*	Médecine Interne
148. Pr. DIMOU M'barek*	Anesthésie Réanimation
149. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*	Anesthésie Réanimation
150. Pr. EL MESNAOUI Abbes	Chirurgie Générale
151. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila	Oto-Rhino-Laryngologie
152. Pr. FERHATI Driss	Gynécologie Obstétrique
153. Pr. HASSOUNI Fadil	Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
154. Pr. HDA Abdelhamid*	Cardiologie
155. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed	Urologie
156. Pr. IBRAHIMY Wafaa	Ophtalmologie
157. Pr. MANSOURI Aziz	Radiothérapie
158. Pr. OUZZANI CHAHDI Bahia	Ophtalmologie
159. Pr. RZIN Abdelkader*	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
160. Pr. SEFIANI Abdelaziz	Génétique
161. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali	Réanimation Médicale

Décembre 1996

162. Pr. AMIL Touriya*	Radiologie
163. Pr. BELKACEM Rachid	Chirurgie Pédiatrie
164. Pr. BELMAHI Amin	Chirurgie réparatrice et plastique
165. Pr. BOULANOVAR Abdelkrim	Ophtalmologie
166. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan	Chirurgie Générale

167. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*	Parasitologie
168. Pr. GAOUZI Ahmed	Pédiatrie
169. Pr. MAHFOUDI M'barek*	Radiologie
170. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid	Chirurgie Générale
171. Pr. MOHAMMADI Mohamed	Médecine Interne
172. Pr. MOULINE Soumaya	Pneumo-ptisiologie
173. Pr. OUADGHIRI Mohamed	Traumatologie-Orthopédie
174. Pr. OUZEDDOUN Naima	Néphrologie
175. Pr. ZBIR EL Mehdi*	Cardiologie

Novembre 1997

176. Pr. ALAMI Mohamed Hassan	Gynécologie-Obstétrique
177. Pr. BEN AMAR Abdesselem	Chirurgie Générale
178. Pr. BEN SLIMANE Lounis	Urologie
179. Pr. BIROUK Nazha	Neurologie
180. Pr. BOULAICH Mohamed	O.RL.
181. Pr. CHAOUIR Souad*	Radiologie
182. Pr. DERRAZ Said	Neurochirurgie
183. Pr. ERREIMI Naima	Pédiatrie
184. Pr. FELLAT Nadia	Cardiologie
185. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra	Radiologie
186. Pr. HAIMEUR Charki*	Anesthésie Réanimation
187. Pr. KANOUNI NAWAL	Physiologie
188. Pr. KOUTANI Abdellatif	Urologie
189. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid	Chirurgie Générale
190. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ	Pédiatrie
191. Pr. NAZI M'barek*	Cardiologie
192. Pr. OUAHABI Hamid*	Neurologie
193. Pr. SAFI Lahcen*	Anesthésie Réanimation
194. Pr. TAOUFIQ Jallal	Psychiatrie
195. Pr. YOUSFI MALKI Mounia	Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

196. Pr. AFIFI RAJAA	Gastro-Entérologie
197. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*	Pneumo-ptisiologie
198. Pr. ALOUANE Mohammed*	Oto-Rhino-Laryngologie
199. Pr. BENOMAR ALI	Neurologie
200. Pr. BOUGTAB Abdesslam	Chirurgie Générale
201. Pr. ER RIHANI Hassan	Oncologie Médicale
202. Pr. EZZAITOUNI Fatima	Néphrologie
203. Pr. KABBAJ Najat	Radiologie
204. Pr. LAZRAK Khalid (M)	Traumatologie Orthopédie

Novembre 1998

205. Pr. BENKIRANE Majid*	Hématologie
---------------------------	-------------

206. Pr. KHATOURI ALI* Cardiologie
 207. Pr. LABRAIMI Ahmed* Anatomie Pathologique

Janvier 2000

208. Pr. ABID Ahmed* Pneumophtisiologie
 209. Pr. AIT OUMAR Hassan Pédiatrie
 210. Pr. BENCHERIF My Zahid Ophtalmologie
 211. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd Pédiatrie
 212. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine Pneumo-phtisiologie
 213. Pr. CHAOUI Zineb Ophtalmologie
 214. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer Chirurgie Générale
 215. Pr. ECHARRAB El Mahjoub Chirurgie Générale
 216. Pr. EL FTOUH Mustapha Pneumo-phtisiologie
 217. Pr. EL MOSTARCHID Brahim* Neurochirurgie
 218. Pr. EL OTMANY Azzedine Chirurgie Générale
 219. Pr. GHANNAM Rachid Cardiologie
 220. Pr. HAMMANI Lahcen Radiologie
 221. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim Anesthésie-Réanimation
 222. Pr. ISMAILI Hassane* Traumatologie Orthopédie
 223. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss Gastro-Entérologie
 224. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim* Anesthésie-Réanimation
 225. Pr. TACHINANTE Rajae Anesthésie-Réanimation
 226. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida Médecine Interne

Novembre 2000

227. Pr. AIDI Saadia Neurologie
 228. Pr. AIT OURHROUI Mohamed Dermatologie
 229. Pr. AJANA Fatima Zohra Gastro-Entérologie
 230. Pr. BENAMR Said Chirurgie Générale
 231. Pr. BENCHEKROUN Nabiha Ophtalmologie
 232. Pr. CHERTI Mohammed Cardiologie
 233. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma Anesthésie-Réanimation
 234. Pr. EL HASSANI Amine Pédiatrie
 235. Pr. EL IDGHIRI Hassan Oto-Rhino-Laryngologie
 236. Pr. EL KHADER Khalid Urologie
 237. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah* Rhumatologie
 238. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 239. Pr. HSSAIDA Rachid* Anesthésie-Réanimation
 240. Pr. LACHKAR Azzouz Urologie
 241. Pr. LAHLOU Abdou Traumatologie Orthopédie
 242. Pr. MAFTAH Mohamed* Neurochirurgie
 243. Pr. MAHASSINI Najat Anatomie Pathologique
 244. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae Pédiatrie
 245. Pr. NASSIH Mohamed* Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
 246. Pr. ROUIMI Abdelhadi Neurologie

Décembre 2001

247. Pr. ABABOU Adil	Anesthésie-Réanimation
248. Pr. AOUAD Aicha	Cardiologie
249. Pr. BALKHI Hicham*	Anesthésie-Réanimation
250. Pr. BELMEKKI Mohammed	Ophtalmologie
251. Pr. BENABDELJLIL Maria	Neurologie
252. Pr. BENAMAR Loubna	Néphrologie
253. Pr. BENAMOR Jouda	Pneumo-ptisiologie
254. Pr. BENELBARHDADI Imane	Gastro-Entérologie
255. Pr. BENNANI Rajae	Cardiologie
256. Pr. BENOUACHANE Thami	Pédiatrie
257. Pr. BENYOUSSEF Khalil	Dermatologie
258. Pr. BERRADA Rachid	Gynécologie Obstétrique
259. Pr. BEZZA Ahmed*	Rhumatologie
260. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi	Anatomie
261. Pr. BOUHOUCHE Rachida	Cardiologie
262. Pr. BOUMDIN El Hassane*	Radiologie
263. Pr. CHAT Latifa	Radiologie
264. Pr. CHELLAOUI Mounia	Radiologie
265. Pr. DAALI Mustapha*	Chirurgie Générale
266. Pr. DRISSI Sidi Mourad*	Radiologie
267. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira	Gynécologie Obstétrique
268. Pr. EL HIJRI Ahmed	Anesthésie-Réanimation
269. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid	Neuro-Chirurgie
270. Pr. EL MADHI Tarik	Chirurgie-Pédiatrique
271. Pr. EL MOUSSAIF Hamid	Ophtalmologie
272. Pr. EL OUNANI Mohamed	Chirurgie Générale
273. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil	Radiologie
274. Pr. ETTAIR Said	Pédiatrie
275. Pr. GAZZAZ Miloudi*	Neuro-Chirurgie
276. Pr. GOURINDA Hassan	Chirurgie-Pédiatrique
277. Pr. HRORA Abdelmalek	Chirurgie Générale
278. Pr. KABBAJ Saad	Anesthésie-Réanimation
279. Pr. KABIRI EL Hassane*	Chirurgie Thoracique
280. Pr. LAMRANI Moulay Omar	Traumatologie Orthopédie
281. Pr. LEKEHAL Brahim	Chirurgie Vasculaire Périphérique
282. Pr. MAHASSIN Fattouma*	Médecine Interne
283. Pr. MEDARHRI Jalil	Chirurgie Générale
284. Pr. MIKDAME Mohammed*	Hématologie Clinique
285. Pr. MOHSINE Raouf	Chirurgie Générale
286. Pr. NABIL Samira	Gynécologie Obstétrique
287. Pr. NOUINI Yassine	Urologie
288. Pr. OUALIM Zouhir*	Néphrologie
289. Pr. SABBAAH Farid	Chirurgie Générale
290. Pr. SEFIANI Yasser	Chirurgie Vasculaire Périphérique

291. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia Pédiatrie
 292. Pr. TAZI MOUKHA Karim Urologie

Décembre 2002

293. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane* Anatomie Pathologique
 294. Pr. AMEUR Ahmed * Urologie
 295. Pr. AMRI Rachida Cardiologie
 296. Pr. AOURARH Aziz* Gastro-Entérologie
 297. Pr. BAMOU Youssef * Biochimie-Chimie
 298. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene* Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 299. Pr. BENBOUAZZA Karima Rhumatologie
 300. Pr. BENZEKRI Laila Dermatologie
 301. Pr. BENZZOUBEIR Nadia* Gastro-Entérologie
 302. Pr. BERNOUSSI Zakiya Anatomie Pathologique
 303. Pr. BICHA Mohamed Zakariya Psychiatrie
 304. Pr. CHOHO Abdelkrim * Chirurgie Générale
 305. Pr. CHKIRATE Bouchra Pédiatrie
 306. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair Chirurgie Pédiatrique
 307. Pr. EL ALJ Haj Ahmed Urologie
 308. Pr. EL BARNOUSSI Leila Gynécologie Obstétrique
 309. Pr. EL HAOURI Mohamed * Dermatologie
 310. Pr. EL MANSARI Omar* Chirurgie Générale
 311. Pr. ES-SADEL Abdelhamid Chirurgie Générale
 312. Pr. FILALI ADIB Abdelhai Gynécologie Obstétrique
 313. Pr. HADDOUR Leila Cardiologie
 314. Pr. HAJJI Zakia Ophtalmologie
 315. Pr. IKEN Ali Urologie
 316. Pr. ISMAEL Farid Traumatologie Orthopédie
 317. Pr. JAAFAR Abdeloihab* Traumatologie Orthopédie
 318. Pr. KRIOULE Yamina Pédiatrie
 319. Pr. LAGHMARI Mina Ophtalmologie
 320. Pr. MABROUK Hfid* Traumatologie Orthopédie
 321. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss* Gynécologie Obstétrique
 322. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid* Cardiologie
 323. Pr. MOUSTAINE My Rachid Traumatologie Orthopédie
 324. Pr. NAITLHO Abdelhamid* Médecine Interne
 325. Pr. OUJILAL Abdelilah Oto-Rhino-Laryngologie
 326. Pr. RACHID Khalid * Traumatologie Orthopédie
 327. Pr. RAISS Mohamed Chirurgie Générale
 328. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha* Pneumophtisiologie
 329. Pr. RHOU Hakima Néphrologie
 330. Pr. SIAH Samir * Anesthésie Réanimation
 331. Pr. THIMOU Amal Pédiatrie
 332. Pr. ZENTAR Aziz* Chirurgie Générale
 333. Pr. ZRARA Ibtisam* Anatomie Pathologique

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

334. Pr. ABDELLAH El Hassan	Ophtalmologie
335. Pr. AMRANI Mariam	Anatomie Pathologique
336. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas	Oto-Rhino-Laryngologie
337. Pr. BENKIRANE Ahmed*	Gastro-Entérologie
338. Pr. BENRAMDANE Larbi*	Chimie Analytique
339. Pr. BOUGHALEM Mohamed*	Anesthésie Réanimation
340. Pr. BOULAADAS Malik	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
341. Pr. BOURAZZA Ahmed*	Neurologie
342. Pr. CHAGAR Belkacem*	Traumatologie Orthopédie
343. Pr. CHERRADI Nadia	Anatomie Pathologique
344. Pr. EL FENNI Jamal*	Radiologie
345. Pr. EL HANCHI ZAKI	Gynécologie Obstétrique
346. Pr. EL KHORASSANI Mohamed	Pédiatrie
347. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*	Cardiologie
348. Pr. HACHI Hafid	Chirurgie Générale
349. Pr. JABOUIRIK Fatima	Pédiatrie
350. Pr. KARMANE Abdelouahed	Ophtalmologie
351. Pr. KHABOUZE Samira	Gynécologie Obstétrique
352. Pr. KHARMAZ Mohamed	Traumatologie Orthopédie
353. Pr. LEZREK Mohammed*	Urologie
354. Pr. MOUGHIL Said	Chirurgie Cardio-Vasculaire
355. Pr. NAOUMI Asmae*	Ophtalmologie
356. Pr. SAADI Nozha	Gynécologie Obstétrique
357. Pr. SASSENOU ISMAIL*	Gastro-Entérologie
358. Pr. TARIB Abdelilah*	Pharmacie Clinique
359. Pr. TIJAMI Fouad	Chirurgie Générale
360. Pr. ZARZUR Jamila	Cardiologie

Janvier 2005

361. Pr. ABBASSI Abdellah	Chirurgie Réparatrice et Plastique
362. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*	Chirurgie Générale
363. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid	Microbiologie
364. Pr. ALLALI Fadoua	Rhumatologie
365. Pr. AMAR Yamama	Néphrologie
366. Pr. AMAZOUZI Abdellah	Ophtalmologie
367. Pr. AZIZ Noureddine*	Radiologie
368. Pr. BAHIRI Rachid	Rhumatologie
369. Pr. BARKAT Amina	Pédiatrie
370. Pr. BENHALIMA Hanane	Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
371. Pr. BENHARBIT Mohamed	Ophtalmologie
372. Pr. BENYASS Aatif	Cardiologie
373. Pr. BERNOUSSI Abdelghani	Ophtalmologie

374. Pr. BOUKLATA Salwa	Radiologie
375. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed	Ophtalmologie
376. Pr. DOUDOUH Abderrahim*	Biophysique
377. Pr. EL HAMZAoui Sakina	Microbiologie
378. Pr. HAJJI Leila	Cardiologie
379. Pr. HESSISSEN Leila	Pédiatrie
380. Pr. JIDAL Mohamed*	Radiologie
381. Pr. KARIM Abdelouahed	Ophtalmologie
382. Pr. KENDOOUSSI Mohamed*	Cardiologie
383. Pr. LAAROUSSI Mohamed	Chirurgie Cardio-vasculaire
384. Pr. LYAGOUBI Mohammed	Parasitologie
385. Pr. NIAMANE Radouane*	Rhumatologie
386. Pr. RAGALA Abdelhak	Gynécologie Obstétrique
387. Pr. SBIHI Souad	Histo-Embryologie Cytogénétique
388. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam	Ophtalmologie
389. Pr. ZERAIDI Najia	Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*	Rhumatologie
424. Pr. AFIFI Yasser	Dermatologie
425. Pr. AKJOUJ Said*	Radiologie
426. Pr. BELGNAoui Fatima Zahra	Dermatologie
427 Pr. BELMEKKI Abdelkader*	Hématologie
428. Pr. BENCHEIKH Razika	O.R.L
429 Pr. BIYI Abdelhamid*	Biophysique
430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine	Chirurgie - Pédiatrique
431. Pr. BOULAHYA Abdellatif*	Chirurgie Cardio – Vasculaire
432. Pr. CHEIKHAoui Younes	Chirurgie Cardio – Vasculaire
433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas	Gynécologie Obstétrique
434. Pr. DOGHMI Nawal	Cardiologie
435. Pr. ESSAMRI Wafaa	Gastro-entérologie
436. Pr. FELLAT Ibtissam	Cardiologie
437. Pr. FAROUDY Mamoun	Anesthésie Réanimation
438. Pr. GHADOUANE Mohammed*	Urologie
439. Pr. HARMOUCHE Hicham	Médecine Interne
440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed*	Anesthésie Réanimation
441 Pr. IDRIS LAHLOU Amine	Microbiologie
442. Pr. JROUNDI Laila	Radiologie
443. Pr. KARMOUNI Tariq	Urologie
444. Pr. KILI Amina	Pédiatrie
445. Pr. KISRA Hassan	Psychiatrie
446. Pr. KISRA Mounir	Chirurgie – Pédiatrique
447. Pr. KHARCHAFI Aziz*	Médecine Interne
448.Pr. LAATIRIS Abdelkader*	Pharmacie Galénique

449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*
 450. Pr. MANSOURI Hamid*
 451. Pr. NAZIH Naoual
 452. Pr. OUANASS Abderrazzak
 453. Pr. SAFI Soumaya*
 454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra
 455. Pr. SEFIANI Sana
 456. Pr. SOUALHI Mouna
 457. Pr. TELLAL Saida*
 458. Pr. ZAHRAOUI Rachida

Parasitologie
 Radiothérapie
 O.R.L
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Anatomie Pathologique
 Pneumo – Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila
 459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
 461. Pr. LALAOUI SALIM Jaafar *
 462. Pr. BAITE Abdelouahed *
 463. Pr. TOUATI Zakia
 464. Pr. OUZZIF Ez zohra*
 465. Pr. BALOUCH Lhousaine *
 466. Pr. SELKANE Chakir *
 467. Pr. EL BEKKALI Youssef *
 468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *
 469. Pr. EL ABSI Mohamed
 470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
 471. Pr. ACHOUR Abdessamad*
 472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 473. Pr. GHARIB Noureddine
 474. Pr. TABERKANET Mustafa *
 475. Pr. ISMAILI Nadia
 476. Pr. MASRAR Azlarab
 477. Pr. RABHI Monsef *
 478. Pr. MRABET Mustapha *
 479. Pr. SEKHSOKH Yessine *
 480. Pr. SEFFAR Myriame
 481. Pr. LOUZI Lhousain *
 482. Pr. MRANI Saad *
 483. Pr. GANA Rachid
 484. Pr. ICHOU Mohamed *
 485. Pr. TACHFOUTI Samira
 486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 487. Pr. MELLAL Zakaria
 488. Pr. AMMAR Haddou *
 489. Pr. AOUIFI Sarra

Anatomie pathologique
 Anesthésie réanimation
 Anesthésier réanimation
 Anesthésie réanimation
 Anesthésie réanimation
 Cardiologie
 Biochimie
 Biochimie
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie plastique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Dermatologie
 Hématologie biologique
 Médecine interne
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Virologie
 Neuro chirurgie
 Oncologie médicale
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 ORL
 Parasitologie

490. Pr. TLIGUI Houssain	Parasitologie
491. Pr. MOUTAJ Redouane *	Parasitologie
492. Pr. ACHACHI Leila	Pneumo phtisiologie
493. Pr. MARC Karima	Pneumo phtisiologie
494. Pr. BENZIANE Hamid *	Pharmacie clinique
495. Pr. CHERKAOUI Naoual *	Pharmacie galénique
496. Pr. EL OMARI Fatima	Psychiatrie
497. Pr. MAHI Mohamed *	Radiologie
498. Pr. RADOUANE Bouchaib*	Radiologie
499. Pr. KEBDANI Tayeb	Radiothérapie
500. Pr. SIFAT Hassan *	Radiothérapie
501. Pr. HADADI Khalid *	Radiothérapie
502. Pr. ABIDI Khalid	Réanimation médicale
503. Pr. MADANI Naoufel	Réanimation médicale
504. Pr. TANANE Mansour *	Traumatologie orthopédie
505. Pr. AMHAJJI Larbi *	Traumatologie orthopédie

Mars 2009

Pr. BJIJOU Younes	Anatomie
Pr. AZENDOUR Hicham *	Anesthésie Réanimation
Pr. BELYAMANI Lahcen*	Anesthésie Réanimation
Pr. BOUHSAIN Sanae *	Biochimie
Pr. OUKERRAJ Latifa	Cardiologie
Pr. LAMSAOURI Jamal *	Chimie Thérapeutique
Pr. MARMADE Lahcen	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. AMAHZOUNE Brahim*	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. AIT ALI Abdelmounaim *	Chirurgie Générale
Pr. BOUNAIM Ahmed *	Chirurgie Générale
Pr. EL MALKI Hadj Omar	Chirurgie Générale
Pr. MSSROURI Rahal	Chirurgie Générale
Pr. CHTATA Hassan Toufik *	Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pr. BOUI Mohammed *	Dermatologie
Pr. KABBAJ Nawal	Gastro-entérologie
Pr. FATHI Khalid	Gynécologie obstétrique
Pr. MESSAOUDI Nezha *	Hématologie biologique
Pr. CHAKOUR Mohammed *	Hématologie biologique
Pr. DOGHMI Kamal*	Hématologie clinique
Pr. ABOUZAHIR Ali*	Médecine interne
Pr. ENNIBI Khalid *	Médecine interne
Pr. EL OUENNASS Mostapha	Microbiologie
Pr. ZOUHAIR Said*	Microbiologie
Pr. L'kassimi Hachemi*	Microbiologie
Pr. AKHADDAR Ali*	Neuro-chirurgie
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia	Neurologie

Pr. AGADR Aomar *	Pédiatrie
Pr. KARBOUBI Lamyia	Pédiatrie
Pr. MESKINI Toufik	Pédiatrie
Pr. KABIRI Meryem	Pédiatrie
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *	Pneumo-phtisiologie
Pr. BASSOU Driss *	Radiologie
Pr. ALLALI Nazik	Radiologie
Pr. NASSAR Ittimade	Radiologie
Pr. HASSIKOU Hasna *	Rhumatologie
Pr. AMINE Bouchra	Rhumatologie
Pr. BOUSSOUGA Mostapha *	Traumatologie orthopédique
Pr. KADI Said *	Traumatologie orthopédique

Octobre 2010

Pr. AMEZIANE Taoufiq*	Médecine interne
Pr. ERRABIH Ikram	Gastro entérologie
Pr. CHERRADI Ghizlan	Cardiologie
Pr. MOSADIK Ahlam	Anesthésie Réanimation
Pr. ALILOU Mustapha	Anesthésie réanimation
Pr. KANOUNI Lamyia	Radiothérapie
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*	Radiologie
Pr. DARBI Abdellatif*	Radiologie
Pr. EL HAFIDI Naima	Pédiatrie
Pr. MALIH Mohamed*	Pédiatrie
Pr. BOUSSIF Mohamed*	Médecine aérologique
Pr. EL MAZOUZ Samir	Chirurgie plastique et réparatrice
Pr. DENDANE Mohammed Anouar	Chirurgie pédiatrique
Pr. EL SAYEGH Hachem	Urologie
Pr. MOUJAHID Mountassir*	Chirurgie générale
Pr. RAISSOUNI Zakaria*	Traumatologie orthopédie
Pr. BOUAITY Brahim*	ORL
Pr. LEZREK Mounir	Ophtalmologie
Pr. NAZIH Mouna*	Hématologie
Pr. LAMALMI Najat	Anatomie pathologique
Pr. ZOUAIDIA Fouad	Anatomie pathologique
Pr. BELAGUID Abdelaziz	Physiologie
Pr. DAMI Abdellah*	Biochimie chimie
Pr. CHADLI Mariama*	Microbiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

1.	Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
2.	Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie
3.	Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
4.	Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
5.	Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
6.	Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
7.	Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
8.	Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
9.	Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie
10.	Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
11.	Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
12.	Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
13.	Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootecnie
14.	Pr. FAOUZI Moulay El Abbès	Pharmacologie
15.	Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
16.	Pr. IBRAHIMI Azeddine	
17.	Pr. KABBAJ Ouafae	Biochimie
18.	Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
19.	Pr. REDHA Ahlam	Biochimie
20.	Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
21.	Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
22.	Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
23.	Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

** Enseignants Militaires*



Dédicaces

A Mes très chers parents

Je reviens à mes années d'études où vous ne cessiez de m'apporter le soutien nécessaire, de m'offrir les conditions adéquates pour réussir mon parcours, et de me faire ressentir l'affection parentale.

Aucun merci ne saurait exprimer mon amour, et ma forte reconnaissance!

Vous faites certainement partie de ce travail!

Que Dieu vous protège!

A Ma cher sœur Zineb

*En témoignage de toute l'affection et des profonds sentiments fraternels
que je vous porte et de l'attachement qui nous unit.*

Je vous souhaite du bonheur et du succès dans toute votre vie.

A tous mes proches ;

*Je le dédie particulièrement à la mémoire de ma grand-mère MINA et Lwadhha
, Mon oncle Mohammed , Allal , Abde el Karim, aussi Abde el Rahim, Hamid
et Mohammed ainsi que mes tantes Fatima ,Halima ,Khadija Fatiha ,Rachida
Saadia ,Nezha et latifa ,et toutes la famille Benkhai et Mrid .*

*Je le dédie aussi à tous mes, cousins et cousines, particulièrement la famille
Benkhai , Mrid , Mossedak Boukhriss et Abidar.*

*Et mes amis, Marouane chakiri, Mountassir bouayta , Nabil delbouha,
Abdelhamid benazzouz ,Fayssal benssassi, Imad belkhadir ,Anouar allali
,Ahmed abbairou Moussa dihi ,Adil bekkal ,Meriam bouich,Meriam sadki...*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou
de loin à la réalisation de ce travail.*



Remerciements

A Notre Maître et président de thèse
Monsieur Le Professeur Omar Chokairi
Professeur d'Histologie Embriologie

C'est tout à notre honneur que vous soyez le Président du jury de cette thèse.

Votre aptitude intellectuelle, votre compétence professionnelle, ainsi que votre modestie, ont bien marqué notre parcours.

Nous gardons de vous un souvenir d'un enseignant remarquable par sa modestie, sa rigueur, et son sérieux dans l'exercice de sa profession.

A travers cette dédicace, nous espérons vivement pouvoir exprimer nos respects les plus profonds, ainsi que notre vive reconnaissance.

A Notre Maître et rapporteur de thèse Madame

Le Professeur Saida Tallal

Professeur de biochimie

Nous vous remercions de nous faire avoir fait l'honneur de nous confier ce travail.

Acceptez, cher maître, l'hommage de notre gratitude qui, si grande qu'elle puisse être, ne sera jamais à la hauteur de votre dévouement.

Vos qualités humaines et vos compétences forment un tout que nous avons toujours apprécié au cours de nos études.

Nous voudrions vous transmettre, à travers cette dédicace, l'expression de nos respects les plus dévoués.

A Notre Maître et Juge de Thèse

Madame Sakina El hamzaoui

Professeur de Bacteriologie

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous accordiez en acceptant de juger notre thèse.

Votre compétence et votre dynamisme ont suscité en nous une grande admiration et sont pour vos élèves un exemple à suivre.

Veillez agréer, Madame, l'expression de nos respects les plus distingués.

A Notre Maître et juge de thèse Madame

Le Professeur Mona Nazih

Professeur agrégé D'Hématologie Biologie

Nous vous remercions pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger cette thèse.

Vous nous faites un très bon exemple à suivre par vos compétences et vos qualités morales.

Nous vous prions de recevoir ici l'expression de nos respects les plus considérables.



Sommaire



Première partie : L'apoptose : concepts fondamentaux

A- Historique.....	4
B- Définition.....	5
1- Apoptose.....	5
2- Nécrose.....	7
3- Autophagie.....	7
4- Rôle physiologie de l'apoptose.....	9

Deuxième partie : Les mécanismes inducteurs de l'apoptose

A- Les caspases.....	14
B- La voie extrinsèque.....	16
C- La voie intrinsèque.....	18
D- La voie du réticulum endoplasmique.....	20
E- Rôle du calcium dans la signalisation apoptotique.....	22

Troisième partie : Les régulateurs d'apoptose

A- La famille bcl-2.....	26
B- Les IAP (inhibitors of apoptosis protein).....	30

Quatrième partie : Les méthodes de mise en évidence d'apoptose in vitro

A-Analyse morphologique par microscopies optique, électronique et fluorescence	33
1-Microscopie optique et colorants d'exclusion.....	35
2- Analyse des brins d'ADN par microscopie à fluorescence.....	36
2.1 Méthode " TUNEL"	36
2.2 Méthode " DAPI"	38
3- Visualisation de la chromatine et des corps apoptotiques par microscopie à fluorescence (AO/PI).....	40
B- Analyse de l'ADN et des protéines par électrophorèse.....	40
1- Analyse des brins d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.....	40
2-Identification des endonucléases mises en jeu dans la fragmentation d'ADN	42
3-Analyse de l'activation de l'apoptose par western-blot.....	42
C- Mesure de l'activité de LDH par méthode enzymatique colorimétrique	44
D- Viabilité cellulaire par méthode colorimétrique au MTT.....	45
E- Analyse par cytométrie en flux :.....	46

1- Principe de fonctionnement.....	48
2- Analyse morphologique : Laser scanning cytometer (LSC).....	51
3- Analyse des fonctions cellulaires par fluorescence.....	54
3.1 Modification au niveau de la membrane plasmique	56
3.1.1 Modification de la perméabilité.....	56
3.1.2 Perte de l'asymétrie de phospholipidique.....	57
3.2 Perte du potentiel mitochondrial.....	60
3.3 Condensation de la chromatine.....	63
3.4 Microfilaments d'actine.....	65
3.5 Calcium cellulaire.....	65
3.6 Activités caspasiques.....	66
3.6.1 Méthodes des substrats fluorimétriques.....	68
3.6.2 Méthodes des anticorps fluorescents.....	69
3.6.3 Méthodes colorimétriques : spectrophotométrie.....	71

Cinquième partie : L'apoptose en pathologies

A- Apoptose et maladies auto-immunes.....	74
B- Apoptose et cancer.....	75
C- Apoptose et maladies virales.....	77
1. Stratégies virales de régulation de la voie des récepteurs de mort	78
a) Inhibition de la voie des récepteurs de mort.....	78
b) Induction de la voie des récepteurs de mort.....	80
D- Apoptose et maladie neurodégénératives.....	87
1. Maladies d'Alzheimer.....	87
2. Maladie de Parkinson.....	88
3. Maladie de Huntington.....	89
4. Ischémie cérébrale.....	91
Conclusion.....	94

Résumé

Référence

ABBREVIATIONS

- 7-AMD** : 7- actinomycine
- ADN** : Acide desoxyribonucléique
- AIF** : Apoptosis inducing factor
- ALPS** : Syndrome de lymphoproliferation auto-immune non malin
- AO** : Acridine orange
- Apaf1** : Apoptotic protease-activating factor-1
- Apo** : Apoprotéine
- ATF6** : Activating Transcription Factor
- AZT** : 3' azido-2',3'-deoxythymidine
- Bad** : Bcl-XL/bcl-2 associated death promoter homolog
- Bak** : Bcl-2 homologous antagonist/killer
- Bak-like** : Bcl-2 homologous antagonist/killer like
- Bax** : Bcl-2 associated X protein
- Bcl-2** : B-cell lymphoma-2
- BclxL** : longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein from avian
- BH** : Bcl-2 homology
- Bid** : BH3 interacting death domain agonist
- Bim** : Bcl-2 interacting mediator of cell death
- BIR** : Baculovirus IAP repeat
- Caspase** : Protéinases cystéine-aspartate dépendantes

CCCP : carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CHO : Chinese hamster ovary
CHOP : CCAAT/enhancer binding protein Homologous Protein
CMX-Ros : La chlorométhyl-X-rosamine
CrmA : Cytokine response modifier A
DA : Dopamine
DAPI : 4'-6-diaminido-2-phenylindole
DD : Death Domain
DED : Death Effector Domain
DED : Death effector domain
Diablo : Direct IAP binding protein and low pI
DISC : Death-inducing signaling domains DED complex
DR : Death Receptor
EB : bromure d'éthidium
EBV : Le virus Epstein-Barr
Endo G : endonucléase G
FADD : Fas-associated death domain
Fas : Fibroblast associated
FasL : Fas Ligand
FDA : diacétate de fluorescéine
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
FLICE : FADD-homologous ICE-Like protease
FLIP : FLICE Inhibitory Proteins

Fmk : fluorométhylketone
FSC : Forward SCatter
HHV : virus herpes humain
HtrA2 : High temperature requirement protein A2
IAP : Protéines inhibitrices de l'apoptose (Inhibitor of apoptosis protein)
IFN γ : Interféron alpha γ
IL : Interleukin
IRE1 : Inositol Requiring 1
JNK : cJun N-terminal Kinase
Jurkat : Cell line derived from human T-CELL LEUKEMIA
LDH : lactate déshydrogénase
Le DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorate
LSC : Laser scanning cytometer
MA : maladie d'Alzheimer MA
Mcl-1 : ML-1 human myeloid leukemia cell line
MH : maladie de Huntington
MP : Maladie de Parkinson
MPTP : 1,2,3,6-méthyl-phényl-tétrahydropyridine
MTT : 3-[4,5-(diméthylthiazol-2-yl)]- 2,5-diphényltétrazolium bromide
NaBu : Butyrate de sodium
NAC : N-acétylcystéine
NAC : N-acétylcystéine
NAIP : neuronal apoptosis IAP

NGF : nerve growth factor

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

PARP : poly ADP ribose polymérase

PERK : PKR like Endoplasmic Reticulum Kinase

PI : iodure de propidium

PMT : photomultiplicateur

PR : phycoérythrine-R

PS : phosphatidylsérine

PTP : Permeability Transition Pore

Puma : p53 upregulated modulator of apoptosis

RE : reticulum endoplasmique

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Smac : Second mitochondria-derived activator of caspase

SSC : Side SCatter

TdT : terminal desoxynucléotidyl transférase

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

TRADD : TNF-R associated protein with DD

TRAF2 : TNF-Receptor Associated Factor

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

TUNEL : Terminal deoxynucleodityl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling

UPR : Unfolding Protein Response

vFLIPs : FLIP virales

VHC : virus de l'hépatite C

z-AEVD-fmk : Benzyloxycarbonyl-AEVD-fluoromethylketone

z-VAD-fmk : Benzyloxycarbonyl Valyl-Alanyl-Aspartyl-(O-methyl)-
fluoromethylketone

β A : β -amyloïde



Liste des figures



Figure 1 : Caractéristiques du processus de mort cellulaire par apoptose et nécrose.

Figure 2 : Schéma présentant les bases morphologiques de l'autophagie

Figure 3 : morphologie d'une cellule normal (a), autophagique (b) apoptotique (c) et nécrotique (d).

Figure 4 : Voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque

Figure 5 : classification des caspases

Figure 6: activation des caspases effectrices

Figure 7 : Voies de signalisation par les récepteurs à domaine de mort.

Figure 8 : formation d'apoptosome et activation du procaspase 9

Figure 9: l'apoptose mitochondrial

Figure 10 : régulation de l'homéostasie calcique

Figure 11 : les domaines de la famille bcl-2

Figure 12: modèles d'activation de Bax et Bak

Figure 13.les membres de la famille IAP

Figure 14 : Les cibles et les régulateurs de l'IAP

Figure 15: Principe du test TUNEL-fluoresceine-dUTP

Figure 16 : Observation de la fragmentation de l'ADN à l'aide de la méthode enzymatique TUNEL

Figure 17 : visualisation des cellules apoptotique par DAPI

Figure 18: Fragmentation internucléosomale

Figure 19 : Fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose

Figure 20 : Electrophorèse Caspase-3

Figure 21 : Electrophorèse Cytochrome-c

Figure 22 : Principe du dosage de la LDH

Figure 23 : Principe de la méthode colorimétrique au MTT

Figure 24 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux

Figure 25 : Incidence de la lumière sur la cellule

Figure 26: Analyse morphologique : Laser Scanning Cytometer (LSC)

Figure 27 : Représentation schématique de la perte d'asymétrie de la membrane plasmique durant l'apoptose et du test à l'annexine V

Figure 28 : Principe du test à l'Annexine V

Figure 29 : Analyse PI/Annexine V-FITC de cellules de thymocytes de rat

Figure 30 : Marquage de cellules MR65 cultivées en présence de 200µM d'olomoucine, inducteur de l'apoptose

Figure 31 : Double marquage Rhodamine 123 /PI

Figure 32 : Principe du marquage JC-1

Figure 33 : Marquage au DiOC2(3) de cellules Jurkat

Figure 34 : Variation du potentiel mitochondrial

Figure 35 : Marquage Hoechst /PI

Figure 36 : Principe des méthodes fluorimétrique et colorimétrique

Figure 37 : Action des caspases sur les substrats bisamides de type Z-DEVD-R110

Figure 38 : Activation de la caspase-3 par la daunorubicine suivie par cytométrie en flux

Figure 39 : Activation de la caspase-3 liée à la modification d'exposition de la phosphatidylsérine

Figure 40: Les voies apoptotiques régulées par p53.



Liste des tableaux



Tableau I : Critères morphologiques pour l'identification des cellules apoptotiques et nécrotiques

Tableau II : Caractéristiques des sous-populations de cellules en microscopie à fluorescence AO/PI

Tableau III : Tableau 7 : Informations données par la cytométrie en flux]

Tableau IV : Exemple de substrats fluorescents des caspases

Tableau V : Virus ADN inhibant l'apoptose.

Tableau VI : Virus ADN inhibant l'apoptose.

Tableau VI : Virus ARN inhibant l'apoptose.



Introduction



Le développement harmonieux et la survie de tout organisme multicellulaire résultent d'un contrôle précis du nombre de cellules qui le composent grâce à un équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire. Toutes les cellules ont la capacité de se détruire en activant des programmes physiologiques spécifiques dont l'exécution aboutit à une forme de mort cellulaire (apoptose, nécrose, ou autophagie).

L'apoptose est un processus important qui joue un rôle déterminant en physiologie dans l'embryogenèse, la métamorphose, l'homéostasie cellulaire, la réparation des tissus et dans la régression des tumeurs etc...

Cependant, le dérèglement pathologique du processus d'apoptose ou de son contrôle est à l'origine de nombreuses maladies comme les cancers, certains désordres immuns, les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson), le SIDA (disparition des lymphocytes T CD4+).

Les objectifs de notre travail sont :

- Décrire le phénomène d'apoptose.
- Mettre en évidence sa différence avec les autres types de mort cellulaire.
- Elucider les mécanismes physiopathologiques intervenant dans ce phénomène.
- Préciser les relations avec les différentes pathologies.



Première partie :

*L'apoptose : Concepts
fondamentaux*



A. Historique

Le mot apoptose provient d'une locution grecque signifiant "chute des feuilles" et était déjà utilisée par Hippocrate de Kos (460-377 av. J.C.) pour décrire la décomposition post-mortem des corps ("chute des os"). [1]

L'intérêt accordé à l'étude du processus de mort cellulaire date de plus d'un siècle. En 1842, le naturaliste Carl Vogt décrit pour la première fois un processus de mort cellulaire en observant la mort des cellules notochordales et cartilagineuses au cours du développement embryonnaire. En 1885, Walter Flemming décrit la fragmentation et la disparition progressive des noyaux et cytoplasmes de cellules épithéliales de follicules ovariens en régression.

En 1951, Alfred Glucksmann émet l'hypothèse que cette "mort cellulaire" programmée se produirait à des moments bien précis du développement d'un organisme [2].

C'est en 1972 que John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Curie introduisent le mot "apoptose" pour désigner un modèle de mort cellulaire nouvellement observé, en opposition au modèle de la nécrose déjà connu à l'époque. [3] Alors que la nécrose est un phénomène passif faisant suite à une agression extérieure, la mort par apoptose est un processus actif, organisé temporellement, au cours duquel la cellule exprime un ensemble de gènes

entraînant des modifications morphologiques, biochimiques et structurales aboutissant à sa destruction "sans traces" et complète.

Enfin, c'est au cours des 30 dernières années, et grâce notamment aux recherches menées par John Sulston, Sydney Brenner et Robert Horvitz sur le développement du nématode *Caenorhabditis elegans*, que le programme génétique et moléculaire associé au déclenchement et à la transduction du signal apoptotique a été déchiffré. John Sulston, Sydney Brenner et Robert Horvitz ont reçu le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2002, couronnant l'importance de leurs découvertes [2].

B. Définitions :

1- Apoptose :

On nomme **apoptose** (ou **mort cellulaire programmée**) le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal, se phénomène se caractérise par un maintien de l'intégrité membranaire des cellules tout au long du processus. L'apoptose se traduit par une série de changements morphologiques de la cellule et par des altérations structurales de ses constituants. La microscopie montre une rétraction cellulaire, une condensation cytoplasmique, une margination et condensation de la chromatine, puis une fragmentation nucléaire qui survient à un stade plus avancé. A un stade ultérieur, la cellule se morcelle et libère des corps apoptotiques (fragments de cytoplasme entourés de membrane plasmique et pouvant contenir de la

chromatine). Lors de l'apoptose, il y a une redistribution des phospholipides membranaires avec une translocation des phosphatidylsérines qui passent du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Ces phosphatidylsérines permettent la reconnaissance puis l'épuration des cellules en apoptose par les macrophages, évitant ainsi l'apparition d'une réaction inflammatoire (figure 1) [4].

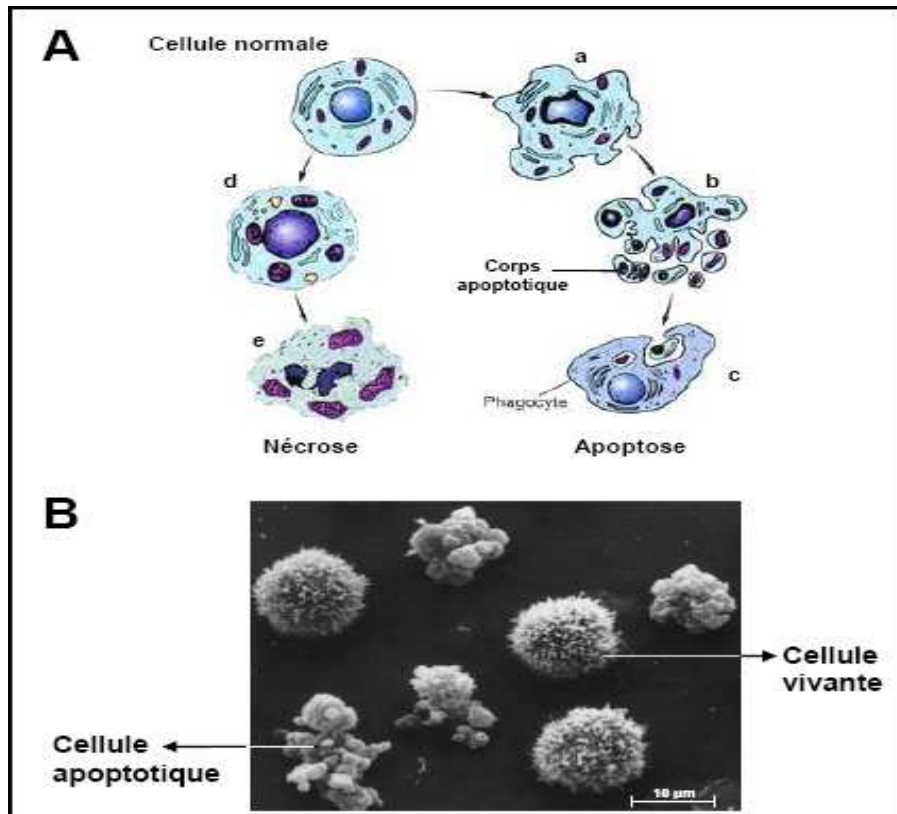


Figure 1 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose [5].

2- Nécrose :

Le terme de nécrose fait référence au mot grec « nekros » signifiant cadavre. Les cellules subissent une insulte majeure, entraînant une perte de l'intégrité membranaire, la rupture des membranes cellulaires aboutit à un relargage d'enzymes protéolytiques lysosomales permettant la destruction cellulaire.

Les contenus cellulaires incontrôlés sont libérés dans l'environnement de la cellule qui se traduit par des dommages des cellules environnantes et une forte réponse inflammatoire dans le tissu correspondant (Figure 1) [6].

3- Autophagie :

Le terme autophagie fait référence au grec « phagy » signifiant manger et « auto » signifiant soi-même. Observées en microscopie électronique, les cellules autophagiques présentent des vacuoles intracellulaires contenant des particules cytoplasmiques incluant des organelles à différents stades de désintégration. Ces vacuoles proviennent de vésicules lysosomales. L'autophagie permet à la cellule de générer de l'énergie et des métabolites en digérant ses propres organelles et macromolécules. C'est un processus de survie et d'adaptation à des conditions de stress subléthale comme une privation de nutriments par exemple. Dans certaines conditions de stress prolongé, le sacrifice des composants cellulaires vitaux par la cellule, conduit à la mort cellulaire. On parle de mort cellulaire associée à l'autophagie (figure 2). [7]

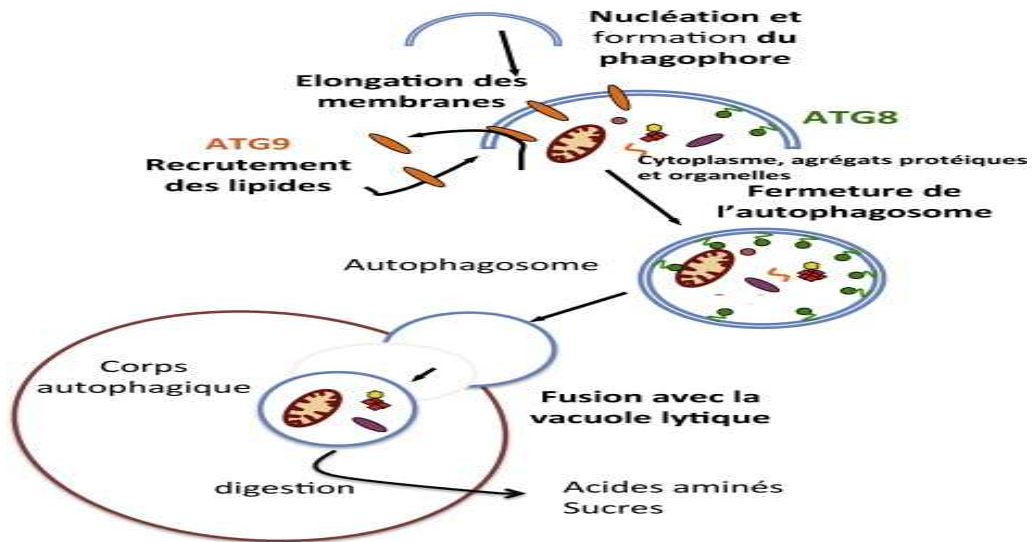


Figure 2 : Schéma présentant les bases morphologiques de l'autophagie [8]

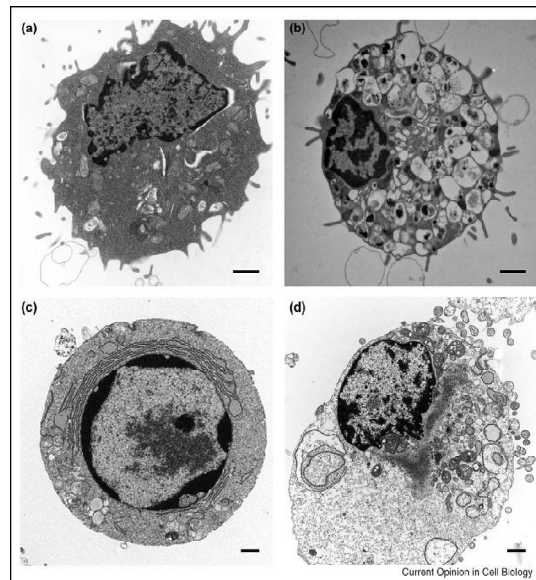


Figure 3 : morphologie d'une cellule normal (a), autophagique (b), apoptotique (c) et nécrotique (d) [9].

4- Rôle physiologique de l'apoptose :

D'une manière générale, l'apoptose contribue à modeler la forme de l'embryon, en éliminant des cellules surnuméraires. Elle entretient aussi la santé de l'adulte, en le débarrassant de cellules devenues inutiles, non fonctionnelles ou dangereuses pour lui.

Par exemple au cours de l'embryogenèse, de nombreuses structures initialement mises en place au cours du développement sont ensuite détruites par apoptose. C'est le cas du canal de Müller qui est détruit chez les hommes, du canal de Wolff qui est détruit chez la femme. L'apoptose participe aussi à la morphogenèse des doigts où les cellules de l'espace interdigital des doigts d'un embryon disparaissent [10].

La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait également appel à ce phénomène qui assure qu'un nombre correct de cellules souches se différencient. Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès et les cellules surnuméraires vont ensuite mourir par apoptose afin de créer un équilibre entre les neurones et les cibles qu'ils innervent. En effet, les cellules nerveuses embryonnaires ont besoin pour survivre du facteur de survie NGF (nerve growth factor) qui est produit par les cellules cibles des neurones. Seuls vont survivre les neurones qui se connecteront correctement à leur cible, les autres vont mourir par apoptose [11].

De même, pour le développement du système immunitaire, l'apoptose joue un rôle crucial dans la sélection lymphocytaire au cours de laquelle les lymphocytes T et B auto-immuns seront éliminés par apoptose.

L'apoptose intervient aussi chez l'adulte, 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 [12].



Deuxième partie :

*Les mécanismes inducteurs de
l'apoptose*



Les mécanismes de la régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose sont d'une nature très complexe, impliquant de nombreux intervenants et de nombreuses voies de signalisation aussi bien dans la prise de décision de survivre ou de mourir que dans l'exécution de l'apoptose proprement dite.

L'apoptose peut classiquement être divisée en trois phases : une phase d'induction ou d'initiation, une phase d'exécution et une phase de dégradation.

La phase d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra- ou extra-cellulaire) est transmis à des caspases initiatrices par des molécules adaptatrices. Ces caspases interviennent dans l'exécution de l'apoptose et conduiront à la dégradation de la cellule.

Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque). Une troisième voie activée en réponse à un stress et faisant intervenir le réticulum endoplasmique (RE) a également été décrite. [13]

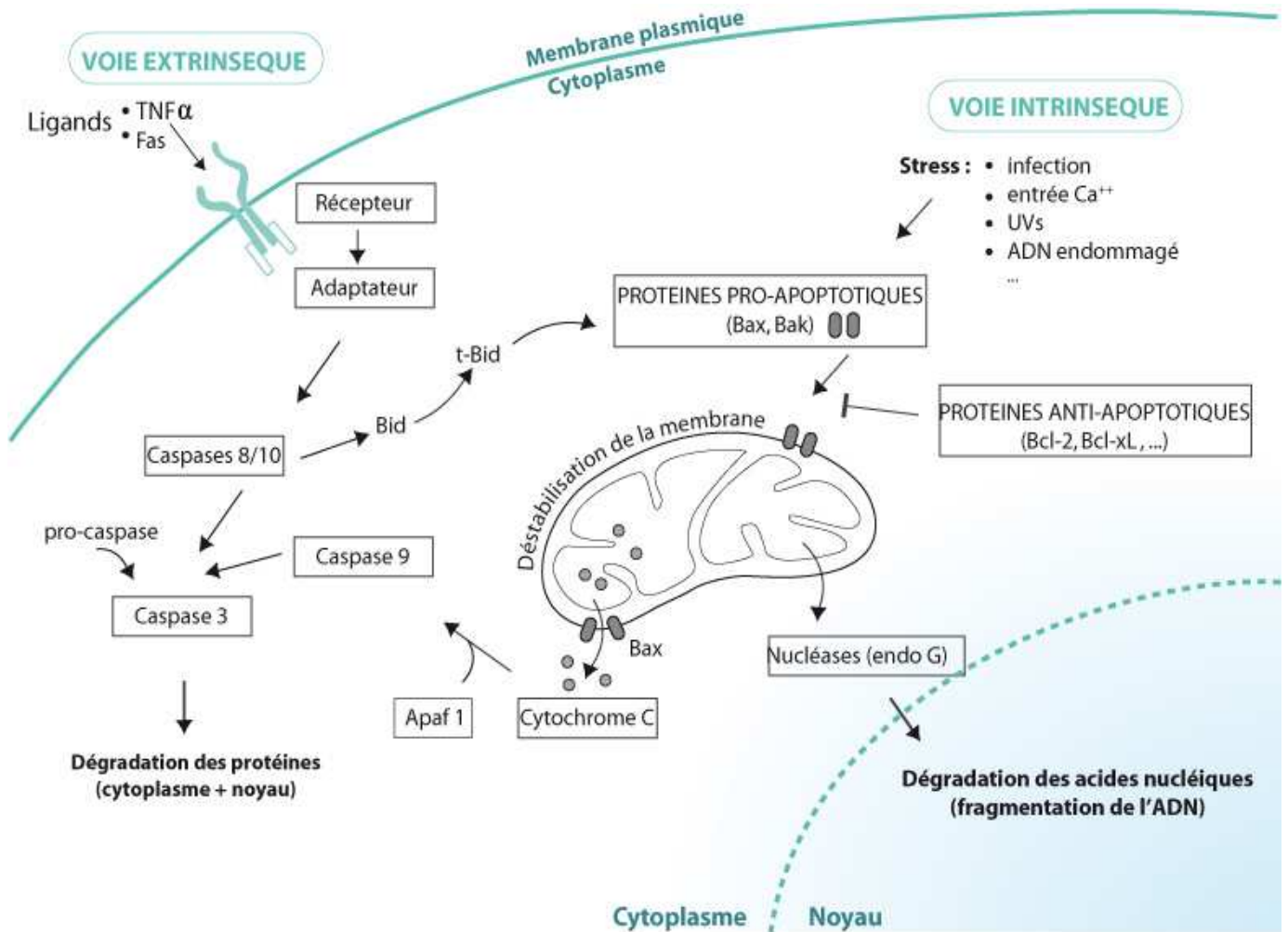


Figure 4 : Voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque [14]

La figure 4 représente les deux voies menant à l'apoptose. La voie extrinsèque est induite par les récepteurs TNFR situés dans la membrane plasmique.

Ce récepteur induit la cascade des caspases ce qui conduit la cellule à l'apoptose. La voie intrinsèque est dirigée par les membres de la famille Bcl-2 tels que Bax, qui induit le relargage du cytochrome c et la cascade des caspases ce qui conduit aussi la cellule à l'apoptose [15].

A- Les caspases :

Le terme « **caspase** » fait référence à une famille de protéases, extrêmement conservées au cours de l'évolution, possédant une cystéine dans leur site actif et clivant leurs substrats après un résidu acide aspartique, d'où le terme caspase, **C**ystein-**A**Spartate prote**A**SE. On compte jusqu'à maintenant plus de quatorze membres de cette famille qui ont été identifiés et séparés en deux groupes :

les caspases initiatrices (2, 8, 9, 10) et les caspases effectrices (3, 6, 7)

(Figure 5) [16].

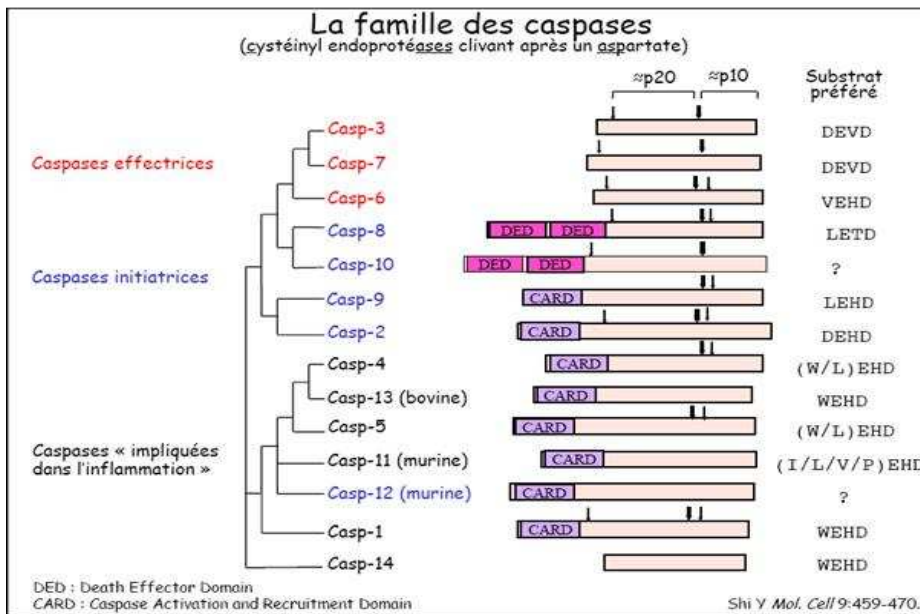


Figure 5 : classification des caspases [17]

Les caspases initiatrices activent les effectrices, et les effectrices ont comme rôle de cliver des protéines bien précises, résultant soit en leur activation ou leur inactivation.

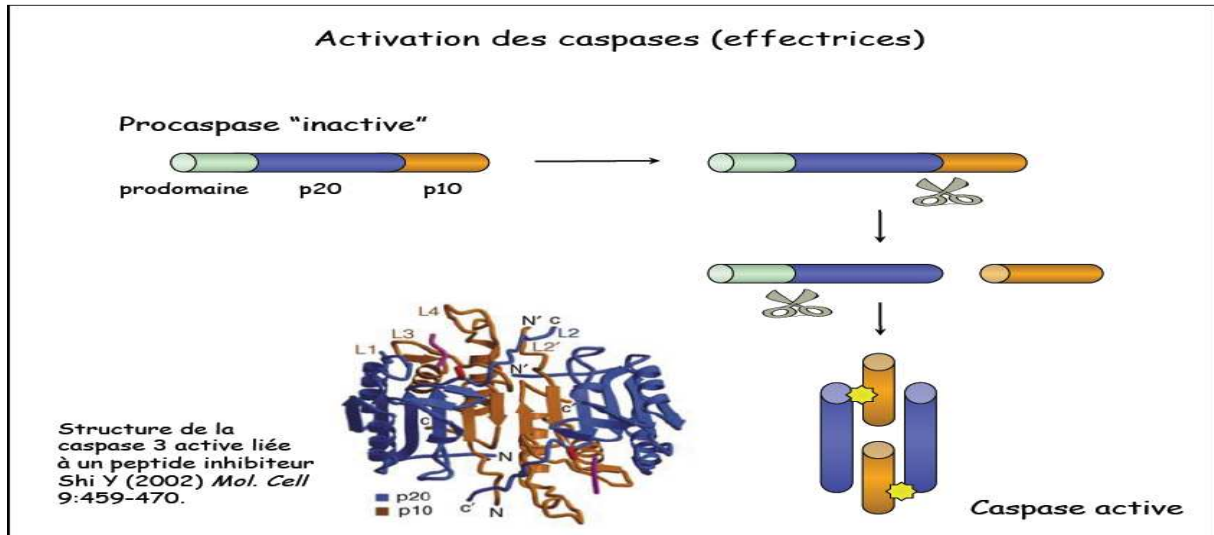


Figure 6: activation des caspases effectrices [17]

Les caspases sont toujours présentes dans la cellule animale. Elles existent à l'état basal sous la forme de proenzymes inactives (elles sont alors appelées procaspases) qui seront ensuite activées. Le mécanisme d'activation diffère pour les deux groupes de caspases.

L'activation des caspases initiatrices se fait par deux mécanismes : la proximité induite et l'association avec une sous unité régulatrice. Pour la proximité induite, l'activation requiert un recrutement massif de procaspases dans un microenvironnement de la cellule, un récepteur de mort par exemple, et

c'est cette proximité qui permet à la faible activité protéolytique intrinsèque des procaspases de s'autocliver entre elles, et ainsi de s'activer.

Pour le mécanisme d'activation par liaison : l'association avec une ou des sous unités régulatrices active la procaspase .Une fois activée par un clivage protéolytique, la caspase initiatrice activera les caspases effectrices qui cliveront leurs substrats et mèneront ainsi la cellule à sa mort.

L'activation et l'activité des caspases sont soumises à une inhibition directe par les protéines de la famille des IAP. Celles-ci sont capables d'inhiber les caspases soit en se liant à leur domaine catalytique ou encore en empêchant leur dimérisation [18].

B- La voie extrinsèque :

La voie extrinsèque implique un récepteur du signal au niveau de la membrane plasmique. Plusieurs récepteurs connus appartiennent à la famille des récepteurs TNF (*Tumor Necrosis Factor*) tels que Fas, TNF-R1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) ou TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*).

Quand un ligand se lie sur la portion N-terminal extracellulaire du récepteur ceci mène à la trimérisation du récepteur et à son activation qui conduit à un recrutement de protéines via la portion c-terminal cytoplasmique du récepteur, parmi ces protéines des procaspases initiatrices. (Figure 4, 7)

La transmission du message s'effectue par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice FADD (*Fas-associated death domain*). Cette protéine possède deux domaines d'interaction, l'un nommé DD (*Death Domain*) pour le récepteur et l'autre domaine nommé DED (*Death Effector Domain*) qui interagit avec la caspase 8. L'activation subséquente des caspases 3, 6 et 7 par un clivage protéolytique de la caspase-8 induit l'autodestruction cellulaire en clivant les composants essentiels au maintien de la vie cellulaire. [15,19]

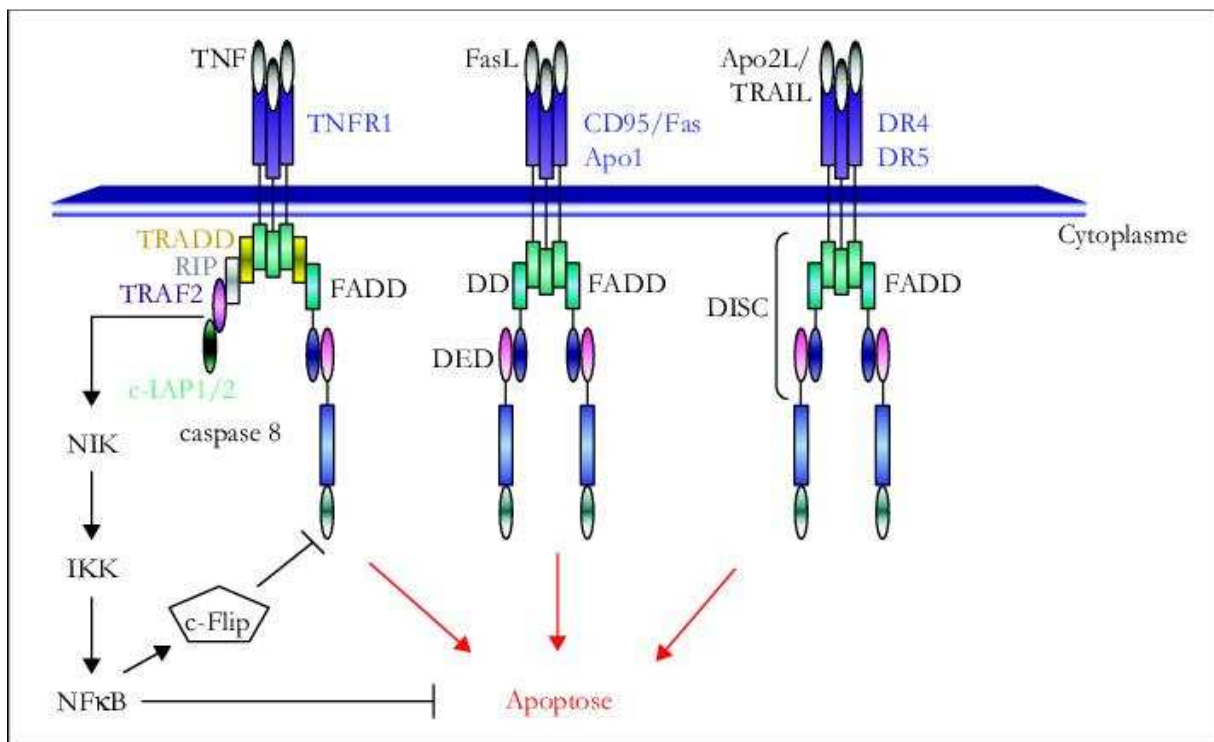


Figure 7: Voies de signalisation par les récepteurs à domaine de mort. [20]

C- La voie intrinsèque :

La voie principale d'activation des caspases est la voie dépendante de la mitochondrie. Lorsque la cellule subit un stress important (choc osmotique ou thermique, arrêt du métabolisme, dommages irréversibles de l'ADN, sevrage en cytokines), les différentes voies de signalisation mises en jeu convergent vers la formation de pores au niveau de la membrane externe mitochondriale. [21]

Ces pores de taille variable vont faire sortir vers le cytosol plusieurs protéines proapoptotiques : cytochrome c, Smac, HtrA2, AIF et endonucléase G. (figure 9)

La sortie du cytochrome c est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 qui comporte des membres proapoptotiques comme Bax, Bak, Bid et Bim et des membres antiapoptotiques comme Bcl-2 et BclxL. Dans le cytosol, le cytochrome c va se fixer à la protéine Apaf1 et entraîner sa multimérisation. L'ensemble va former un complexe nommé Apoptosome. (Figure 7)

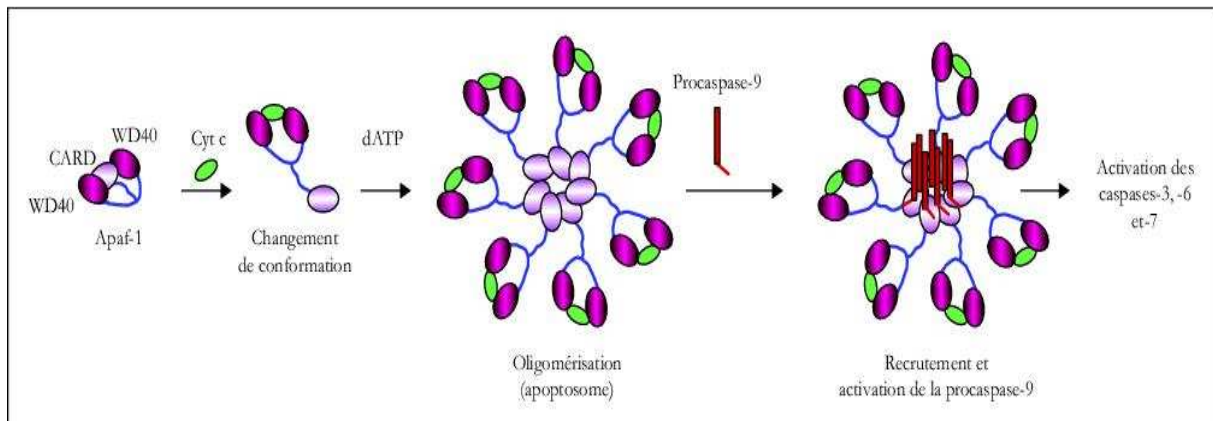


Figure 8 : formation d'apoptosome et activation du procaspase 9 [20]

L'Apoptosome va recruter la procaspase 9 pour l'activer. La caspase 9 va activer à son tour les caspases effectrices. Cette activation des caspases est inhibée par les protéines antiapoptotiques IAPs. L'activité des IAP est elle-même inhibée par les protéines Smac et HtrA2 relâchées de la mitochondrie. Les protéines AIF et endonucléase G (Endo G) sont aussi relâchées de la mitochondrie et vont se relocaliser dans le noyau pour y dégrader l'ADN . [22]

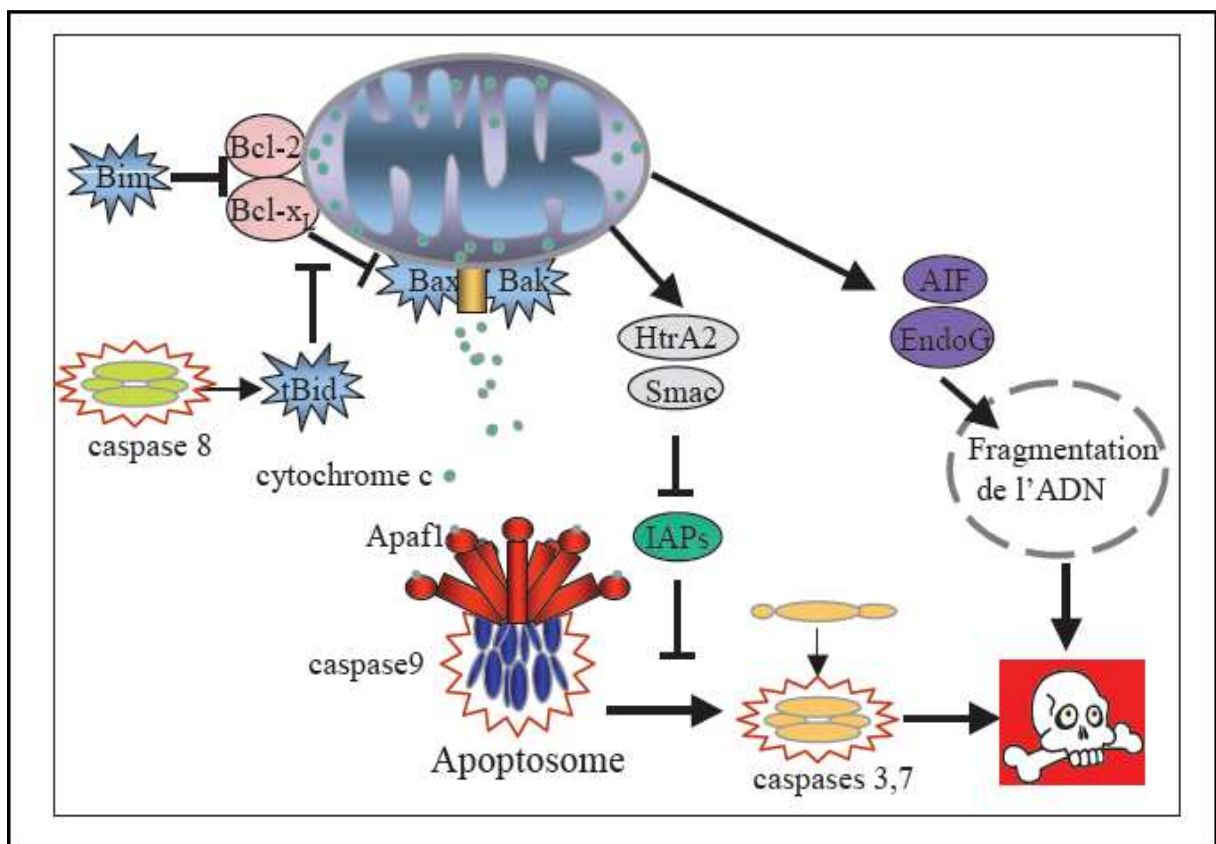


Figure 9: l'apoptose mitochondriale [22]

D- La voie du réticulum endoplasmique :

Le réticulum endoplasmique permet la synthèse des protéines qui seront secrétées. Cet organelle possède de multiples protéines chaperonnes qui participent au repliement des protéines, et qui s'assurent de la bonne conformation des protéines néosynthétisées.

Lorsque la capacité de repliement des protéines du réticulum endoplasmique est altérée, il s'ensuit un stress du réticulum endoplasmique pour lequel une réponse adaptative hautement conservée est mise en place, l'UPR (Unfolding Protein Response) [23].

L'UPR est induite par l'activation synergique de trois protéines : PERK (PKR like Endoplasmic Reticulum Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et IRE1 (Inositol Requiring 1).

L'UPR, suite à l'induction de facteurs de transcription (eIF, ATF6, ATF4, IRE1/XBP1), conduit d'une part à un arrêt de la synthèse protéique normale, et d'autre part, à une augmentation de la transcription des protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique (BIP/Grp78, Grp94, ORP150), afin de permettre à la cellule de corriger les altérations du processus de synthèse protéique [24].

Cependant, si les atteintes sont trop importantes et que l'homéostasie ne peut être rétablie, l'UPR peut entraîner la mort cellulaire par apoptose.

L'induction de l'apoptose suite à un stress prolongé du reticulum endoplasmique passerait par différents mécanismes complexes impliquant une dérégulation calcique, l'activation de protéases, de kinases, de facteurs de transcription et de protéines appartenant à la famille Bcl-2 ainsi que leurs régulateurs [25].

IRE1 peut s'associer avec TRAF2 (TNF-Receptor Associated Factor) qui en se liant sur le domaine cytoplasmique du récepteur du TNF va activer la voie proapoptotique des JNK kinases [26].

De plus, l'UPR induit l'expression du facteur de transcription CHOP (CCAAT/enhancer binding protein Homologous Protein) qui régule négativement l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl2 (Figure 10) [27].

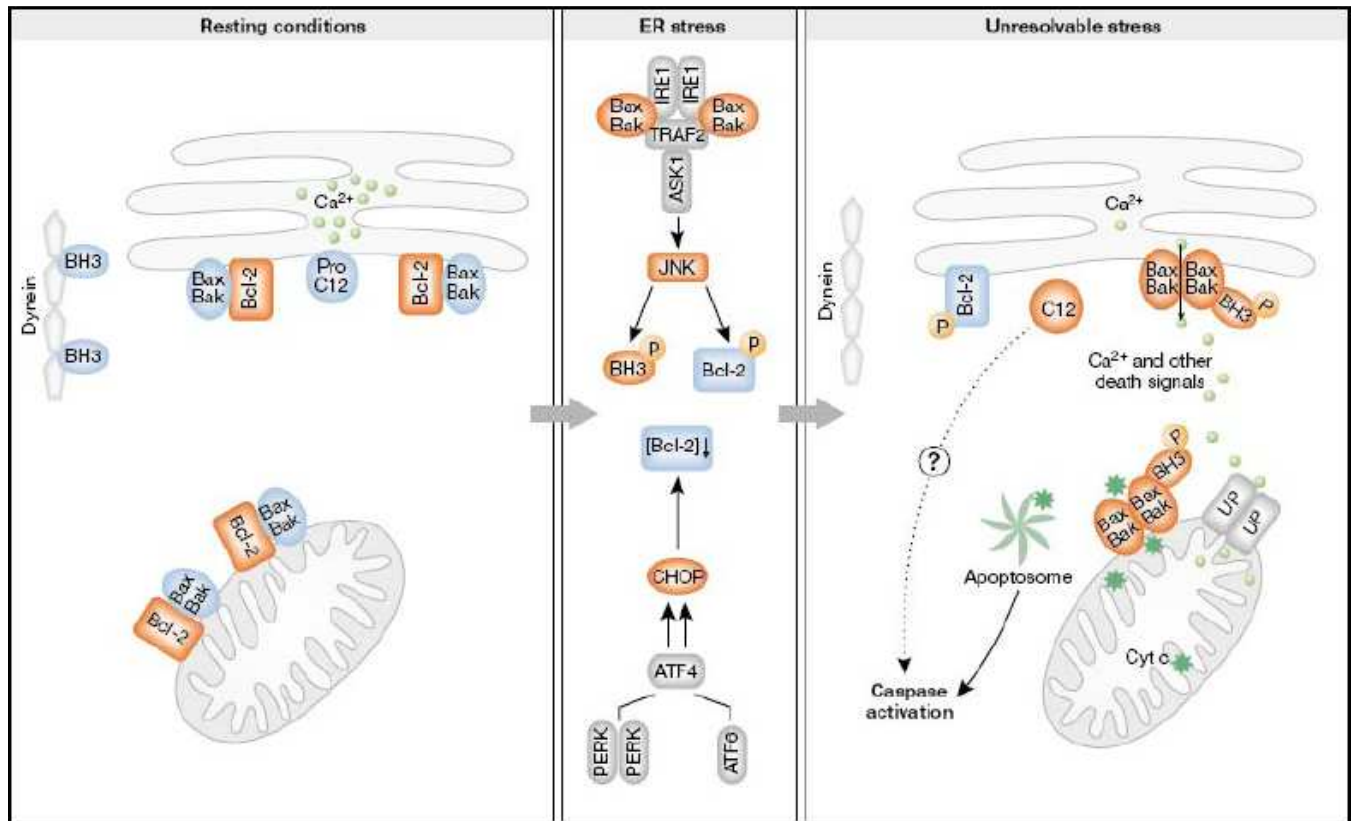


Figure10 : Voie d'induction de l'apoptose par le stress du R.E.[28]

E- Rôle du calcium dans la signalisation apoptotique :

Classiquement, le rôle toxique du calcium était associé à une mort par nécrose, suite à l'activation massive de protéases et de phospholipases [29].

Mais depuis, plusieurs études ont démontré que des augmentations de calcium intracytosolique étaient associées à tous les stades de la mort par apoptose .Une dérégulation sévère de l'homéostasie calcique pourrait conduire à la mort par

nécrose, alors qu'une augmentation plus contrôlée de la concentration calcique cytosolique pourrait promouvoir la mort cellulaire par apoptose [30].

Le calcium libre étant toxique pour la cellule, il est séquestré dans des organelles cellulaires dont les principaux sont la mitochondrie et le reticulum endoplasmique. La concentration calcique cytosolique est régulée par tout un ensemble de molécules localisées sur les membranes plasmiques, mitochondriales et réticulaires.

La dérégulation de l'homéostasie calcique à l'origine de processus apoptotiques peut provenir de différents mécanismes impliquant la mitochondrie et le reticulum endoplasmique [23].

Le calcium est impliqué dans plusieurs étapes de la voie de signalisation apoptotique mitochondriale lors d'une augmentation du calcium intracytosolique, celui-ci est capté par la mitochondrie et provoque l'ouverture du PTP (pore de transition de perméabilité), ce qui entraîne une désorganisation de la matrice mitochondriale et la libération du cytochrome c [31].

Une perturbation de l'homéostasie calcique conduit également à l'activation de la calcineurine (phosphatase calcium) qui en déphosphorylant Bad active la voie intrinsèque mitochondriale [32].

Des modifications de l'homéostasie calcique sont à l'origine de l'activation des calpaïnes par dissociation de leur inhibiteur endogène, la calpastatine. Les calpaïnes forment une famille de protéases à cystéine capables de cliver des substrats communs avec les caspases durant l'apoptose.

Elles peuvent cliver les procaspases 3, 7, 8, 9, et 12, des membres de la famille de Bcl-2 (Bid, Bcl-XL, Bcl-2), des protéines structurales (actine, fodrine, cytokératine...), et aussi des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire (poly ADP ribose polymérase (PARP), cyclin D). Le clivage de ces protéines par les calpaïnes peut être pro- ou anti-apoptotique [23].



Troisième Partie :

Les régulateurs d'apoptose



A- La famille bcl-2 :

Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'apoptose vis-à-vis de la plupart des stimuli apoptotiques sauf, dans certains cas, suite à l'activation des récepteurs de mort. Elles sont au moins au nombre de 20 dans les cellules de mammifères et sont divisées en trois sous-familles en fonction de leur structure et de leur fonction [33].

Les membres de la sous-famille des anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-w, A1 et Mcl-1) partagent une homologie de séquence pour 4 domaines BH (Bcl-2 homology). Ces protéines promeuvent la survie cellulaire en neutralisant l'activité des protéines Bak-like. Les membres de la sous-famille des pro-apoptotiques Bak-like (Bak, Bax, Bok) possèdent les domaines BH1, BH2 et BH3 alors que les protéines de la sous famille « BH3-only » (Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Noxa, Puma) ne possèdent que le domaine BH3, domaine absolument requis pour leur activité pro-apoptotique (Figure 11).

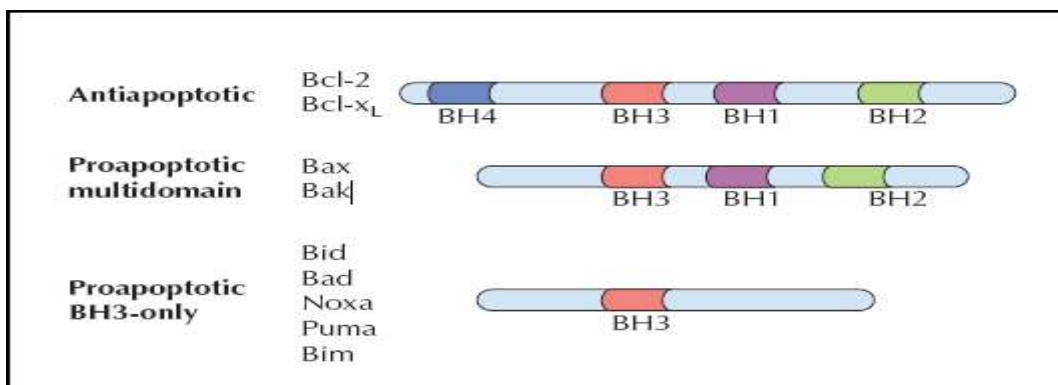


Figure 11 : les domaines de la famille bcl-2 [34].

Ce sont des protéines qualifiées de sentinelles qui détectent divers stress cellulaires. Par exemple, Noxa et Puma semblent être les médiateurs de l'apoptose induite par un stress génotoxique tandis que Bad est activée suite à une privation en facteurs de croissance. Elles s'associent et neutralisent la fonction des protéines anti-apoptotiques. Certaines de ces protéines (Bim, Puma, Bid) sont capables de s'associer avec toutes les protéines anti-apoptotiques constituant ainsi de puissants inducteurs d'apoptose.

Les autres ne peuvent s'associer qu'avec certaines protéines anti-apoptotiques. Par exemple, Noxa s'associe uniquement avec Mcl-1 et A1 alors que Bad ne s'associe qu'avec Bcl-2, Bcl-X et Bcl-w.

Suite à un stress cellulaire, certaines protéines BH3-only sont activées et vont conduire à l'activation de Bak/Bax. Deux mécanismes d'activation de Bak/Bax par les BH3-only ont été proposés (Figure 12). Le modèle d'activation directe est basé sur une association et activation directe de Bax/Bak par certains BH3-only.

Dans ce modèle, les BH3-only sont divisés en deux sous-groupes en fonction de leur capacité à activer directement ou non les protéines Bax et Bak. Les activateurs tels que Bim ou tBid se lient directement avec Bax et Bak et les

activent alors que les autres BH3-only sensibilisateurs ne peuvent lier que les protéines anti-apoptotiques.

Suite à un stress, les sensibilisateurs s'associeraient et neutraliseraient les protéines anti-apoptotiques ce qui conduirait à la libération de tous les « activateurs » et à l'activation directe de Bak/Bax. Le deuxième modèle, le modèle d'activation indirecte, suggère que tous les BH3-only s'associeraient avec leurs partenaires anti-apoptotiques spécifiques et induiraient l'apoptose en empêchant la neutralisation de l'activité de Bak/Bax par les protéines anti-apoptotiques. Dans ce modèle, Bim et tBid sont de puissants inducteurs de l'apoptose puisqu'ils sont capables d'antagoniser toutes les protéines anti-apoptotiques [35].

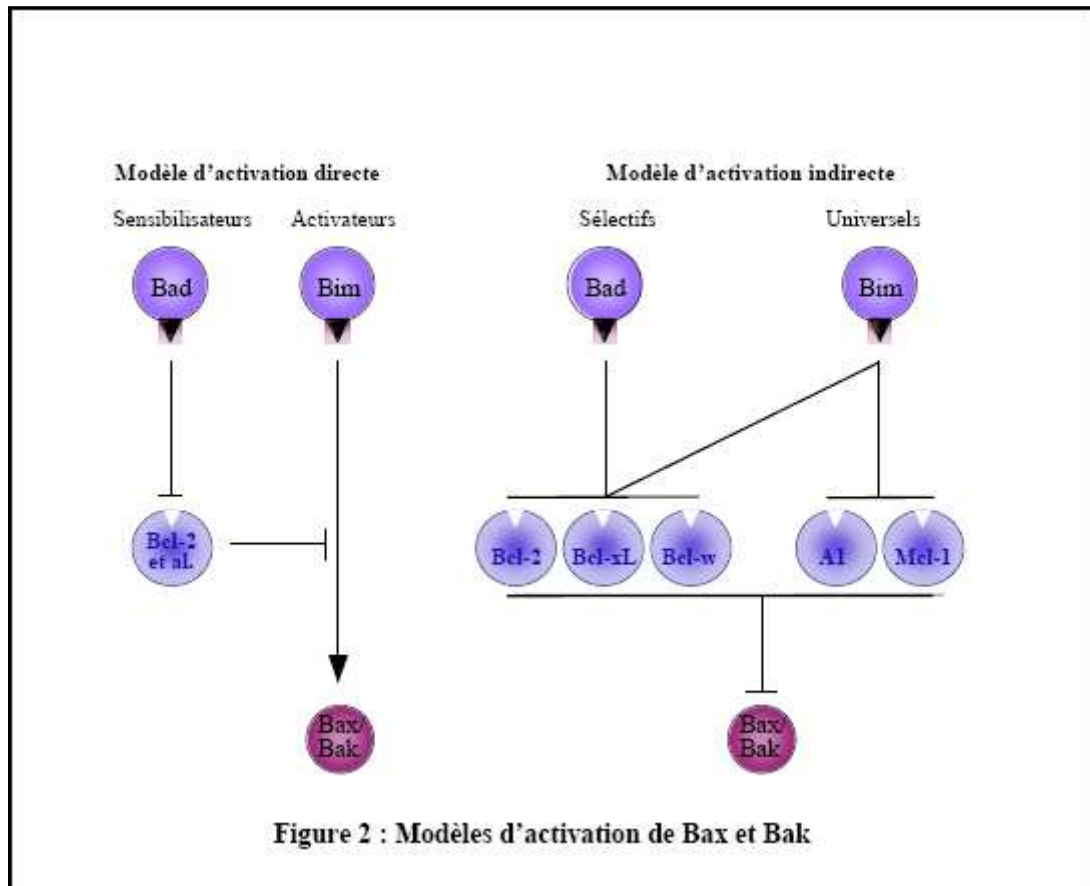


Figure 12: modèles d'activation de Bax et Bak [36].

Quel que soit le modèle, une fois activées, Bak et Bax vont conduire, par un mécanisme qui reste encore débattu, au relargage dans le cytoplasme de facteurs apoptogènes normalement séquestrés dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Le relargage de l'ensemble de ces facteurs contribue à induire efficacement l'apoptose des cellules [36].

B- Les IAP (inhibitors of apoptosis protein) :

Les IAP (inhibitors of apoptosis protein) constituent une famille de protéines anti-apoptotiques initialement décrites dans le baculovirus. Actuellement huit IAP ont été identifiées chez l'homme : c-IAP1, c-IAP2, NAIP (neuronal apoptosis IAP), survivine, XIAP, Bruce, ILP2 et livine [37].

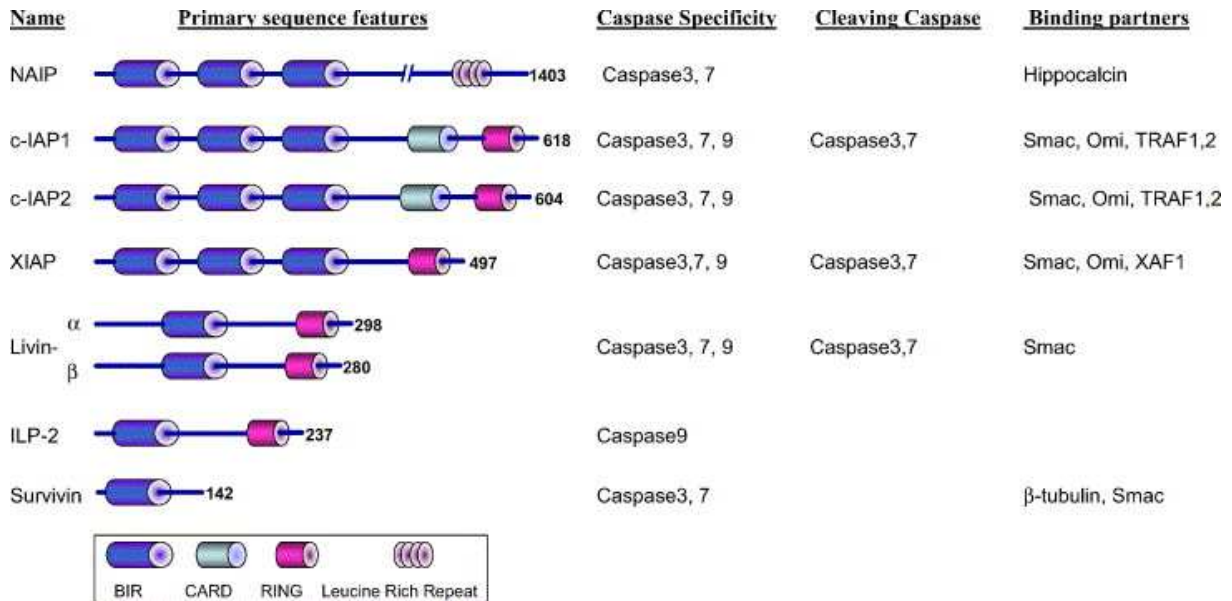


Figure 13 : les membres de la famille IAP [38]

Les membres de la famille des IAP sont définis par une ou plusieurs répétitions d'un domaine de 70 acides aminés hautement conservé nommé BIR (Baculovirus IAP repeat). À l'exception de NAIP et survivine, les IAP humaines contiennent aussi une séquence RING à l'extrémité C-terminale.

Les IAP peuvent inhiber l'apoptose induite par de nombreux stimuli. Cette action est le résultat d'une **fixation directe** sur les caspases conduisant à leur inhibition. Cette inhibition directe de l'activité des caspases permet donc une régulation supplémentaire de l'apoptose une fois que la cascade d'activation des caspases a été initiée. Elle permet d'empêcher toute induction d'apoptose inappropriée. Les protéines mitochondriales Smac/Diablo et Omi/HtrA2 une fois libérées régulent cette action inhibitrice des IAP. En se fixant directement sur celles-ci, elles empêchent la fixation des caspases [39].

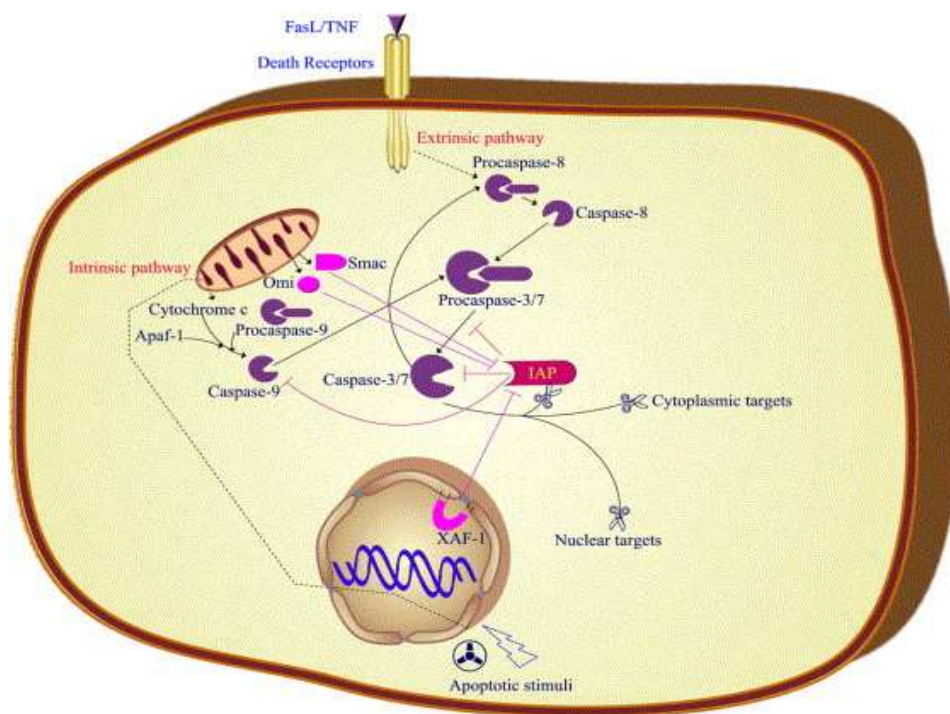


Figure 14 : Les cibles et les régulateurs de l'IAP [40]



Quatrième Partie :

Les méthodes de mise en évidence

in vitro



Les différents modes de mort cellulaire peuvent être mis en évidence à l'aide de différentes techniques telles que la microscopie, l'électrophorèse ou la cytométrie en flux, dans ce chapitre nous allons décrire les principales méthodes disponibles.

A- Analyse morphologique par microscopies optique, électronique et fluorescence :

Les modifications morphologiques, telles que la diminution de taille ou la condensation du noyau et de la chromatine, permettent de détecter les cellules apoptotiques par microscopie optique et électroniques (Tableau I) [41].

Tableau I: Critères morphologiques pour l'identification des cellules apoptotiques et nécrotiques [42].

<u>Apoptose</u>	<u>Nécrose</u>
Taille réduite, forme complexe	Gonflement de la cellule et du noyau
Condensation de la chromatine	Condensation de la chromatine
Bourgeonnement de la membrane plasmique	Vacuolisation du cytoplasme
Perte de structure du noyau (apparence lisse)	Gonflement de la mitochondrie
Fragmentation du noyau	Rupture de la membrane plasmique
Présence de corps apoptotiques	Dissolution de l'ADN ("Caryolyse")
Dilatation du réticulum endoplasmique	

L'apoptose implique le rétrécissement de la cellule, une augmentation de la densité du cytoplasme, la condensation de la chromatine et la ségrégation en masses qui peuvent former des protusions. Ces dernières se séparent pour donner des corps apoptotiques liés à la membrane.

Initialement, la mitochondrie et l'appareil de Golgi ne présentent pas de signes d'éclatement et la membrane nucléaire reste intacte durant une longue période.

En revanche, durant la nécrose, la chromatine se condense en masses mal définies, les organelles gonflent, et à un stade plus avancé, la membrane s'altère et la cellule se désintègre.

En microscopie électronique, l'application des techniques d'imagerie quantitatives pour visualiser les différents niveaux de gris permet de détecter les modifications de densité nucléaire [43].

Un autre outil est la microscopie confocale à balayage laser, puissante pour l'analyse morphologique et la localisation macromoléculaire, en réalisant des sections optiques des cellules [44].

La condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire sont faciles à visualiser par examen de cellules dont l'ADN est coloré à l'aide, par

exemple, d'iodure de propidium et de Hoechst 33342. En l'absence de systèmes d'analyse d'images complexes, la limitation manifeste des méthodes basées sur la microscopie dans les études quantitatives de l'apoptose est le nombre limité de cellules qui peuvent être effectivement analysées. Ces techniques sont utilisées principalement comme méthode de détermination qualitative de l'apoptose. Pour la quantification, la cytométrie en flux est plus puissante. [45 ; 46].

1- Microscopie optique et colorants d'exclusion :

Le bleu trypan est un colorant qui entre dans les cellules. Une cellule vivante expulsera la molécule et restera blanche au microscope, au contraire d'une cellule morte qui n'aura pas l'énergie de la rejeter et restera bleue. Cette technique permet donc de détecter les cellules nécrotiques et apoptotiques tardives (membrane plasmique altérée). Le comptage des cellules peut être réalisé sur une cellule de Thoma ou de Bürker.

Cependant, ce marqueur présente l'inconvénient d'être toxique pour les cellules, ainsi l'analyse doit être réalisée rapidement sous peine d'obtenir des résultats faussés. L'érythrosine est un colorant d'exclusion fluorescent, entrant dans les cellules dont la membrane est endommagée. Les cellules mortes seront visualisées en rouge. [47].

2- Analyse des brins d'ADN par microscopie à fluorescence

2.1 Méthode "TUNEL" :

L'une des caractéristiques de l'apoptose est la dégradation de l'ADN qui, aux premiers stades de l'apoptose, concerne des zones internucléosomales. Le clivage de l'ADN peut produire des coupures simples ou doubles.

Les deux types de fractures peuvent être détectés en marquant les extrémités 3'-OH libres à l'aide de nucléotides modifiés (biotine-UTP, fluorescéine-dUTP) intervenant dans une réaction enzymatique.

L'enzyme terminal desoxynucléotidyl transférase (TdT) catalyse la polymérisation sans matrice nucléique des desoxyribonucléotides des extrémités 3' de l'ADN double et simple brin. Cette méthode est appelée "TUNEL" (Terminal deoxynucleodityl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling). Elle consiste à ajouter aux extrémités 3'-OH, un nucléotide marqué. Après perméabilisation, les cellules sont incubées avec le réactif TUNEL contenant l'enzyme TdT et le marqueur (ex : fluorescéine-dUTP). Pendant cette période d'incubation, l'enzyme permet l'addition du marqueur sur les groupes 3'-OH libres des simples et doubles brins d'ADN.

Après lavage, le marqueur incorporé au niveau des sites ADN endommagés peut être visualisé par microscopie fluorescence dans le cas de marquage par nucléotides fluorescents, soit après une réaction particulière,

fonction du marqueur employé .La quantification est réalisable par cytométrie en flux (Figure 15 et 16).

Cette technique a l'avantage de marquer les cellules dont les altérations morphologiques sont encore difficiles à visualiser en microscopie optique [48 ,49].

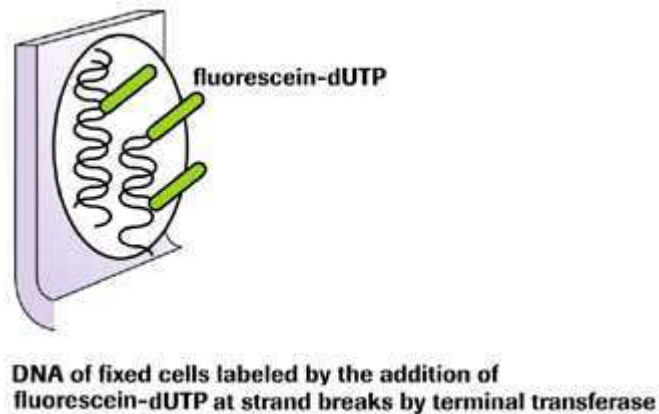


Figure 15: Principe du test TUNEL-fluoresceine-dUTP [50]

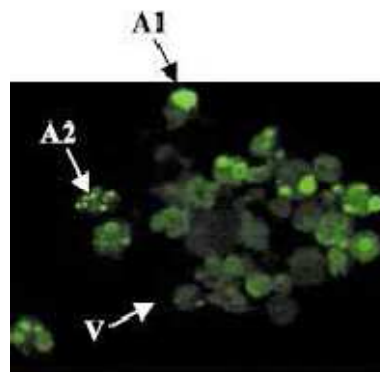


Figure 16 : Observation de la fragmentation de l'ADN à l'aide de la méthode enzymatique TUNEL [49]

A1 : Cellule apoptotique avec chromatine condensée mais sans fragmentation nucléaire

A2 : Cellule apoptotique avec fragmentation nucléaire/ V : Cellule viable

Il existe différentes variantes de ce test. Une autre alternative est de marquer les groupes 3'-OH libres par "nick translation": la DNase (endonucléase) crée des cassures aléatoires ("nick") dans l'ADN double et simple brin, l'ADN-polymérase 1 se fixe sur ces extrémités 3' libérées et synthétise une nouvelle chaîne d'ADN à partir des nucléotides marqués ou non du milieu d'incubation. Cependant, la technique TUNEL est considérée comme étant plus sensible et plus rapide [52].

2.2 Méthode "DAPI" :

Le DAPI (ou 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorate) est un marqueur bleu fluorescent des acides nucléiques qui se lie aux régions AT de l'ADN. Il permet la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN (Figure 17).

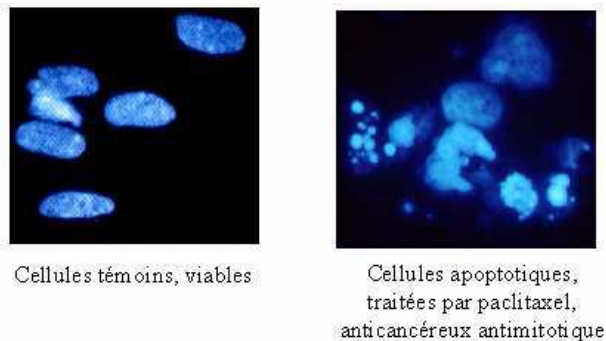


Figure 17 : visualisation des cellules apoptotique par methode DAPI [45]

3- Visualisation de la chromatine et des corps apoptotiques par microscopie à fluorescence (AO/PI) :

La combinaison des deux marqueurs, acridine orange/iodure de propidium, permet de distinguer les différentes sous-populations de cellules. Les cellules viables et apoptotiques précoces produisent une fluorescence verte du fait de la coloration des acides nucléiques par l'acridine orange (AO) mais elles excluent l'iodure de propidium (PI). Les cellules apoptotiques précoces se distinguent par leur chromatine très condensée. Les cellules nécrotiques et nécrotiques secondaires émettent une fluorescence rouge par inclusion du PI (Tableau II).

Les cellules nécrotiques ont une chromatine diffuse alors que les nécrotiques secondaires et les corps apoptotiques ont une chromatine condensée) [51 ,52 ,53 ,54].

Tableau II : Caractéristiques des sous-populations de cellules en microscopie à fluorescence AO/PI. [48]

<u>Population</u>	<u>fluorescence</u>	<u>Noyau/chromatine</u>
<i>Viable</i>	<i>Verte</i>	<i>Noyau normal</i>
<i>apoptique précoce</i>	<i>verte</i>	<i>Noyau condensé, fragmentée</i>
<i>Apoptotique tardive</i>	<i>rouge</i>	<i>Chromatine condensée, fragmentée</i>
<i>nécrotique</i>	<i>rouge</i>	<i>Noyau normal</i>
<i>Fluorescence verte = coloration AO et exclusion PI</i>		
<i>Fluorescence rouge = inclusion PI</i>		

B- Analyse de l'ADN et des protéines par électrophorèse :

Les modifications au niveau de l'ADN et des protéines peuvent être mises en évidence par électrophorèse.

1- Analyse des brins d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose :

L'évènement le plus caractéristique dans l'apoptose est le clivage de l'ADN. Il est une conséquence de l'activation des endonucléases. Ce clivage a lieu entre les nucléosomes et produit des fragments comprenant un nombre de paires de bases multiple de 160 à 200 paires de bases [55]. L'analyse des fragments par électrophorèse sur gel d'agarose, après révélation au bromure d'éthidium, présente une configuration caractéristique dite en "échelle" appelée "DNA ladder" (Figure 18 et Figure 19).

La détermination du rapport d'ADN fragmenté sur l'ADN total, dans les lysats de cellules entières (centrifugation haute vitesse) a été mise au point dans de nombreuses études pour la quantification de l'apoptose dans les populations de cellules in vitro [42 ,45].

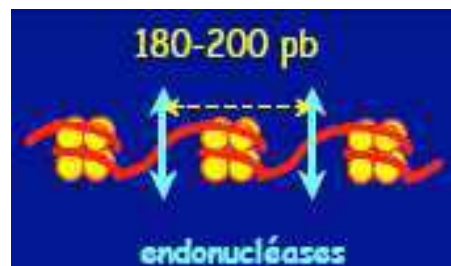


Figure 18: Fragmentation internucléosomale [56]

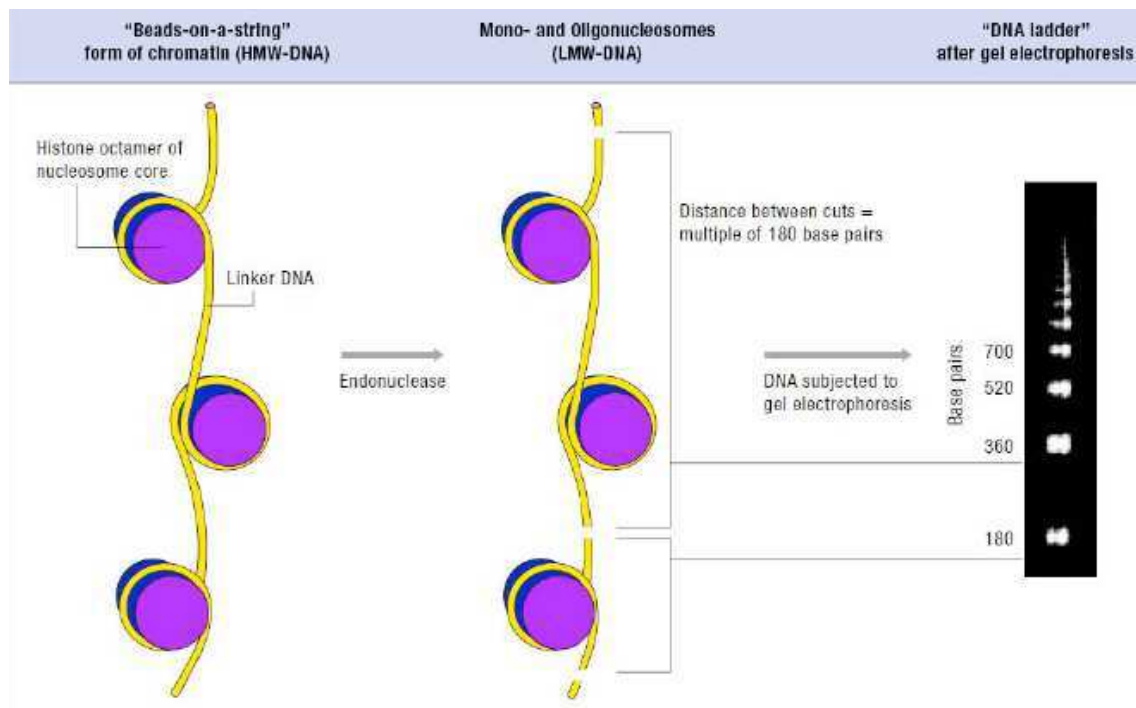


Figure 19 : Fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose [56].

Une endonucléase clive l'ADN entre les nucléosomes et génère des fragments réguliers qui forment une échelle d'ADN sur le gel d'agarose après électrophorèse [56].

Une méthode améliorée, pour détecter la fragmentation de l'ADN, visualise l'ADN après "Southern blotting" à l'aide d'une sonde radioactive de l'ADN total cellulaire, au lieu du bromure d'éthidium, qui augmente la sensibilité.

Ces techniques plus sensibles ont cependant différents inconvénients (temps, nécessité d'un grand nombre de cellules, radioactivité pour la méthode la plus sensible). Elles ne permettent pas de déterminer le pourcentage de noyaux apoptotiques ou de reconnaître les cellules apoptotiques parmi une population hétérogène de cellules [57].

2- Identification des endonucléases mises en jeu dans la fragmentation d'ADN :

La fragmentation de l'ADN est la conséquence de l'activation des endonucléases. Si l'on souhaite les identifier, il est possible de réaliser une électrophorèse "SDS-PAGE" ("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis") contenant un acide nucléique substrat, marqué au ³²P ou non-radioactif. L'activité de l'endonucléase est révélée par la diminution du substrat dans le gel [58,45].

3- Analyse de l'activation de l'apoptose par western-blot :

Cette technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines, préalablement dénaturées, selon leur masse. Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane (typiquement en Polyvinidyl difluoride PVDF), où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Cette technique permet de détecter des protéines caractéristiques de l'apoptose telles que les caspases activées, PARP clivé (substrat de la caspase- 3) ou le cytochrome c libéré [59 ;60].

Deux exemples, concernant la caspase-3 et le cytochrome-c, sont décrits ci-après.

- **Caspase-3 :**

Cette protéase est présente dans la cellule sous forme d'une procaspase inactive. L'activation lors de l'apoptose nécessite le clivage de l'enzyme, au niveau de sites aspartate spécifiques, en deux sous-unités de poids moléculaire de 12 000 (p12) et 17 000 (p17). La proenzyme a une masse moléculaire $M = 32\ 000$ (Figure 20).

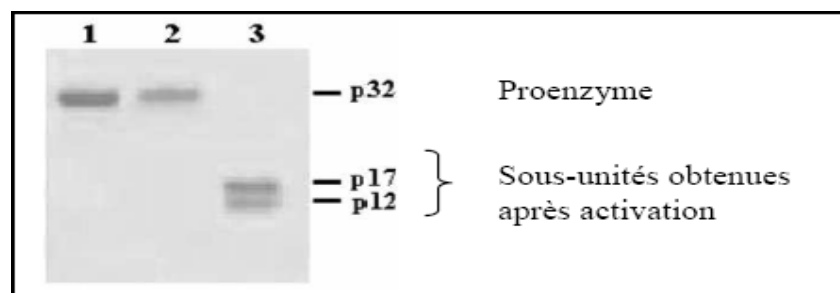


Figure 20 : Electrophorèse Caspase-3 [60]

Ligne 1 : Cellules CHO non traitées, Ligne 2 : Cellules traitées par NaBu et NAC, Ligne 3 : Cellules traitées par NaBu seul,

NaBu : Butyrate de sodium (cytotoxique),

NAC : N-acétylcystéine (antioxydant)

- **Cytochrome- c :**

Lors de l'apoptose, la mitochondrie relargue le cytochrome-c qui active les procaspases, dans le cytoplasme. La quantité de cytochrome-c retrouvée dans la suspension de culture est le reflet de l'incidence de l'apoptose (Figure 21).

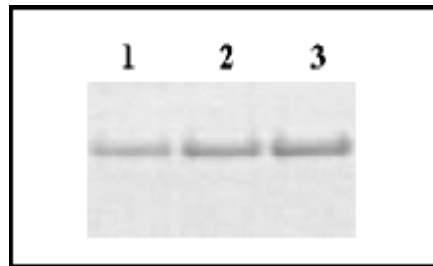


Figure 21 : Electrophorèse Cytochrome-c [60]

Ligne 1 : Cellules CHO non traitées

Ligne 2 : Cellules traitées par NaBu et NAC

Ligne 3 : Cellules traitées par NaBu seul

C- Mesure de l'activité de lactate déshydrogénase par méthode enzymatique colorimétrique :

Cette technique permet d'évaluer l'intégrité membranaire. Les cellules dont la membrane a été perméabilisée ou lysée, libèrent leur contenu cytosolique, et notamment l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), dans le milieu extracellulaire. La quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est proportionnelle au nombre de cellules mortes (après évaluation du contenu en LDH d'une cellule viable).

La mesure de l'activité LDH permet d'évaluer non seulement la mort cellulaire nécrotique (caractérisée par une rupture précoce de la membrane plasmique) mais aussi une partie de la mort cellulaire apoptotique: les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées (*in vitro*) et finissent par perdre leur

intégrité membranaire au stade ultime du processus apoptotique ("nécrose secondaire"). La mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture peut être réalisée par dosage enzymatique colorimétrique. Le surnageant des cellules est incubé avec le substrat de l'enzyme LDH, l'acide lactique. L'activité de l'enzyme est déterminée à l'aide d'une seconde réaction, couplée à la première, pendant laquelle un colorant (sel de tétrazolium) est réduit. Le dosage est effectué par spectrophotométrie à environ 500 nm [61 ,62] (Figure 22).

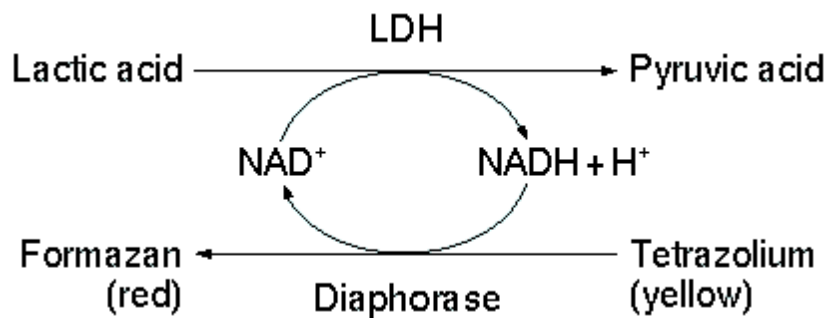


Figure 22 : Principe du dosage de la LDH [63]

D- Viabilité cellulaire par méthode colorimétrique au MTT :

Les mitochondries des cellules viables contiennent une enzyme réductase, la succinate deshydrogénase, permettant de réduire un sel de tétrazolium, le 3-[4,5-(diméthylthiazol-2-yl)]- 2,5-diphényltétrazolium bromide ou MTT (jaune) en formazan (bleu violet) (Figure 23).

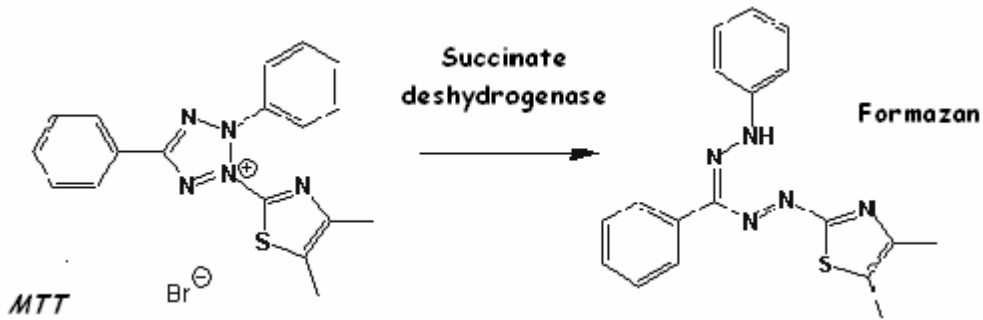


Figure 23 : Principe de la méthode colorimétrique au MTT [61]

L'intensité de la coloration violette est alors proportionnelle au nombre de cellules vivantes et à leur activité métabolique [64].

E- Analyse par cytométrie en flux :

La cytométrie en flux est une technique qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques et biologiques d'une cellule. Elle a été initialement développée pour le dénombrement des cellules en suspension et l'évaluation de leur taille mais elle est devenue une technique d'analyse et de quantification dans des domaines divers tels que la prolifération cellulaire, l'immunologie, la microbiologie ou le diagnostic de certaines maladies. Elle est la seule technique qui permet de faire une analyse cellule par cellule, quantitative, multiparamétrique, à grande vitesse, avec une bonne sensibilité de détection. Un tri des cellules peut également être associé.

Cette méthode présente différents avantages :

- l'analyse individuelle des cellules,

- la facilité de préparation des échantillons,
- la rapidité de l'analyse,
- le faible nombre de cellules nécessaires,
- l'identification de sous-populations,
- la mesure simultanée de différents paramètres cellulaires.

Pour l'analyse par cytométrie, une dissociation cellulaire est nécessaire. Les cultures de cellules en suspension cellulaires en suspension représentent le matériel de choix pour l'obtention de cellules isolées ; seule une bonne dispersion est nécessaire pour éliminer les éventuels agrégats cellulaires. Dans le cas de cultures de cellules adhérentes, il est nécessaire de détacher les cellules de leur support et de les dissocier. Le détachement et la dissociation mécanique peuvent être obtenus par l'emploi d'enzymes protéolytiques, d'agents chélateurs ou par leur association.

La trypsine, enzyme protéolytique, est couramment employée. La pronase, mélange de protéases, (aminopeptidase et carboxypeptidase) et la collagénase peuvent également être utilisées.

L'utilisation d'enzymes pour la dispersion peut conduire à des altérations de la surface cellulaire. Il est donc nécessaire d'inactiver ces enzymes par du sérum ou un inhibiteur (inhibiteur de soja dans le cas de la trypsine). La dissociation des cellules peut également être obtenue par des agents chélateurs

(EDTA...), mais qui peuvent aussi être à l'origine d'altérations chromosomiques et des mitochondries. L'association d'une enzyme et d'un agent chélateur assure une excellente dispersion cellulaire.

La fixation des cellules permet de les conserver dans un état aussi proche que possible de l'état vivant en provoquant une coagulation très fine de la matière vivante sans détruire les structures.

Elle a pour but :

- d'éviter l'autolyse des constituants fondamentaux sous l'effet des enzymes cellulaires, autolyse qui aboutirait à la transformation des protéines en aminoacides ;
- de précipiter les constituants cellulaires destinés à être analysés ;
- d'éviter les phénomènes de distorsion et de rétraction.

Dans l'analyse quantitative des acides nucléiques par cytométrie en flux, le but essentiel de la fixation est de consolider le substrat morphologique et d'assurer la préparation des structures cellulaires à la coloration. Le fixateur universel n'existe pas, tous ont des avantages et des inconvénients. Les composés le plus souvent utilisés sont l'éthanol ou le formaldéhyde [65].

1- Principe de fonctionnement :

La cytométrie en flux permet l'analyse multiparamétrique de plusieurs milliers de cellules isolées. Des mesures simultanées de caractéristiques physiques et biologiques peuvent être réalisées pour chacune d'elles. Chaque

cellule est entraînée par un fluide au centre d'une veine liquide. Elle traverse ensuite la source d'excitation lumineuse.

La cytométrie en flux se caractérise par deux principes :

- le guidage des cellules isolées en suspension à l'aide d'un flux laminaire liquide, assurant le défilement des cellules une à une devant une source lumineuse d'excitation, à une vitesse uniforme (1 à 10 m.s⁻¹) après un centrage hydrodynamique ;
- l'utilisation d'un système d'excitation et de détection permettant l'analyse d'une cellule en quelques microsecondes.

La source d'excitation lumineuse doit permettre une excitation des colorants utilisés à une longueur d'onde proche de leur maximum d'absorption. Elle doit être puissante, stable et nécessite une bonne focalisation (Figure 24).

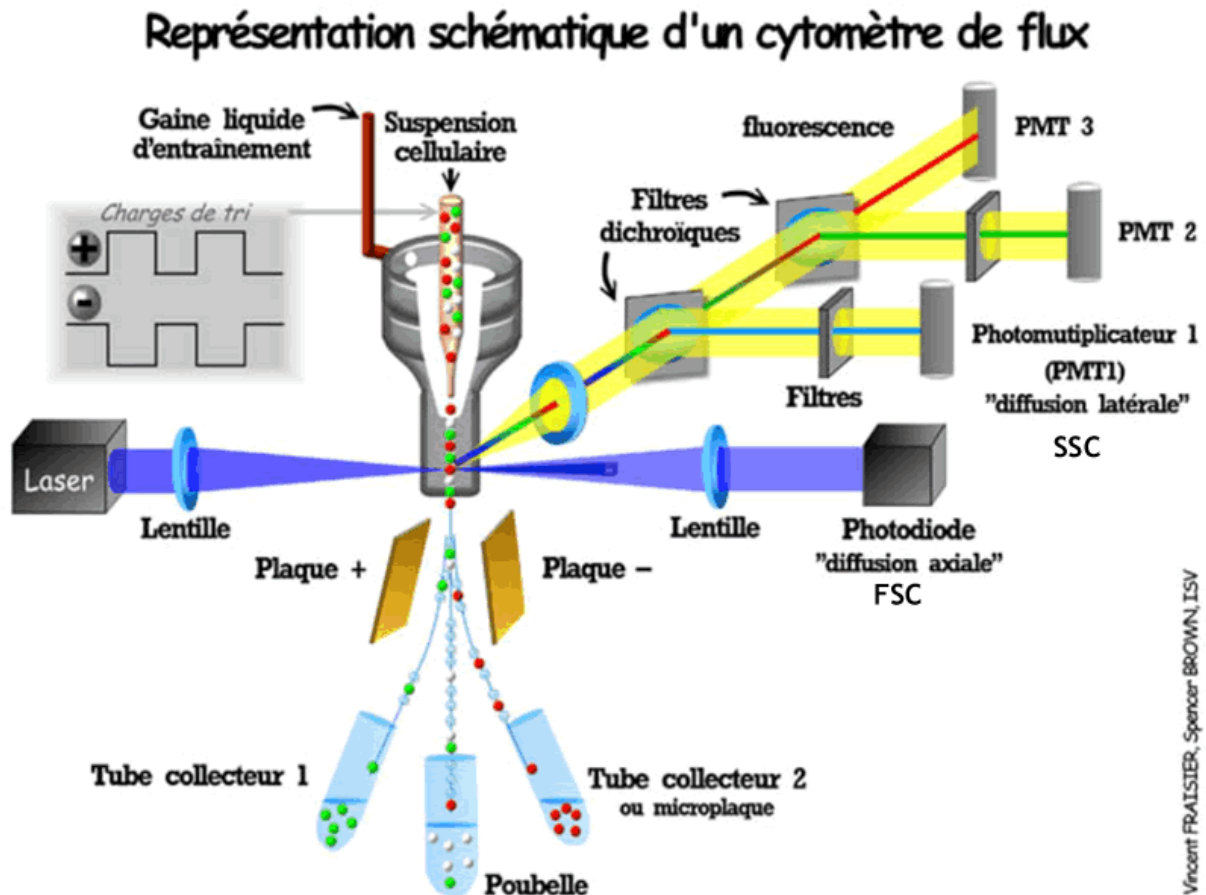


Figure 24 : Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux [66]

Les signaux optiques ou physiques émis par la cellule en suspension, coupant le faisceau de la source lumineuse, sont ensuite analysés. Ils sont reliés aux propriétés optiques intrinsèques (diffusion lumineuse liée aux dimensions de la particule, structure interne, autofluorescence de certaines cellules) ou induites par fluorescence (marquage de structures ou de fonctions cellulaires). Ces

différents paramètres optiques permettent d'obtenir des informations cellulaires (Tableau III).

Tableau III: Informations données par la cytométrie en flux [65].

Paramètres optiques	Signaux	Informations
Diffusion de la lumière aux petits angles	Proportionnelle au diamètre, volume cellulaire	Taille des cellules
Diffusion de la lumière à angle droit	Fonction du contenu cellulaire	Hétérogénéité cellulaire
Fluorescences	Couleur et intensité, proportionnelles à l'intensité du marquage	Marqueur cellulaire, ADN, ARN, fonctions cellulaires

2- Analyse morphologique : Laser scanning cytometer (LSC) :

Les propriétés de diffusion de la lumière des cellules peuvent être utilisées pour analyser les modifications de taille et de granulosité. Après intersection du rayon incident, la cellule diffracte la lumière (Figure 25). L'intensité de la lumière diffusée dans l'axe (angle $< 12^\circ$), est proportionnelle à la taille de la cellule (FSC : Forward SCatter) ; celle diffusée à 90° est représentative de son contenu cytoplasmique, sa granulosité (SSC : Side SCatter) [45].

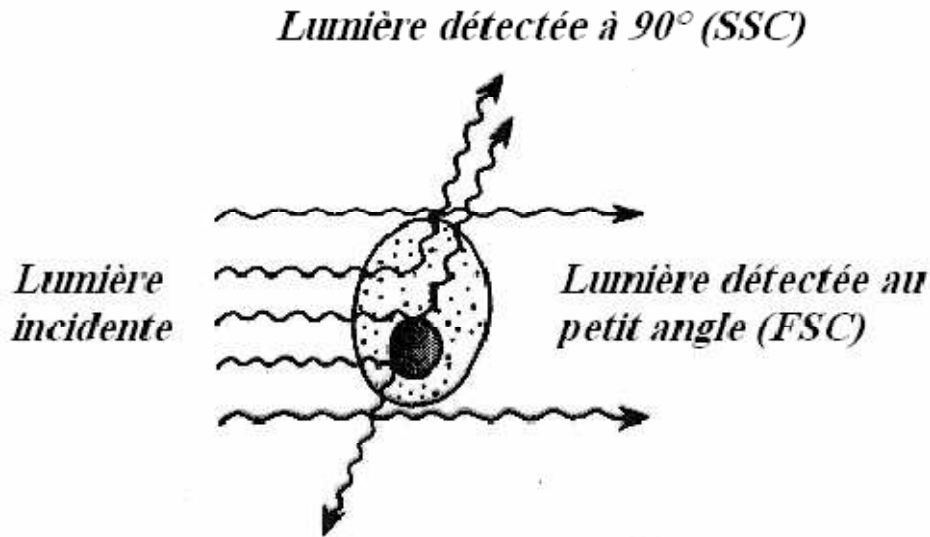


Figure 25 : Incidence de la lumière sur la cellule [67]

Les signaux détectés par le système optique sont amplifiés, convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques qui sont analysées grâce à l'unité informatique du cytofluorimètre.

L'affichage simultané des paramètres, FSC, SSC traités par le logiciel, visualise chaque cellule sur écran sous forme de point. On obtient un cytogramme, nuage de signaux punctiformes (Figure 26).

L'apoptose est accompagnée d'une perte d'eau, une contraction de la cellule et d'une fragmentation de l'ADN, non présentes lors de la nécrose. Ainsi, les cellules apoptotiques et nécrotiques diffèrent par leur motifs de diffusion de la lumière ; les cellules apoptotiques diffractent moins la lumière vers l'avant, du fait de leur petite taille, mais plus à 90° (contenu condensé) que les cellules

viables, reflétant une plus petite taille et une variation de la densité du noyau et du cytoplasme (Figure 26) [55].

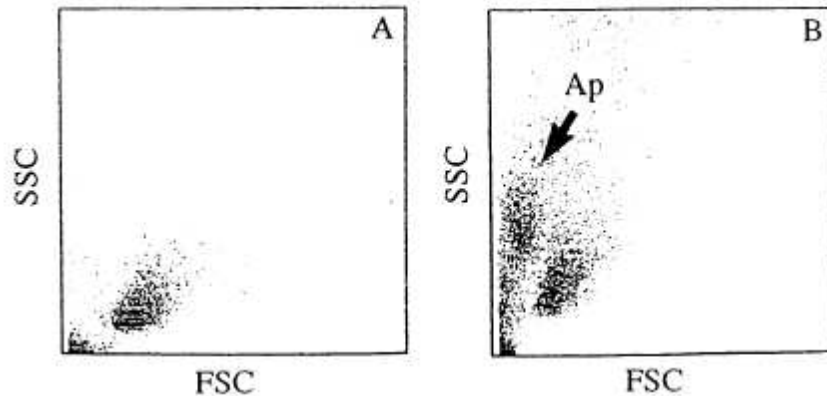


Figure 26 : Analyse des paramètres morphologiques cellulaire par LSC [45]

A : cellules non traitées, B : cellules traitées par dexaméthasone

Ap = cellules apoptotiques : Faible FSC, Haute SSC

En principe, l'analyse des paramètres morphologiques par cytométrie en flux est une méthode rapide et objective pour dénombrer les cellules apoptotiques. Selon les deux paramètres FSC et SSC, il est possible de distinguer différentes populations cellulaires et de tracer le contour de la population à étudier en excluant, d'une part, les débris sur les critères de petite taille (FSC) et petite granularité (SSC) et d'autre part, les agrégats situés très haut dans la partie supérieure de l'écran. La zone d'intérêt ainsi délimitée (appelée fenêtre ou région) est la population cellulaire homogène. Seules les valeurs concernant cette région sont analysées par un logiciel.

3-Analyse des fonctions cellulaires par fluorescence :

Le laser produit une lumière monochromatique qui excite spécifiquement un fluorochrome à une longueur d'onde donnée. Les fluorochromes sont des substances capables, lorsqu'elles reçoivent un rayonnement incident d'une certaine longueur d'onde, de réémettre une radiation de longueur d'onde supérieure. Ils peuvent se fixer directement sur un élément cellulaire comme ADN, ARN, protéines ou être conjugués à un anticorps spécifique d'un constituant cellulaire.

On détermine alors les pourcentages de cellules marquées et la quantité de l'élément étudié présent dans les cellules, grâce à l'intensité du marquage. L'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de cet élément.

Les analyses morphologiques (LSC) et de fluorescence peuvent être couplées. Des points apparaissent représentant chacun une cellule en fonction de sa taille et de la fluorescence qui lui est associée.

Différents fluorochromes sont à disposition. Certains sont spécifiques d'éléments cellulaires permettant de les quantifier via l'intensité de fluorescence émise ; d'autres sont liés à un marqueur spécifique d'éléments cellulaires servant d'étiquette pour un marqueur cellulaire non fluorescent dont le site de fixation est connu.

La détection de plusieurs paramètres n'est limitée que par les sources d'excitation disponibles. Ainsi, sont souvent utilisés l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et la phycoérythrine-R (PE), qui sont excitable à la même longueur d'onde, mais qui émettent à 2 longueurs d'onde bien séparées permettant ainsi de récupérer 2 signaux différents.

Les signaux émis sont focalisés, séparés puis acheminés vers des systèmes de détection, photomultiplicateurs. Pour les signaux de fluorescence, on utilise un photomultiplicateur (PMT) qui a pour rôle de convertir une énergie lumineuse en énergie électrique puis d'amplifier celle-ci pour permettre sa mesure précise par les composants électroniques du cytomètre. La réponse du PMT est fonction de la longueur d'onde qu'il reçoit.

Les endonucléases conduisant à la fragmentation de l'ADN puis à la perte importante d'ADN, l'apoptose peut être mise en évidence par simple mesure du contenu d'ADN en utilisant un colorant intercalant de l'ADN comme l'iodure de propidium (PI) , le bromure d'éthidium (EB), l'acridine orange (AO) ou des colorants se liant à l'extérieur de l'ADN comme Hoechst 33342, DAPI (4'-6-diaminido-2-phenylindole) [68 ,69].

L'iodure de propidium (PI) et le bromure d'éthidium (EB) sont des agents intercalants de l'ADN (sans spécificité de base), de structures chimiques similaires, qui ne peuvent pas traverser une membrane cytoplasmique intacte. Ils

pénètrent, par contre, dans les cellules dont la membrane est endommagée : ils sont donc utilisés comme marqueurs de cellules mortes (nécrotiques), marqueurs de l'intégrité membranaire. La combinaison de coloration, à l'aide de Hoechst 33342 et d'une solution d'iodure de propidium, qui ne diffuse pas à travers les membranes intactes, permet de différencier et quantifier les cellules apoptotiques, nécrotiques et viables [70].

La translocation de la phosphatidylsérine (PS) du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique pendant l'apoptose, peut être détectée par l'annexine V (Perte de l'asymétrie de la membrane phospholipidique). Les paragraphes suivants abordent différentes méthodes utilisant la fluorescence en cytométrie en flux [71].

3.1 Modification au niveau de la membrane plasmique :

3.1.1 Modification de la perméabilité :

Les colorants cationiques, tels que l'iodure de propidium, le bromure d'éthidium ou la 7- actinomycine (7-AMD), ne pénètrent pas les cellules à membrane intacte. Ils permettent donc de mettre en évidence les cellules mortes et ainsi de faire un sondage sur la viabilité des cellules.

- ***Iodure de propidium et bromure d'éthidium***

Le l'iodure de propidium (PI) et le bromure d'éthidium (EB) sont des agents intercalants de l'ADN (sans spécificité de base), de structures chimiques similaires, ne traversant que les membranes cytoplasmiques endommagées. Ils

permettent ainsi de mettre en évidence, des cellules apoptotique perméabilisées, hypodiploïdes et les phases du cycle cellulaire [72,45].

- ***Diacétate de fluorescéine***

Le diacétate de fluorescéine (FDA) permet d'évaluer la perméabilité membranaire. Non chargé, il passe facilement la membrane plasmique (transport passif) et est clivé en fluorescéine par les estérases des cellules vivantes, cette fluorescéine libre chargée positivement sort plus lentement que ne rentre son ester. Elle est donc retenue dans les cellules vivantes ; Ce composé peut être, par exemple, utilisé en combinaison avec le iodure de propidium. [73].

- ***7-aminoactinomycine-D***

La 7-aminoactinomycine-D (7-AAD) est un analogue rouge fluorescent de l'actinomycine-D, spécifique de l'ADN, qui s'intercale dans les régions GC de l'ADN. Durant le procédé de mort cellulaire, la membrane plasmique s'altère progressivement et devient perméable à ce colorant, ce test a été initialement décrit pour la détection et la quantification de l'apoptose [74].

3.1.2 Perte de l'asymetrie de membrane phospholipidique

Les cellules viables présentent une membrane plasmique asymétrique (Figure 27). La phosphatidylsérine n'est présente qu'au niveau interne de la bicouche lipidique. Pendant l'apoptose précoce, la phosphatidylsérine est transloquée de la face interne de la membrane plasmique à la face externe et est identifiée en utilisant un conjugué fluorescent de l'annexine V (Figure 28) [75].

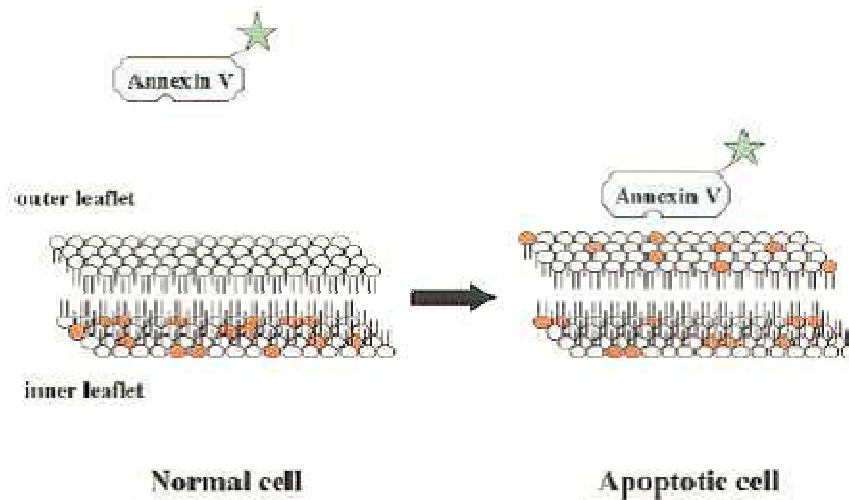


Figure 27 : Représentation schématique de la perte d'asymétrie de la membrane plasmique durant l'apoptose et du test à l'annexine V [75]

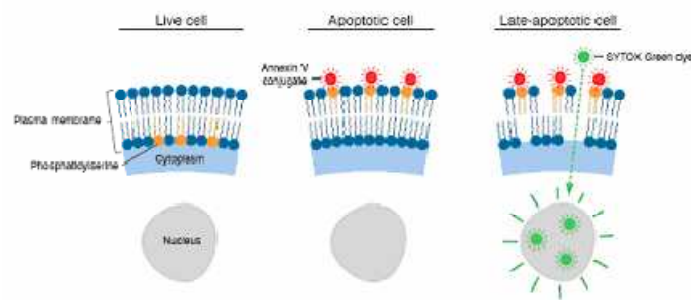


Figure 28 : Principe du test à l'Annexine V [75]

L'annexine V est une protéine capable de se lier à la phosphatidylsérine. Pour les analyses, elle est conjuguée à un marqueur tel que la biotine ou la fluoresceine (FITC). Elle ne peut donc pas se lier aux cellules viables, ne présentant pas de phosphatidylsérine à la surface. Chez les cellules nécrotiques,

au contraire, ceci est possible du fait de la perte d'intégrité de la membrane. Pour différencier les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques, on utilise en complément un colorant tel que l'iodure de propidium (PI) ou la 7-actinomycine-D. Cette analyse peut être effectuée par cytométrie en flux (Figure 29) ou microscopie (Figure 30) [75,72].

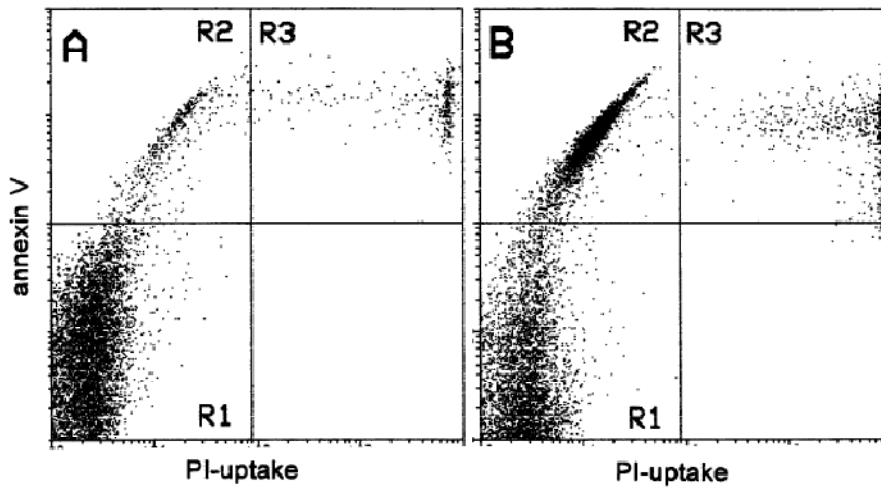


Figure 29 : Analyse PI/Annexine V-FITC de cellules de thymocytes de rat [75]

A : non traitées, B : traitées par dexaméthasone ; R1 : viables (-/-), R2 : apoptotiques (Annexine+/PI-), R3 : R3 :mortes, nécrotiques (+/+)

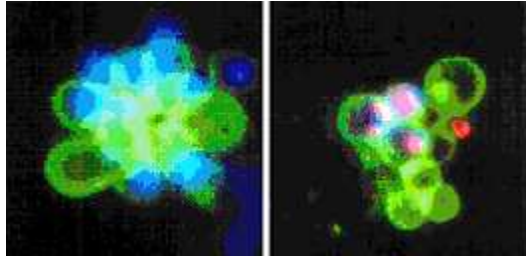


Figure 30 : Marquage de cellules MR65 cultivées en présence de 200 μ M d'olomoucine, inducteur de l'apoptose [75]

Après 4,5 h, les cultures sont incubées avec Annexine V-FITC, PI et Hoechst 33342

A gauche : cellule apoptotique, à droite : cellule nécrotique (Annexine V (vert), PI (rouge), Hoechst (bleu))

3.2 Perte du potentiel mitochondrial :

La perte de potentiel mitochondrial au début de l'apoptose peut être mesurée à l'aide de fluorochromes qui lui sont sensibles. La rhodamine 123 est un colorant spécifique de la mitochondrie. Il s'agit d'une cyanine cationique qui s'accumule dans les compartiments électriquement négatifs tels que les mitochondries, sans induire d'effets cytotoxiques. En cas de perte de potentiel mitochondrial, comme au début de l'apoptose, la rhodamine s'y accumule dans une moindre mesure. Un double marquage Rhodamine / PI peut être réalisé (Figure 31) [73].

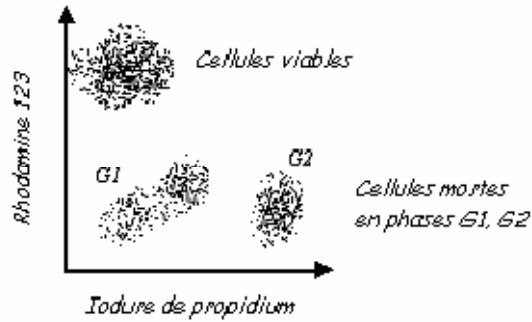


Figure 31 : Double marquage Rhodamine 123 /PI [73]

G1, G2 : phase du cycle cellulaire des cellules mortes (G1(2n), G2(4n))

La chlorométhyl-X-rosamine (CMX-Ros) est un marqueur, séquestré dans les mitochondries des cellules vivantes. Lors de la chute du potentiel mitochondrial pendant l'apoptose, cette molécule est libérée de la cellule [76].

Le marqueur JC-1

(5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazolcarbocyanine iodure) est une molécule lipophile (carbocyanine cationique) qui fluoresce en vert sous sa forme monomérique, en rouge lorsqu'il constitue des multimères. La charge négative établie par le potentiel membranaire mitochondrial permet à ce fluorochrome chargé positivement de s'accumuler dans la matrice mitochondriale ; Lorsque sa concentration augmente, des agrégats se forment et fluorescent en rouge. Dans les cellules apoptotiques, le potentiel mitochondrial diminue et le JC-1 ne peut s'accumuler dans la mitochondrie à une concentration suffisante. Il reste donc dans le cytoplasme ou dans la mitochondrie, sous sa forme monomérique verte (Figure 32) [77].

Le colorant JC-9 (3,3'-dimethyl- -naphthoxacarbo-cyanine iodure) présente un spectre similaire à JC-1, dépendant du potentiel, allant d'un produit fluorescent en vert à des agrégats rouges.

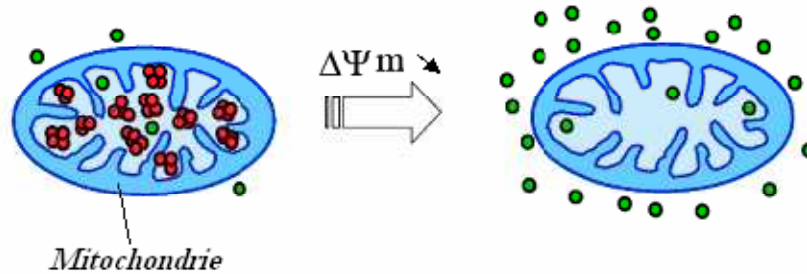


Figure 32 : Principe du marquage JC-1 [78]

Les marqueurs carbocyaniques de type DiOC₂(3), s'accumulent, à faible concentration, au niveau des mitochondries (Figure 31). Les cellules viables, aux membranes mitochondriales polarisées, émettent de fortes fluorescences contrairement aux cellules apoptotiques ou nécrotiques (Figure 33).

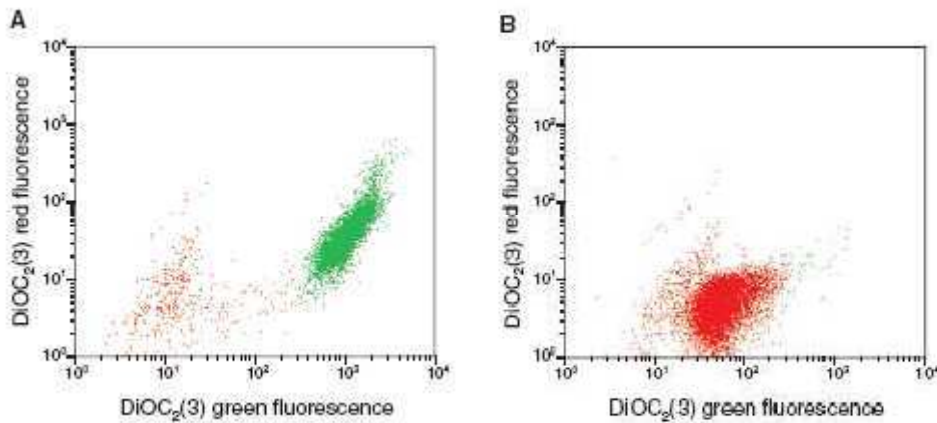


Figure 33 : Marquage au DiOC₂(3) de cellules Jurkat [78].

Non-traitées (A) or traitées au carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) qui rompt la membrane mitochondriale (B)

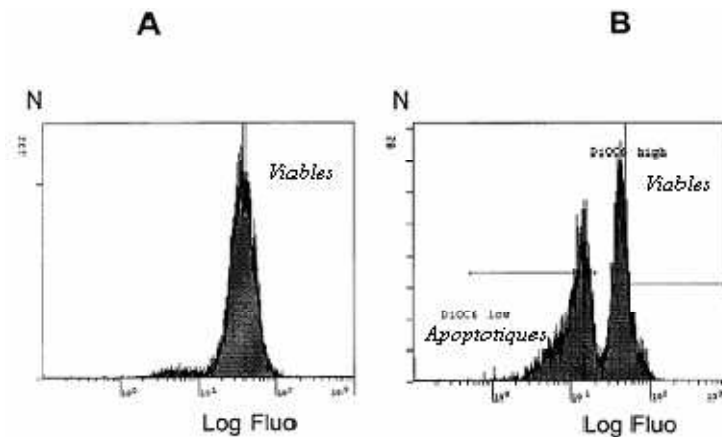


Figure 34 : Variation du potentiel mitochondrial [79]

A : Sans induction par camptothécine, B : avec induction

Les cellules avec une forte fluorescence DiOC6(3) sont viables, alors que autres sont apoptotiques

La nonyl acridine orange est connue pour ses propriétés de liaison à la cardiolipine au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Sa fluorescence diminue lorsque la cardiolipine est oxydée ou altérée pendant l'apoptose [80].

3.3 Condensation de la chromatine :

La condensation de la chromatine peut être mise en évidence à l'aide du marqueur Hoechst 33342 (bisbenzimidazole H 33342). Il s'agit d'un colorant

(fluorescence bleue) d'acides nucléiques spécifique des régions de l'ADN bicaténaire riches en AT. Il est facilement capté par toutes les cellules au début de l'apoptose alors que les colorants non perméants de la membrane tels que l'iodure de propidium et le bromure d'éthidium sont exclus. L'apoptose se poursuivant, la perméabilité de la membrane augmente, ce qui permet au iodure de propidium ou au bromure d'éthidium de pénétrer dans la cellule (Figure 35).

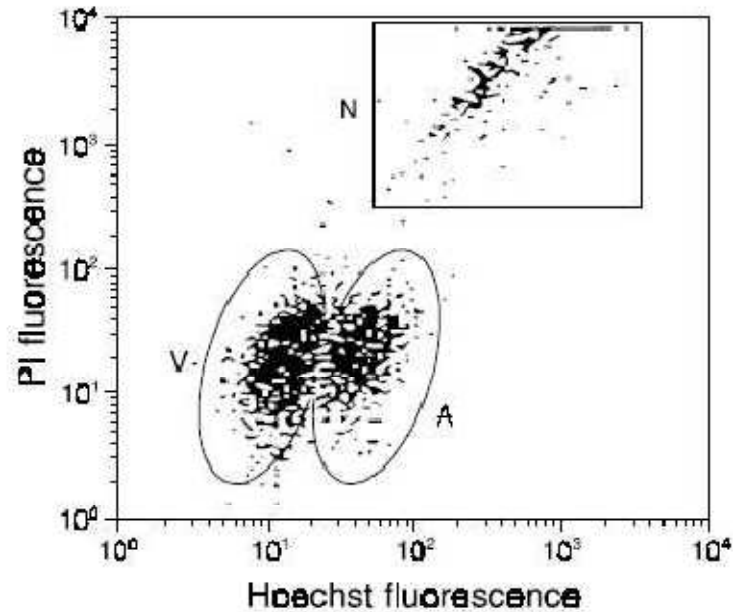


Figure 35 : Marquage Hoechst /PI [81]

V : viables, A : Apoptotiques, N : Nécrotiques

Sa fluorescence bleue est particulièrement lumineuse chez les noyaux condensés des cellules apoptotiques (Figure 35). Des associations de marqueurs sont également possibles avec la 7- aminoactinomycine-D, des colorants des acides

nucléiques (YOPRO...), la calcéine-AM ou Carboxy SNARF-1 (marqueur du pH intracellulaire)[78] .

3.4 Microfilaments d'actine :

Une perte rapide des structures de la surface cellulaire, tels que les pseudopodes et les microvillosités, intervient en parallèle des modifications nucléaires et cytoplasmiques chez un grand nombre de cellules entrant en apoptose .La F-actine est un constituant majeur de ces structures. [82]

Ces modifications donnent une surface lisse typique aux cellules apoptotiques en microscopie électronique. Les phallotoxines, une famille de peptides cycliques toxiques, se lient spécifiquement à l'actine et évite la dépolymérisation.

Ainsi, la FITC-phalloïdine, phallotoxine marquée, est utilisée afin de mettre en évidence la F-actine. Des anticorps fluorescents anti-actine peuvent également être utilisés [83].

3.5 Calcium cellulaire :

Le calcium joue différents rôles au niveau structural, électrique, en tant que co-facteur d'enzymes et protéines et régulateur intracellulaire. La concentration en ions calcium libres intracellulaires est maintenue à un faible niveau (de l'ordre de 0,1 nM) par rapport à la concentration externe du milieu. Le bas niveau en calcium est maintenu grâce aux pompes ATPase-Ca²⁺ de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique et par séquestration par les organelles. Une cellule saine maintient une concentration dix mille fois

inférieure à celle extérieure. Au moment de l'apoptose par contre, un influx de calcium survient. Les esters du colorant Quin-2 entrent dans la cellule et sont clivés par des estérases produisant des molécules qui augmentent la fluorescence, fonction de la concentration en ions calcium Ca^{2+} . Cependant, les colorants Fura-2 et Indo-1 sont 30 fois plus fluorescents. [42].

3.6 Activités caspasiques :

Un évènement caractéristique des premiers stades de l'apoptose est l'activation des enzymes caspases jouant un rôle déterminant en tant que médiateurs dans les évènements complexes biochimiques. Deux types de méthodes existent pour quantifier ces protéases: les techniques fluorimétriques et colorimétriques (Figure 36).

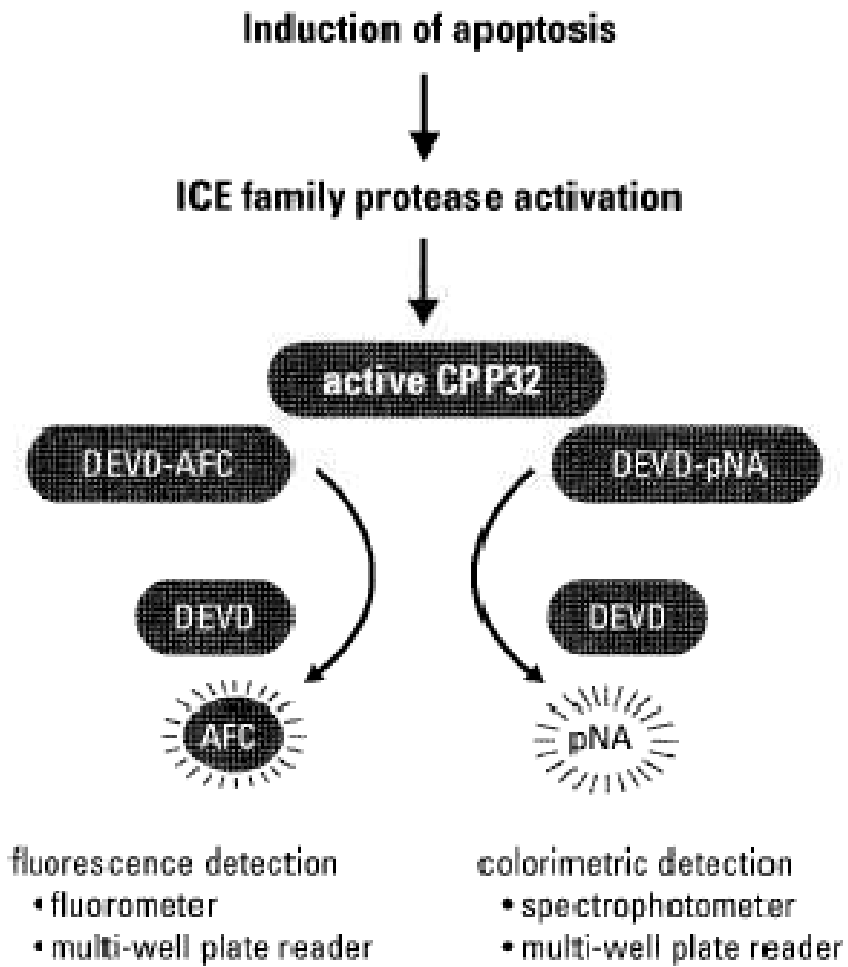


Figure 36 : Principe des méthodes fluorimétrique et colorimétrique [84]

3.6.1 Méthodes des substrats fluorimétriques :

La méthode fluorimétrique met en jeu des substrats, bisamides non fluorescents (Tableau IV).

Tableau IV : Exemple de substrats fluorescents des caspases [84]

<i>Séquence peptidique</i>	<i>Caspases cibles</i>	<i>Substrats</i>
DEVD = Asp-Glu-Val-Asp	3, 6, 7, 8, 1	Z-DEVD-AFC Z-DEVD-R110 Z-DEVD-AMC
IETD = Ile-Glu-Thr-Asp	8	Z-IEDT-AFC Z-IEDT-R110 Z-IEDT-AMC
LETD = Leu-Glu-Thr-Asp	8	Z-LETD-R110
YVAD = Tyr-Val-Ala-Asp	1, 4	Z-YVAD-AFC Z-YVAD-R110
VEID = Val-Glu-Ile-Asp	6	Z-VEID-R110
LEHD = Leu-Glu-His-Asp	9, 4, 5	Z-LEHD-AFC Z-LEHD-R110
LEED = Leu-Glu-Glu-Asp	13	Z-LEED-R110
YDVAD = Tyr-Asp-Val-Ala-Asp	2	Z-YDVAD-R110

Le bisamide non fluorescent est d'abord converti par la caspase activée en un monoamide fluorescent et ensuite en fluorophore encore plus fluorescent (Figure 37) [84].

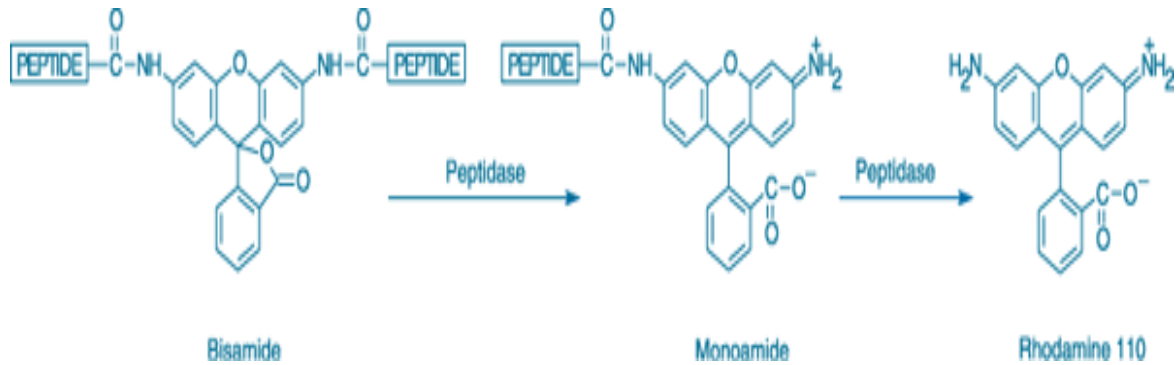


Figure 37 : Action des caspases sur les substrats bisamides de type Z-DEVD-R110 [85]

3.6.2 Méthodes des anticorps fluorescents :

On utilise un anticorps polyclonal anti-caspase-3 active, conjugué à phycoérythrine, pour suivre l'activation de la caspase-3 durant l'apoptose de cellules leucémique, induite par la daunorubicine (Figure 38). D'autres marqueurs fluorescents tels que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) peuvent être couplés à l'anticorps anti-caspase-3 active.

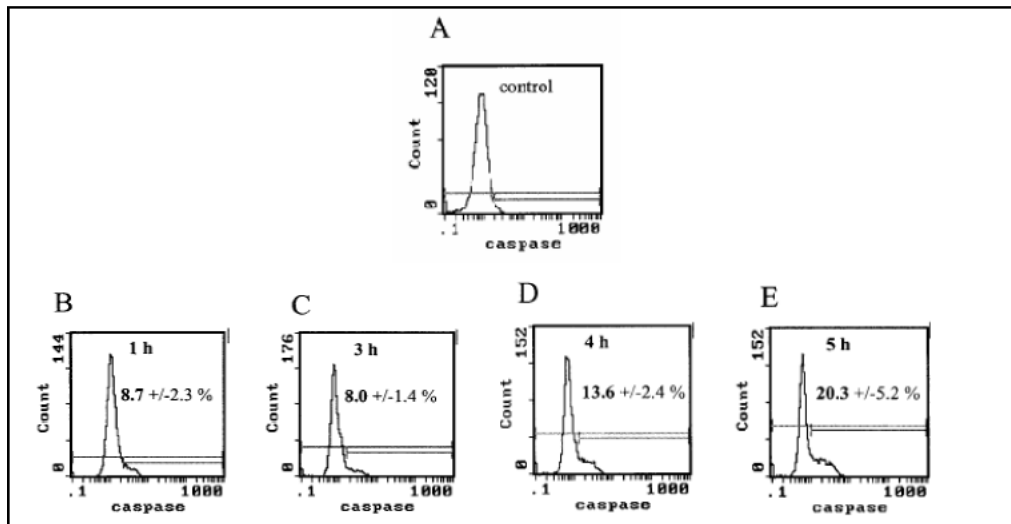


Figure 38 : Activation de la caspase-3 par la daunorubicine suivie par cytométrie en flux Cellules U937 [86]

(lignée de cellules leucémiques humaines issues d'un lymphome histiocyttaire) fixées et marquées à l'aide d'anticorps anti-caspase-3 active (clivée), après 1h (B), 3h (C), 4h (D) et 5h (E) après le début de l'expérience. A : contrôle négatif avec un anticorps non pertinent

Des expériences sur des cellules apoptotiques leucémiques de patients, atteints de leucémies myéloïdes aiguës et lymphoïdes aiguës, traitées par daunorubicine et idarubicine, et des lymphocytes normaux, ont montré la relation entre l'activation caspasique et la perte de l'asymétrie membranaire (Figure 39).

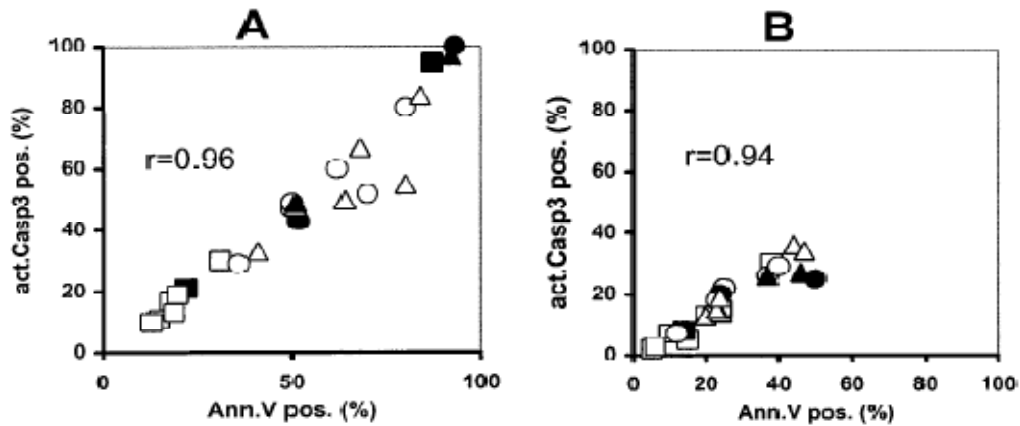


Figure 39: Activation de la caspase-3 liée à la modification d'exposition de la phosphatidylsérine [86].

Leucémie myéloïde aigue : symboles blancs, Leucémie lymphoïde aigue : symboles noirs

Daunorubicine : cercles, idarubicine : triangles, non traités : carrés

A : leukemic blast cells, B : lymphocytes

3.6.3 Méthodes colorimétriques spectrophotométrie:

Il existe également des substrats colorimétriques utilisables en spectrophotométrie. La libération de la p-nitroaniline est suivie à 405 nm :

- Caspase 1 : Ac-WEHD-pNA (Ac-Trp-Glu-His-Asp-pNA), YVAD-pNA...
- Caspase 3 : DEVD pNA, Ac-DEVD-pNA...
- Caspase 8 : Ac-IETD-pNA
- Caspase 9 : Ac-LEHD-pNA
- Caspase 10 : Ac-AEVD-pNA

Des inhibiteurs des caspases peuvent également être utilisés pour s'assurer que la fluorescence ou la densité optique est uniquement liée au clivage du substrat introduit (ex : DEVD-CHO (aldéhyde), DEVD-fmk (fluorométhylketone), z-VAD-fmk... Ces inhibiteurs peuvent être couplés à des marqueurs fluorescents (FITC) Ces composés peuvent être employés dans la prévention de l'apoptose [87 ,88].



Cinquième Partie :

L'apoptose en pathologie



L'apoptose est une méthode active de mort cellulaire qui joue un rôle fondamental dans le développement des organismes multicellulaires, ainsi que dans le maintien de leur homéostasie tissulaire. Tout dérèglement dans le programme d'exécution ou dans le contrôle du processus apoptotique peut donc potentiellement contribuer à la physiopathogénie de nombreuses maladies. Ainsi, un défaut d'apoptose se traduira par une prolifération cellulaire incontrôlée (cancer), alors qu'une stimulation inadaptée ou excessive de l'apoptose conduira à certaines maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, ainsi qu'à la disparition des lymphocytes CD4+ au cours du sida.

A- Apoptose et maladies auto-immunes :

L'étiologie de certaines maladies auto-immunes telles que La thyroïdite de Hashimoto ou syndrome de lymphoprolifération auto-immune non malin (ALPS) mettent en jeu la voie Fas.

Les lymphocytes T cytotoxiques sont capables d'induire l'apoptose de leurs cellules cibles. Pour ce faire, ils activent, entre autres, la molécule Fas (CD95/ Apo-1) à l'aide du ligand membranaire FasL. Fas est un récepteur à *death domain* présent à la surface de la cible et dont l'activation entraîne l'apoptose. Cependant, les lymphocytes T cytotoxiques activés synthétisent eux-aussi le récepteur Fas, et sont donc eux-mêmes sensibles à l'apoptose relayée par Fas. Celle-ci peut résulter d'une autoactivation de Fas par FasL à la surface

des lymphocytes T, contribuant ainsi à limiter le phénomène de cytotoxicité. Alternativement, un lymphocyte T activé peut être détruit par une cible qui synthétise également la molécule FasL. [89 ; 90]

B- Apoptose et cancer :

Les pathologies tumorales peuvent être définies comme une accumulation anormale de cellules résultant soit d'un excès de prolifération, soit d'un défaut d'apoptose ou encore de la combinaison des deux processus. Il est probable que la présence d'anomalies dans les voies de transduction du signal apoptotique contribue au développement initial des cancers et à l'apparition de cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie.

L'avancée récente des connaissances sur les voies moléculaires d'induction de l'apoptose a permis d'identifier des gènes jouant un rôle critique dans la régulation du processus apoptotique, et présentant des anomalies (mutations, translocations, pertes etc...) dans certains cancers.

La p53, peut être considéré comme le plus important gène suppresseur de tumeurs, ce gène est muté dans plus de 50% des cancers humains. En réponse à une variété de stress cellulaires, tels que l'hypoxie, le choc osmotique, les dommages de l'ADN, l'expression aberrante d'oncogènes, p53 est activé d'une manière transcriptionnelle et post-traductionnelle pour induire le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence cellulaire et l'apoptose.

La relation la plus intuitive entre la transactivation médiée par p53 et l'apoptose vient de sa capacité à contrôler la transcription des membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2. Ceci inclut BAX, PUMA, NOXA et BID. P53 peut aussi transactiver d'autres effecteurs de l'apoptose, comme le gène codant pour APAF-1.

L'apoptose par voie extrinsèque est aussi régulée par p53. Par exemple, les loci des gènes des récepteurs Fas/CD95 et DR5 ainsi que le gène codant pour le Fas ligand sont chacun une cible directe de p53. De plus, le fait que p53 transactive BID, peut faciliter le cross-talk entre les voies extrinsèque et intrinsèque. Par conséquent, p53 peut sensibiliser les cellules aux ligands de récepteurs de mort, soit en augmentant le taux de ligands, soit en induisant l'apoptose directement. P53 a aussi d'autres activités non transcriptionnelles comme la relocalisation des récepteurs de mort de l'appareil de Golgi à la surface cellulaire engageant ainsi la voie des récepteurs de mort. [91]

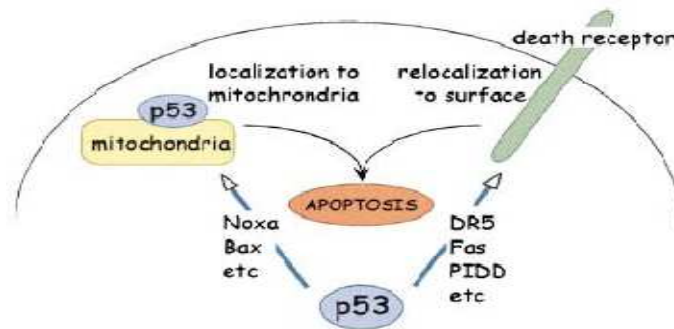


Figure 40: Les voies apoptotiques régulées par p53 [91].

C- Apoptose et maladies virales :

La réplication d'un virus dans une cellule cible a généralement pour conséquence la production d'un grand nombre de virions, qui vont disséminer et initier à leur tour de nouveaux cycles d'infection (pour la plupart des virus). Les virus codent des protéines hautement efficaces pour optimiser cette réplication. Cependant, l'organisme possède des systèmes de défense pour limiter l'infection virale en tuant les cellules infectées.

Une réplication virale réussie nécessite donc, non seulement une production et une dissémination des virions efficaces, mais aussi un « échappement » des virus à ces mécanismes de défense de l'hôte. Ces mécanismes de défense font le plus souvent intervenir les réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte. La plupart des virus, que ce soit des virus à ARN ou à ADN, déclenchent au cours de l'infection, un autre système de défense de l'hôte : l'apoptose.

Elle peut être réprimée par des gènes de survie ou activée par des gènes de mort cellulaire. Mais, face à de tels systèmes de défense, de nombreux virus développent tout un arsenal de protéines qui interfèrent avec ces gènes de régulation pour inhiber ou retarder ces actions protectrices permettant la production d'un nombre suffisant de virions. Ces protéines virales agissent sur un grand nombre de points stratégiques dans le processus d'apoptose par liaison directe, mimétisme fonctionnel ou homologie structurale.

Ces interactions sont particulièrement bien illustrées dans certains modèles : au niveau des récepteurs du signal initial membranaire (Fas), au niveau de la transduction du signal aux gènes de régulation (p53, pRb, bcl-2) ou par transactivation des protooncogènes (c-myc, c-fos, c-jun), et au niveau de la phase effectrice mettant en jeu les caspases.

Cette apoptose peut être le résultat d'une réponse cellulaire à l'infection, mais elle peut aussi être la conséquence inévitable de l'action de certaines protéines virales. De plus, il semble que certains virus codent des protéines qui induisent et se servent de l'apoptose comme moyen pour tuer et sortir des cellules, tout en favorisant la dissémination des virions. Dans ce cas, une très fine régulation entre l'inhibition et l'induction de l'apoptose est mise en place par l'expression séquentielle de protéines virales.

Il est maintenant bien établi qu'un grand nombre de virus responsables de pathologies agissent sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus apoptotiques [92].

1- Stratégies virales de régulation de la voie des récepteurs de mort

a) Inhibition de la voie des récepteurs de mort

Les protéines E3-10.4K et E3-14.5K des Adénovirus dégradent le récepteur Fas et diminuent ainsi son exposition à la surface des cellules .Le

manque en récepteur Fas provoque une résistance aux voies apoptotiques médiées par le FasL [93].

Le virus Epstein-Barr (EBV) a fait l'objet de très nombreuses études sur l'apoptose. Il code une protéine, LMP-1, qui contient plusieurs domaines capables d'interagir avec les molécules adaptatrices du récepteur au TNF, notamment TRAF et TRADD [94]

Ces interactions empêchent le recrutement des caspases donc la transduction du signal apoptotique initiée par la liaison du ligand au TNF-R.

La protéine de capsid du virus de l'hépatite C (VHC) bloque l'effet pro-apoptotique du TNF α en empêchant l'activation de la procaspase-8 [95] .

La protéine M-T2 du Myxomavirus est une protéine homologue au récepteur TNF-R cellulaire mais qui est non fonctionnelle. Cette protéine, quand elle est exprimée à la surface des cellules infectées, entre en compétition avec les TNF-R cellulaires pour la liaison du TNF α . Ainsi, M-T2 diminue voire empêche l'activation de la voie apoptotique induite par le TNF α [96].

Le virus de la variole bovine (Cowpox virus) produit trois protéines distinctes qui inhibent les voies de signalisation dépendantes de Fas ou du TNF-R : CrmB, CrmC et CrmD. CrmB et CrmD sont des homologues structuraux au TNF-R ; CrmC qui est soluble, lie avec une grande affinité le TNF α et ainsi

empêche sa liaison au TNF-R. Le blocage de la voie apoptotique induite par le TNF α se fait donc à deux niveaux [97].

Plusieurs virus Herpes codent des protéines nommées FLIP pour « FLICE Inhibitory Proteins » qui inhibent l'activation de la caspase-8. Les FLIP virales (vFLIPs) sont des isoformes de la caspase-8 ; elles contiennent deux DED mais pas de site catalytique actif. Ces vFLIPs se lient séparément à FADD et la caspase-8 et ainsi bloquent la formation du DISC.

Les vFLIPs bloquent l'apoptose induite par les récepteurs de mort CD95, TNF-RI, TRAMP/DR3 et TRAIL-RI, ce qui laisse supposer que ces récepteurs utilisent la même voie de signalisation pour induire l'apoptose. [98] .

b) Induction de la voie des récepteurs de mort

La protéine E1A des Adénovirus augmente la sensibilité des cellules infectées au TNF α et au FasL, par un mécanisme qui dépendrait de la liaison de p300, une acétyltransférase impliquée dans la régulation de l'expression de nombreux gènes cellulaires. Toutefois le mécanisme d'action de E1A n'est pas complètement élucidé [99].

La protéine moyenne T (« middle-T antigen ») du polyomavirus induit aussi une grande sensibilité des cellules infectées au TNF, mais uniquement en absence de la petite protéine T (« small-T antigen ») [100].

L'infection par le virus herpes humain HHV-6 provoque une augmentation de l'expression du TNF-R, facilitant la mort cellulaire induite par la liaison du TNF aussi bien au niveau des cellules infectées que les cellules non-infectées [101].

FAMILLE	GENRE	VIRUS		GENOME	PROTEINES	FONCTIONS
<i>Herpesviridae</i>	<i>Simplesvirus</i>	Human herpesvirus-1	HSV-1	ADN db	γ1 34.5 Us3 γ1 34.5	Déphosphoryle eIF-2α ? Inhibe totalement la synthèse protéique cellulaire
	<i>Varietofavirus</i>	Bovine herpesvirus	BHV-4		BOF1E2	vFLP3, inhibiteur de la caspase-8
	<i>Cytomegalovirus</i>	Human herpesvirus-5	HCMV		IE2	Inhibe la progression du cycle cellulaire
	<i>Moronegalovirus</i>	Equine herpesvirus-2	EHV-2		Unknown, (IE1 ?)	Séquestre p53 dans le cytoplasme
	<i>Lymphocryptovirus</i>	Human herpesvirus-4 Epstein-Barr Virus	EBV		E8	vFLP3, inhibiteur de la caspase-8
	<i>Rhabdovirus</i>	Human herpesvirus-0	HHV-2		K13 KS-9612 LAV4	vFLP3, inhibiteur de la caspase-0 homologue à Bcl-2 Code un inhibiteur de p53
	"Marik's disease-like viruses"	Saimiri herpesvirus-2	Virus Saimiri		ORF1 ORF6	vFLP3, inhibiteur de la caspase-8
<i>Hidoviridae</i>	<i>Hidovirus</i>	African Swine Fever Virus African Swine Fever Virus	ASFV (BartV) ASFV (Mabaw)	ADN db	A179L p21 LMWS-HL (S-HL) A224L	Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2 Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2 Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2 Homologue de IAP
<i>Papillomaviridae</i>	<i>Papillomavirus</i>	Bovine Papillomavirus Human Papillomavirus	BPV BPV HPV	ADN db	E5 E8 E6	Empêche l'apoptose induite par la caverine en U1-3 Inhibe l'apoptose induite par les UV Dégrade p53 par la voie ubiquitine
<i>Polyomaviridae</i>	<i>Polyomavirus</i>	Simian Virus 40	SV40 SV40 SV40	ADN db	T M LI	Blocke le signal TNF Active PI-3K en réponse à la phosphorylation de E6d via Akt Fixage le signal Fas Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2 Inhibe p53, bloque l'apoptose

Tableau V : Virus ADN inhibant l'apoptose [102]

FAMILLE	GENRE	VIRUS	GENOME	PROTEINES	FONCTIONS
<i>Adenoviridae</i>		Adenovirus human	ADN ds	F1R-19k E3-14.7k RD (E1 11k, 4k, 5k) RD (E3 10,4k, 5k) F1R-19k E1B-55k E4orf6 E1E-55k/Eorf6 complex	Act-vif anti-apoptotique, homologue de P4-12 Eloque (action P4,2 Eloque (action P1,2) Degrade Fts Intra-act avec FAD Le 553, réprime la transactivation et bloque l'apoptose Le 553, réprime la transactivation et bloque l'apoptose Degrade p53
<i>Baculoviridae</i>	<i>Muticopolyhedrovirus</i> <i>Granulovirus</i>	Autographa californica nuclear polyhedrosis virus Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus Oryctolypeus pseudotrogata polyhedrosis virus Cyatho pomonella grandisalis virus Baculovirus	ACNPV BmNPV OpMNPV SpCV	ADN ds circulaire p35 p35 Op-14P Op-14P Op-14N	S et I des caspases S et I des caspases IAP IAP IAP
<i>Herpesviridae</i>	<i>Orthoherpesvirinae</i>	Herpes B virus	ADN ds circulaire	HbV (gX) IAP	Inhibe l'53, inhibe la transactivation et l'apoptose
<i>Poiviridae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>	Cowpox virus Vaccinia virus	ADN ds	CMB Cmc CmcD CmcK CmcL CHCiv E3 K3L E3 B13R (SP-2) B22R CHCiv (CP77) A53R	Homologue au TNF-R Homologue au I1+R (soluble) Homologue au TNF-R Sertine Affecte l'organisation de l'hôte Affecte l'organisation de l'hôte Inhibe P1R K3L Inhibe P1R Inhibe P1Rase L Sertine Sertine Affecte l'organisation de l'hôte Homologue au TNF-R
	<i>Molluscipoxvirus</i> <i>Lepoipoxvirus</i>	Molluscum Contagiosum Virus Myxomavirus (Sarnelli) Rabbitpox virus Shope fibroma virus	MCV 	MCI59MCI60 W006L M12 M-14 M-15 M1-L Serp-2 SP-1 SP-2 SFV-12 M1R	VFLPs Antioxydant Homologue au TNF-R ? ? ? Protéine transmembranaire Sertine Sertine Sertine Homologue au TNF-R ?

Tableau VI : Virus ADN inhibant l'apoptose. [102]

FAMILLE	GENRE	VIRUS	GENOME	PROTEINES	FONCTIONS
Flaviviridae	Hepatitisvirus	Hepatitis C virus	HCV ARN sb +	Core protein Core protein Core protein	Active NF- κ B = inhibition de l'apoptose médiée via Fas et TNF- α Interagit avec le domaine cytoplasmique du récepteur au TNF Bloque la transcription de p53
Orthomyxoviridae	Influenzavirus A	Influenza A virus	ARN sb -	NS1	Inhibe PI3K
Picornaviridae	Cardiovirus	Theiler's murine encephalomyelitis virus	TMEV ARN sb +	L*	?
Reoviridae		Reovirus	ARN db (++)	σ 3	Inhibe PI3K
Retroviridae	Lentivirus	Human immunodeficiency virus - 1 Human immunodeficiency virus - 2	HIV-1 HIV-2 ARN sb +	Tat Vpr	Sur-régule Bcl2 Supprime l'apoptose induite via TOR en inhibant l'activité NF- κ B
	Deltaretrovirus	Human T-cell leukemia virus	HTLV-1	Tax	Bloque la transcription médiée par p53
Togaviridae		Classical swine fever virus	CSFV ARN sb (+)	Ems	?
			*HIV83	MI1	Activité anti-apoptotique, homologue de Bcl-2

Tableau VII : Virus ARN inhibant l'apoptose. [102]

Le syndrome d'immunodéficience associé à l'infection par le VIH est caractérisé par la diminution progressive dans le sang du nombre de lymphocytes T exprimant le récepteur CD4.

L'infection par le VIH de lymphocytes T CD4 conduit rapidement à leur destruction par un processus d'apoptose. Dans les cellules infectées, l'apoptose est déclenchée par la liaison de la protéine d'enveloppe du VIH (gp120) au récepteur CD4. Des expériences effectuées en présence d'AZT ont indiqué que l'induction du programme de mort cellulaire programmée nécessite la réplication du virus. Par ailleurs, des cellules chroniquement infectées par le VIH peuvent aussi servir d'inducteur d'apoptose *in vitro* dans des cellules non infectées, ce processus est déclenché au cours de la formation de syncytia, issus de la fusion entre une cellule infectée exprimant la protéine gp120 et une cellule non infectée exprimant le récepteur CD4.

Il existe d'autres protéines du VIH autres que gp120 ayant des effets proapoptotiques. Par exemple la protéine trans-activatrice Tat est un des produits des gènes précoces du VIH : elle sensibilise certains types cellulaires à la mort apoptotique en interagissant avec les voies du Fas ou TNF- α [103].

Elle augmente la sensibilité à l'apoptose *via* Fas en sur-régulant la caspase-8 (Bartz & Emerman, 1999). La forme sécrétée de la protéine Tat est capable d'induire l'apoptose des cellules non-infectées [104].

Ce phénomène de déplétion cellulaire médiée par Tat contribue en partie à l'immunodéficience liée à l'infection par le VIH-1. La conséquence de cet excès d'apoptose prématurée est la destruction des effecteurs antiviraux, et notamment les lymphocytes T « helper » producteurs de cytokines de type I (IL2, IFN γ), essentiels au maintien d'une réponse cytotoxique CD8 antivirale. Tat diminuerait également l'expression de Bcl-2, une protéine cellulaire antiapoptotique. En outre, la protéase du VIH cliverait Bcl-2 [105]. Des études *in vitro* ont montré que les cellules infectées par le VIH sont plus sensibles à l'apoptose induite par Fas. Les auteurs ont montré que l'augmentation de sensibilité des cellules infectées par le VIH à la voie Fas est associée au produit du gène vpu du VIH [106].

D'autre part, il a été montré que Nef, une autre protéine virale, augmente l'expression à la fois de Fas et de FasL, à la surface des cellules, et que la capacité de Nef à interagir avec des kinases cellulaires était requise pour l'augmentation de ces expressions et pour l'apoptose.

Enfin, une des protéines accessoires du VIH, Vpr, induit aussi l'apoptose de cellules T non infectées. En effet l'ajout de protéine synthétique Vpr sur des cellules T intactes, provoque une chute rapide du potentiel mitochondrial membranaire, ainsi que la libération du cytochrome c et une apoptose cellulaire [107].

D- Apoptose et maladie neurodégénératives :

1-Maladies d'alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) touche 50 à 60 % des personnes atteintes de maladies neurodégénératives. Il existe des formes héréditaires (génétiques) et sporadiques de cette maladie. Elle se caractérise par une perte progressive de la mémoire à court terme puis à long terme, par une diminution des capacités intellectuelles et, parfois, par des troubles moteurs. Les régions du cerveau les plus touchées sont le cortex rhinal et l'hippocampe, impliqués dans les processus de mémorisation, au sein desquels les neurones cholinergiques sont particulièrement sensibles à l'apoptose. Les caractéristiques majeures retrouvées dans ces zones de mort sont un dépôt et accumulation important de peptides β -amyloïde (β A), composant des plaques séniles, ainsi qu'une dégénérescence neurofibrillaire.

Cette accumulation exercerait une pression neurotoxique sur les mitochondries qui entraînerait leur gonflement et un relâchement du cytochrome C dans le cytosol. Le cytochrome C cytosolique va activer la pro-caspase 3 conduisant à l'apoptose neuronale ainsi qu'à une neurodégénérescence .

De plus, la présence de plaques β -amyloïdes, *in vivo*, induit, chez des souris transgéniques, une modification de l'homéostasie cellulaire au niveau de la régulation du Ca^{2+} intracellulaire. Ce dérèglement entraîne l'activation des

calpaines, un dysfonctionnement de la mitochondrie, l'activation des caspases et l'activation de la mort cellulaire par apoptose [108 ; 109]

2- Maladie de parkinson

La maladie de Parkinson (MP) se caractérise par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta couplée à des inclusions intracytoplasmiques nommées “corps de Lewy”. Cette mort cellulaire provoque une déficience en dopamine (DA) dans les régions innervées par ces cellules, soit le putamen et le noyau caudé (dans le corps strié).

Il existe plusieurs facteurs pouvant influencer le développement de la MP, comme des herbicides, des produits chimiques industriels ou encore de la pâte à papier émanant d'usines, mais aucune toxine spécifique n'a été retrouvée dans le cerveau de parkinsonien. Il faut cependant considérer que 5 à 10 % de ces patients ont une forme familiale, autosomique dominante. Il a été observé qu'une drogue chimique appelée 1,2,3,6-méthyl-phényl-tétrahydropyridine (MPTP) provoquait des syndromes semblables à ceux de la MP, aussi bien cliniques que pathologiques. C'est la conversion du MPTP en ion pyridinium (MPP⁺), dans les astrocytes, qui le rend toxique. Le MPP⁺ est d'ailleurs très employé dans l'étude de l'apoptose au sein de la MP. Cette drogue agit en fait en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Il faut mentionner qu'une diminution d'activité de 30 à 40% de ce complexe a été observée chez les patients atteints de MP [110].

Des expériences réalisées sur différentes cellules neuronales ou lignées cellulaires, soumises à des concentrations variées de MPP+, ont révélé que la mort cellulaire pouvait aussi bien être due à l'apoptose qu'à la nécrose. Cependant, la neurotoxicité de nature apoptotique conduit à une activation de protéase de type caspase-3 qui, par conséquent, pourrait être bloquée par différents inhibiteurs de caspases [111].

De plus, il a été montré que des souris déplétées en Bax étaient plus résistantes à la neurotoxicité provoquée par le MPTP que les souris témoins. Étant donné que Bax semble jouer un rôle important dans ce processus de mort, il pourrait éventuellement servir comme cible thérapeutique [112].

Un autre type de toxicité peut être envisagé dans la neurodégénérescence de la MP. Il implique, en fait, une trop forte excitation ("exocytotoxicité") des récepteurs à glutamate, nombreux sur les neurones dopaminergiques, ce qui a pour effet de générer un influx de calcium dans la cellule, induisant donc la mort cellulaire [113].

3- Maladie de Huntington

Une autre des maladies neurodégénératives encore peu connues à l'heure actuelle est la maladie de Huntington (MH). Il s'agit d'une pathologie héréditaire à caractère dominant, causée par une mutation sur le petit bras du chromosome 4. Elle se caractérise par un changement progressif du comportement, des déficiences cognitives, un manque de coordination dans la

motricité et des mouvements involontaires choréiques. Le site majeur de cette pathologie est le corps strié (striatum), où 90 % des neurones sont perdus.

La mutation observée dans la MH correspond au prolongement de la répétition des trinuécléotides CAG sur l'exon 1 du gène codant pour la protéine huntingtine. Les individus qui ne sont pas atteints de la MH ne possèdent que 6 à 34 répétitions CAG, alors que les patients atteints de cette pathologie ont entre 36 et 120 répétitions. Cette élongation se traduit par une expansion de polyglutamine dans la région N-terminale de la protéine. Les mutants de la huntingtine s'agrègent par leur extrémité N-terminale modifiée et forment des inclusions nucléaires dans les neurones striés et corticaux. Le mécanisme à travers lequel les mutants de la huntingtine provoquent la neurotoxicité est encore inconnu.

Néanmoins, des hypothèses sur la participation des récepteurs au glutamate, de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate), induisant une exocytotoxicité, ont été émises [114].

Bien qu'on ne connaisse pas exactement les voies apoptotiques impliquées dans la MH, les caractéristiques propres à l'apoptose ont été observées dans les cellules contenant la protéine huntingtine, sauvage ou mutée.

In vitro l'huntingtine est clivée par la caspase 3 et ce clivage se fait de façon proportionnelle à la taille du domaine polyglutamique de l'huntingtine.

Des inhibiteurs de caspases ont été testés sur ces mêmes cellules. Le Z-VAD-fmk, inhibiteur irréversible de la majorité des caspases, le Z-DEVD-fmk, inhibiteur des caspases exécutrices 2, 3 et 7 semble augmenter la survie, mais pas diminuer les inclusions nucléaires et cytoplasmiques, n'augmente pas la survie des cellules, mais réduit les inclusions nucléaires et cytoplasmiques [95].

Saudou et al. ont également mis en évidence le fait que la perte sélective des neurones du corps strié est de nature apoptotique. D'autre part, on a observé que le modèle de souris transgéniques pour la MH, comprenant en outre une mutation dominante négative pour la caspase-1, augmentait considérablement leur survie et diminuait les inclusions neuronales [115, 116, 117].

4- Ischémie cérébrale

Il est assez difficile de caractériser ainsi que de localiser la mort des cellules dans l'ischémie. Leur vulnérabilité dépend des récepteurs membranaires et des connexions intrinsèques qu'elles possèdent. Dans l'hippocampe, ce sont les régions CA1, CA2 puis CA3 qui sont les plus touchées (en ordre décroissant), tandis que dans le cerveau entier, les parties les plus vulnérables à l'ischémie sont les couches 2, 3 et 5 du néocortex, le corps strié et la substance noire pars reticulata. La profondeur et la durée de l'ischémie déterminent la rapidité et le type de mort neuronale. Si l'ischémie est transitoire ou moins sévère, des changements morphologiques de type apoptotique sont observés.

Dans la forme globale, la mort neuronale paraît souvent en différé. Dans les cas d'ischémie focale, le traumatisme se localise dans une seule région du cerveau. On observe, cependant, une zone centrale où la mort cellulaire est dense, et autour de celle-ci, une "zone de pénombre" où les cellules sont vivantes, mais fonctionnellement silencieuses. Leur sort dépend alors beaucoup de la gravité de l'ischémie et des variations ultérieures du débit sanguin.

Dans l'ischémie globale transitoire, l'activation de caspases ou l'inhibition de la mort cellulaire par l'ajout d'inhibiteurs de caspases ont pu être observées à maintes reprises. Des neurones CA1 de gerbille ont presque entièrement été protégés de la mort à l'aide d'un inhibiteur de caspases, autre que la caspase-1. Une expérience semblable faite chez le rat a démontré 40 % de survie des neurones CA1 trois jours après l'ischémie, et 20 % 7 jours après.

D'autres changements biochimiques peuvent démontrer la présence de l'apoptose dans l'ischémie globale : les protéines proapoptotiques Bax et Bcl-x1 sont exprimées dans les cellules CA1, vulnérables à la mort. En plus de ces caractéristiques biochimiques, dans plusieurs cas d'ischémie, la coupure en échelle de l'ADN a été observée. Lors d'une ischémie focale, les neurones apoptotiques apparaissent de préférence tôt après le choc ischémique et semblent prédominer sur la nécrose dans les régions où l'agression est la moins sévère. Toutes ces évidences nous amènent à reconnaître l'existence de l'apoptose dans l'ischémie. Un des mécanismes importants de l'ischémie est l'arrivée massive

de calcium de l'espace extracellulaire, par canaux calciques voltage ou récepteurs (glutamate)-dépendants. Il n'y a pas si longtemps, la "calcitotoxicité" était seulement considérée comme inductrice de la mort cellulaire. Toutefois, depuis quelques années, on considère qu'elle participe également à l'activation de DNases et de caspases au cours de l'apoptose. Ainsi, des activités de type caspase-3 ont été observées dans des cytosols de cellules additionnés de 0,5 mM de CaCl_2 . Après une ischémie globale, un traitement préventif avec des inhibiteurs de caspases et/ou de calpaïnes démontre une inhibition de l'apoptose dans les cellules CA1 de l'hippocampe. La synergie des effets d'inhibiteurs de caspases et de calpaïnes dans la protection des neurones contre la mort dans l'ischémie suggère une interaction entre ces deux protéases au cours de l'apoptose. [118]



Conclusion



L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire au cours duquel des mécanismes complexes sont activés pour aboutir à la destruction de la cellule. Ce « suicide cellulaire » est un événement clé en biologie car il permet l'équilibre entre prolifération et dégénérescence cellulaire dans les organismes pluricellulaires, c'est à dire le maintien de leur homéostasie. De plus, l'apoptose est un mécanisme « silencieux » pour l'organisme et il permet donc la régulation des populations cellulaires tout en respectant l'intégrité de l'organisme.

L'apoptose survient naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement. Cependant, elle peut également se produire dans diverses conditions pathologiques. De plus, un dysfonctionnement des mécanismes régulateurs de l'apoptose va donner lieu à de graves pathologies. Ainsi, un défaut d'apoptose va entraîner des syndromes prolifératifs associés à un processus de tumorigenèse, tout particulièrement au niveau des tissus à renouvellement rapide comme le système immunitaire (lymphome, leucémie). A l'inverse, une activation anormale va donner lieu à un phénomène de dégénérescence, comme cela est observé au cours de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer.

La mort cellulaire est précédée par une condensation du noyau et du cytoplasme, une fragmentation du contenu cellulaire en corps apoptotiques (structure membranaire contenant des débris cytoplasmiques et nucléaires) et l'élimination de ces dernières composantes par phagocytose.

L'apoptose peut être déclenchée par des stimulations internes mais aussi externes, dont la nature détermine la voie d'activation. La cellule dispose de plusieurs systèmes pour déclencher le programme de sa mort. Il existe en effet, dans chaque cellule vivante, un programme génétique de mort qui, s'il est mis en oeuvre, entraîne sa disparition.

Ainsi, la mort par apoptose est rapide et n'entraîne en général ni lésion, ni inflammation, ni cicatrisation : c'est pourquoi elle est passée aussi longtemps inaperçue.

En conclusion, l'apoptose apparaît essentielle à la construction, au maintien et à la réparation des tissus, mais aussi à l'élimination des cellules surnuméraires, dysfonctionnelles ou endommagées. Le suicide des cellules est placé sous un contrôle hautement spécifique et efficace.



Résumés



RESUME

Titre : L'apoptose : la mort cellulaire programmée

Auteur : Omar Benkhai

Mots clés : Apoptose, Récepteur de mort , Mitochondrie , Caspase , Cytométrie en flux

L'apoptose est devenue un concept biologique très populaire. La raison principale vient de son rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie cellulaire.

Notre travail résume les connaissances actuelles sur l'apoptose dans le but de fournir les bases principales pour comprendre ce phénomène.

En effet les cellules ont la capacité de répondre à des signaux très différents activant un ensemble de mécanismes et conduisant à leurs morts.

Une apoptose inappropriée peut contribuer à certaines pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou maladies auto-immunes alors qu'un défaut d'apoptose peut contribuer au développement du cancer.

Une meilleure compréhension et exploration des mécanismes apoptotiques ont permis le développement de nouvelles stratégies visant à manipuler la machinerie apoptotique et à l'activer quand elle est déficiente ou l'inhiber quand elle est inappropriée.

SUMMARY

Title : Apoptosis: programmed cell death

Author : Omar Benkhai

Keywords: apoptosis, death receptor, mitochondrion, caspase, flow cytometry

Apoptosis is became a very popular biological concept. The main reason comes from its role in development and cellular homeostasis.

Our work summarizes current knowledge on apoptosis in order to provide the main basis for understanding this phenomenon.

Indeed, cells have the ability to respond to a very different signals activating set of mechanisms and leading to their death.

Inappropriate apoptosis may contribute to some diseases such as Alzheimer's disease or autoimmune diseases whereas a lack of apoptosis may contribute to the development of cancer.

Understanding and exploration of apoptotic mechanisms allow the development of new strategies to manipulate the apoptotic machinery and activate when it is deficient or inhibited when it is inappropriate.

ملخص

العنوان : الابوتوز : موت الخلايا المبرمج
من طرف : عمر بن خيي
الكلمات الرئيسية : الابوتوز ، مستقبل الموت ، ميتوكوندري ، كاسباس ، قياس التدفق الخلوي

لقد أصبح موت الخلايا المبرمج مفهوما بيولوجيا ذو شعبية كبيرة. السبب الرئيسي يعود إلى دورها في التطور و التوازن الخلوي.

عملنا يلخص المعرفة الحالية حول موت الخلايا المبرمج من أجل توفير الأسس الرئيسية لفهم هذه الظاهرة.

في الواقع، الخلايا لديها القدرة على الاستجابة لإشارات جد مختلفة مفعلة مجموعة من الآليات تؤدي إلى وفاتها.

موت الخلايا المبرمج غير لائق يمكن أن يسهم في بعض الأمراض مثل مرض الزهايمر أو أمراض المناعة الذاتية في حين أن غيابه يمكن أن يسهم في تطور السرطان.

الفهم الجيد وآليات الإستكشاف الجيدة تسمح بوضع استراتيجيات جديدة للتلاعب بآلية موت الخلايا المبرمج وتفعيلها عند قصورها أو حصرها عندما تكون غير لائقة.



Références



- [1] Useful known and unknown views of the father of modern medicine, Hippocrates and his teacher Democritus. *Hellenic journal of nuclear medicine, The Journal of the Hellenic Society of Nuclear Medicine* **2008**; 11 (1): 2-4.
- [2] **Seumois G.** Identification de nouveaux mécanismes régulateurs de l'apoptose des granulocytes **2007** ; chapitre 2 : 18-19.
- [3] **Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **1972**; 26:239–571.
- [4] **Martin S J, Reutelingsperger C P, McGahon A J, Rader J A, van Schie R C, LaFace D M and Green D R.** Early redistribution of plasma membranephosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiatingstimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **1995**; 182: 1545-1556.
- [5] **Webb S J, Harrison D J, Wyllie A H.** Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv.Pharmacol* **1997**; 41: 1-34.
- [6] **Leist M and Jaattela M.** Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **2001**; 2(8): 589-98.
- [7] **Levine B and Yuan J.** Autophagy in cell death: an innocent convict. *J Clin Invest* **2005**; 115: 2679-2688.

- [8] **Thompson A R, Vierstra R D.** Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2005**: 165–173
- [9] **Aimee L E, Craig B T.** Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* **December 2004**; 6(16): 663-669
- [10] **Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki R A, McKercher S R, Martin.** Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.*Innull mouse embryos.* *Development* **2000**; 127:5245-52.
- [11] **Clarke P G, Posada A, Primi M P, Castagne V.** Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother* **1998**; 52:356-62.
- [12] **Weil M, Raff M C, Braga V M:** Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol.* **1999**; 9:361-364.
- [13] **David L.** Etude des voies de signalisation cellulaire au cours de l'apoptose et de la différenciation mégacaryocytaire induite par Diosgenine dans la lignée érythroleucémique HEL *thèse 2006* ; pg : 39
- [14] http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=interaction
- [15] **Reed J C.** Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* **2000**; 157: 1415-30.

- [16] **Curtin J F, Cotter T G.** Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Review Cell Signal* **2003**; 15 (11) :983-92.
- [17] **Yigong Shi.** Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell* March **2002**; Issue 3 (9) : 459–470
- [18] **Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson C B and Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* **2004**; 6: 1221-8.
- [19] **Borner C.** The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* **2003** ; 39 : 615-47.
- [20] Les multiples voies de signalisation de la mort cellulaire : avancées récentes et exploitation thérapeutique. *Bulletin du Cancer* **Janvier 2005** ; 92(1) : 23-35.
- [21] **Van L G, Saelens M, van G M, MacFarlane S J, Martin and Vandenabeele P.** The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* **2002** 9:1031-42.
- [22] **Sebastien C.** Contrôle de la mort cellulaire par la voie du MAPK1/3 (ERK2/1). Thèse de doctorat en sciences **2005** ; pg : 21.

- [23] **Orrenius S, Zhivotovsky B and Nicotera P.** Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004** ; 4: 552-565.
- [24] **Patil C and Walter P.** Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* **2001**; (13): 349-355.
- [25] **Xu C, Bailly-Maitre B and Reed J C.** Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* **2005**; 115: 2656-2664.
- [26] **Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding H P and Ron D.** Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **2000**; 287: 664-666.
- [27] **McCullough K D, Martindale J L, Klotz L O, Aw T Y and Holbrook N J.** Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **2001**; 21: 1249-1259.
- [28] **Chambron J P.** cours: la mort cellulaire par apoptose**2006-2007**. jean-philippe.chambon@snv.jussieu.fr
- [29] **Budd S L and Nicholls D G.** A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca²⁺ homeostasis. *J Neurochem* **1996**; 66: 403-411.

- [30] **Pietila K and Nikkari T.** Role of the arterial smooth muscle cell in the pathogenesis of atherosclerosis. *Med Biol* **1998**; 61: 31-44.
- [31] **Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi, P, and Di Lisa F.** The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem* **2005**; 276: 12030-12034.
- [32] **Wang H G, Pathan N, Ethell I M , Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke T F and Reed J C.** Ca²⁺ induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **1999**; 284: 339-343.
- [33] **Cory C S and Adams J M.** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2002**; 2: 647-656.
- [34] *the death and cell renewal 2009* sinauer associates page 7 figure 17
- [35] **Willis S N, Fletche J I, Kaufmann T et al.** Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science New York, N.Y* **2007**; 315: 856-859.
- [36] **Deniaud E.** Etude des consequences fonctionnelles de la surexpression du facteur de transcription sp1. *These pour l'obtention du diplôme de docteur de l'ecole normale superieure de lyon mars* **2008** ; pg :16

- [37] **Salvesen G S, Duckett C S.** IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Rev Mol Cell Biol* **2002**; 3: 401-10.
- [38] **Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D.** The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Seminars in Cancer Biology* **2004**;14(4): 231
- [39] **Morrison S J and Spodlling.** Cell death and cell *renewal* :*Bull Cancer* **2005** ; 92 (1) :30
- [40] **Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D.** The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Seminars in Cancer Biology* **2004**;14(4): 233
- [41] **Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz M A, Lassota P, Traganos F.** Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* **2002**; 13 : 795-808
- [42] **Al-Rubeai M.** Apoptosis and cell culture technology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1997**; 59 : 225-249
- [43] **Payne C M, Cromey D W.** An image analysis workstation designed for multiple users: Application of quantitative digital imaging techniques to electron microscopy. *Ultrastruct. Pathol.* **1992**; 12 : 147-154
- [44] **Smith G J, Bagnell C R, Bakewell W E, Black K A , Bouldin T W, Earnhardt T S, Hook G E, Pryzwansky K B.** Application of confocal

scanning laser microscopy in experimental pathology. *J. Electron. Microsc. Technol.* **1991**; 18 : 38–49

- [45] **Sgonc R., Gruber J.** Apoptosis detection: an overview. *Exp. Gerontology* **1998**; 33 (6) : 525-533
- [46] **Al-Rubeai M, Emery A N.** Flow Cytometry Applications in Cell Culture New-York. *Marcel Dekker Inc.* **1996**; pg: 331
- [47] **Elias C B et al.** Turbulent shear stress – Effect on mammalian cell culture and measurement using laser doppler anemometer. *Chem. Eng. Sci.* **1995**; 50 (15) : 2431-2440
- [48] **Moore A et al.** Apoptosis in CHO cell batch cultures : examination by flow cytometry. *Cytotechnology* **1995**; 17 : 1-11
- [49] **Tinto A, Gabernet C, Vives J, Prats E, Cairo J J, Cornudella L, Godia F.** The protection of hybridoma cells from apoptosis by caspase inhibition allows culture recovery when exposed to non-inducing conditions. *J. Biotechnol.* **2002**; 95 : 205-214
- [50] <https://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/index.jsp>
- [51] **Al-Rubeai M, Singh R P, Goldman M H, Emery A N.** Death Mechanisms of animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, 45 : 463-472

- [52] **Tey B T et al.** Influence of Bcl-2 on cell death during the cultivation of a Chinese Hamster Ovary cell line expressing a chimeric antibody. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**; 68 : 31-43
- [53] **Tey B T et al.** Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NSO cultures. *J. Biotechnol.* **2000**; 79: 147-159
- [54] **Tey B T, Al-Rubeai M.** Effect of Bcl-2 overexpression on cell cycle and antibody productivity in chemostat cultures of myeloma NSO cells. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**; 100 (3) : 303-310
- [55] **Al-Rubeai M.** Apoptosis and cell culture technology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1997**; 59 : 225-249
- [56] http://idg.u-strasbg.fr/PDFcours/cours_JCA_2006.pdf
- [57] **Faccinetti A, Tessarollo L, Mazzochi M, Kingston R, Collavo D, Biasi G.** An improved method for the detection of DNA fragmentation. *J. Immunol. Methods* **1991**; 136: 125-131
- [58] **Caron, Leslie L A, Cidlowski J A.** Similar actions of glucocorticoids and calcium on the regulation of apoptosis in S49 cells. *Mol. Endocrinol.* **1991**; 5 : 1169-1179
- [59] **Arden N, Betenbaugh M J.** Regulating apoptosis in mammalian cell cultures. *Cytotechnology* **2006**; 50 : 77-92

- [60] **Han K O et al.** Effect of N-acetylcystein on butyrate-treated chinese hamster ovary cells to improve the production of recombinant human interferon- β 1a. *Biotechnol. Prog.* **2005**; 21 : 1154-1164
- [61] **Goergen J L, Marc A, Engasser J M.** Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate deshydrogenase release. *Cytotechnology* **1993**; 11 : 189-195
- [62] **Wagner A, Marc A, Engasser J M.** The use of lactate dehydrogenase (LDH) release kinetics for the evaluation of death and growth of mammalian cells in perfusion reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**; 39: 320-326.
- [63] **Racher A J, Looby D, Griffiths J B.** Use of lactate deshydrogenase to assess changes in culture viability. *Cytotechnology* **1990**; 3 : 301-307
- [64] **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1993**; 65 (1-2) : 55-63
- [65] **Adolphe M, Barlovatz M G, Guillouzo C, Ronot X.** Culture de cellules animales, Paris. *INSERM* **2003** ; pg : 898.
- [66] <http://acces.inrp.fr/acces/equipes/dyna/travaux/bioscience/dynacell/dynacell%20plone/outils/winmdi/images/cytometre.gif>

[67] <http://lbbc1.cep.u-psud.fr/cours%20M1/BAO/cours%20CMF.ppt>

[68] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A simple and rapid method for measuring thymocytes apoptosis by propidium iodide and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **1991**; 139 : 271-279

[69] Telford W G, King L E, Fraker P J. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* **1992**; 13 : 137-143

[70] Dive C, Gregory C D, Philipp D J, Evans D L, Milner A E, Willye A H. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**; 1133 : 275-285

[71] Koopman G, Reutlingsperger C P M, Kuijten G A M, Keehnen R M J, Pals S T, van Oers M H J. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserin expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **1994**; 84 : 1415-1420

[72] Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**; 184 : 39-51

- [73] **Al-Rubeai M, Emery A N, Chalder S, Goldman M H.** A flow cytometric study of hydrodynamic damage to mammalian cells. *J. Biotech.* **1993**; 31 : 161-177
- [74] **Lecoeur H, Gougeon M L.** Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons. Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. *J. Immunol. Methods* **1996**; 198 (1): 87.
- [75] **Van Engeland M, Nieland L J W, Ramaeckers F C S, Schutte B, Reutelingsperger C P M.** Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **1998**; 31 :1-9
- [76] **Poot M, Gibson L L, Singer V L.** Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker TM Red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. *Cytometry* **1997**; 27: 358-364.
- [77] **Cossarizza A, Baccarani Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C.** A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**; 197: 40-45
- [78] **Fischer B.** Etude de la signalisation cellulaire de l'apoptose induite par différents types de rayonnements ionisants dans des cellules lymphoblastoïdes humaines différant par leur statut p53 Th. *Sciences du vivant : Université Louis Pasteur Strasbourg* **2004**; pg : 201

- [79] **Belloc F, Belaud-Rotureau M A, Lavignolle V.** Flow cytometry detection of caspase 3 activation in preapoptotic leukemic cells. *Cytometry* **2000**; 40 : 151-160.
- [80] **Ferlini C, Di Cesare S, Rainaldi G, Malorni W, Samoggia P, Biselli R, Fattorossi A.** Flow cytometric analysis of the early phases of apoptosis by cellular and nuclear techniques. *Cytometry* **1996**; 24 : 106-115
- [81] **Reynolds J E, Li J, Eastman A.** Detection of apoptosis by flow cytometry of cells simultaneously stained for intracellular pH (CarboxySNARF-1) and membrane permeability. *Cytometry* **1996**; 25 : 349-357
- [82] **Boc R, Gjertsen B T, Vintermyr O K, Houge G, Lanotte M, Deskeland S O.** The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp. Cell. Res.* **1991**; 195: 237-246
- [83] **Elias C B, et al.** Turbulent shear stress – Effect on mammalian cell culture and measurement using laser doppler anemometer. *Chem. Eng. Sci.* **1995**; 50 (15) : 2431-2440
- [84] **Gurtu V, Kain S R, and Zhang G.** Fluorometric and Colorimetric Detection of Caspase Activity Associated with Apoptosis. *Anal. Biochem.* **1997**; 251: 98–102

- [85] **Chiang G G, Sisk W P.** Bcl-XL mediates increased production of humanized monoclonal antibodies in Chinese Hamster Ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**; 91 (7) : 779-792
- [86] **Goswami J, Sinskey A J, Steller H, Stephanopoulos G N, and Wang D I C:** Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**; 62 (6) : 632-640
- [87] **Vasilakos J P, Lynch T, Ghayur T, Giegel D A, Santoro M, Shivers B D :**Caspase-3/CPP32-like activity is not sufficient to mediate apoptosis in an IL-2 dependent T cell line. *Apoptosis* **1997**; 2(3) : 289–303
- [88] **Chae I, Park K, Kim H, and Oh B:** Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clin. Chim. Acta* **2004**; 341 : 83–91.
- [89] **Krammer P H.** CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **2000**; 407 :789-795
- [90] **Goldstein P.** controlling cell death. *Science* **1997**; 275 : 1081-1082
- [91] **Mourali Jaouhar.** ALK, un nouveau récepteur à dépendance .Etude des mécanismes de son effet proapoptotique *thèse* **2008** ; pg : 27
- [92] **Roulston A, Marcellus R C and Branton P E.** Viruses and apoptosis. *Annu. Rev.Microbiol* **1999** ; 53 :577-628.

- [93] **Tollefson A E, Hermiston T W, Lichtenstein D L, Colle C F, Tripp R A, Dimitrov T, Toth K, Welles C E, Doherty P C and Wold W S.** Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* **1998**; 392 : 726-730.
- [94] **Sandberg M, Hammerschmidt W and Sugden B.** Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2 and TRAF3. *J. Virol* **1997**;71:4649-4656.
- [95] **Ray R B, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal, B B & Ray R.** Inhibition of tumor necrosis factor (TNF- α)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J. Biol. Chem.***1998**; 273:2256-2259.
- [96] **Xu, X, Nash P, and McFadden G.** Myxoma virus expresses a TNF receptor homolog with two distinct functions. *Virus Genes* **2000** ; 21: 97-109.
- [97] **Cunnion K M.** Tumor necrosis factor receptors encoded by poxviruses. *Mol. Gen.Met.***1999**; 67:278-282.
- [98] **Djerbi M, Screpanti V, Catrina A I, Bogen B, Biberfeld P and Grandien A .**The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J. Exp. Med.* **1999**; 190:1025-1032.
- [99] **Shisler J, Duerksen-Hughes P, Hermiston T M, Wold W S and Gooding L R.**Induction of susceptibility to tumor necrosis factor by E1A

is dependent on binding to either p300 or p105-Rb and induction of DNA synthesis. *J. Virol.* **2006**; 70: 68-77.

[100] **Bergqvist A, Soderbarg K and Magnusson G.** Altered susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of mouse cells expressing polyomavirus middle and small T antigens. *J. Virol.* **1999** ; 71 : 276-283.

[101] **Inoue Y, Yasukawa M and Fujita S.** Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6. *J Virol* **1997**; 71: 3751-3759.

[102] **Duval R.** Expression des différentes voies apoptotiques induites par le rétrovirus Visna. *Thèse d'obtention du Doctorat en science* **29 avril 2003** ; pg : 65, 67, 69

[103] **Bartz S R, Emerman M.** Human immunodeficiency virus type 1 induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8. *J Virol.* **1999**; 73:1956-1963.

[104] **Westendorp M O, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dein J, Walczak H, Debatin K M and Krammer P H.** Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* **1995**; 375:497-500.

[105] **Strack P R, Frey M W, Rizzo C J, Cordova B, George H J, Meade R, Ho S P, Corman J, Tritch R and Korant B D.** Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2006**; 93:9571-9576.

- [106] **Zauli G, Gibellini D, Secchiero P, Dutartre H, Olive D, Capitani S and Collette Y.** Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4 (+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway. *Blood* **1999**. 93:1000-1010.
- [107] **Jacotot E, Ravagnan L, Loeffler M, Ferri K F, Vieira H L, Zamzami N, Costantini P, Druillennec S, Hoebeke J, Briand, J P, Irinopoulou T, Daugas E, Susin S A, Cointe, D , Xie Z H, Reed J C, Roques, B P and Kroemer G .** The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J. Exp. Med* **2000** ; 191:33-46.
- [108] **Reddy P, Beal M.** Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Brain Res.Rev.* **2005**; 49: 618-632
- [109] **Drouet B, Pincon-Raymond H, Chambay J, Pillot T.** Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* **2000**; 57: 705-15.
- [110] **Olanow C W, Tatton W G.** Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Rev Neurosci* **1999**; 22: 123-44.
- [111] **Du Y, Dodel R C, Bales K R, Jemmerson R, and Hamilton-Byrd E, Paul S M.** Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-

methyl-4-phenylpyridinium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* **1997**; 69: 1382-8.

[112] **Vila M, Jackson-Lewis V V, Vukosavic S et al.** Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**; 98:2837-42.

[113] **Young A B.** Impairment of energy metabolism and excitotoxic cell death in Huntington's disease. *Rev Neurol* **1997**; 153(8-9): 496-8.

[114] **Kim M, Lee H S, Laforêt G et al.** Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *J Neuroscience* **1999**; 3: 964-73.

[115] **Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, and Greenberg M E.** Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* **1998**; 95 : 55-66.

- [116] **Ona V O, Li M, Vonsattel J P et al.** Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* **1999**; 399: 204-7.
- [117] **Lipton P.** Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* **1999**; 79: 1431-568.
- [118] **Juin P, Pelletier M, Oliver L et al.** Induction of a caspase-3-like activity by calcium in normal cytosolic extracts triggers nuclear apoptoses in a cell-free system. *J Biol Chem* **1998**; 273: 17559-64.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

وأحسب باللهم العظم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

جامعة محمد الخامس - السويسي
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 24

سنة : 2013

الأبوتوز : موت الخلايا المبرمج

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : 21/03/2013

من طرف

السيد: عمر بن خبيبي

المزاد في: 31 ماي 1987 بسيدي قاسم

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: الأبوتوز - مستقبل الموت - ميتوكوندري - كسباس - مقياس التدفق الخلوي

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: عمر شقييري

أستاذ في علم الأنسجة و الأجنة و تولد الخلايا

مشرف

السيدة: سعيدة طلال

أستاذة في علم الكيمياء الإحيائية

أعضاء

السيدة: سكيينة الحمزاوي

أستاذة في علم الجراثيم

السيدة: منى نزيه

أستاذة مبرزة في علم الدم البيولوجي