

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique Moléculaire

Intitulé :

Control de l'apoptose et la transformation cancéreuse dans la prostate

Présenté et soutenu par :

Le :29/06/2015

BENSOUYAD Rabah

BOUHADIBA Abdallah

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. SATTI Dalila (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : CHETTOUM Aziez (MCB - UFM Constantine).

Examineurs: REZGOUNE Mohamed Larbi (MAA - UFM Constantine).

Année universitaire
2014 - 2015

Remerciement

Le grand merci tout d'abord et avant tout à ALLAH pour nous avoir donnés le courage et la patience de mener à terme ce travail.

*Nous adressons tous nos remerciements au **Dr. CHETTOUM Aziez** pour son encadrement et son soutien moral et scientifique.*

*Nous remercions sincèrement **Pr. SATTA Dalila** et **Dr. REZGOUNE Mohamed Larbi** qui n'ont pas hésité à juger ce travail.*

Nous remercions également tous les enseignants de la filière et tous qui nous ont aidés dans ce modeste travail.

Dédicace

Nous dédions ce modeste travail à :

Nos chers parents,

Nos familles,

Nos amis,

Nos collègues,

Et à tous ceux qui nous ont aidés à réaliser ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Première Chapitre : L'apoptose et mécanismes de régulations	
I- L'apoptose et mécanismes de régulations	3
I-1- La mort cellulaire	3
I-2- Caractéristique de l'apoptose	3
I-2- Caractéristique morphologique	4
I-2-2-Caractéristique biochimique	5
I-2-3-Atteint mitochondrial	5
II- Les gènes de l'apoptoses	6
II-1-Les caspases	7
II-1-1-Classification des caspases	8
II-1-2-Régulation des caspases	9
a - Régulation par phosphorylation	10
b - Régulation redox	10
c - Régulation topographique	10
d - Régulation protéine-protéine	10
e - Régulation par des IAPs	10
II-1-3-Activation des caspases	12
a - Autoactivation des caspases initiatrice	13
a-1-Activation des procaspases 2-8-10	13
a-2- Activation de procaspase 9	14
b - Trans-activation des caspases effectrice	16
c- Substrats des caspases effectrice	16
II-2- Les membres de la famille de BCL-2	17
II-2-1.structure des protéines de la famille BCL-2	18
a - Les membres pro apoptotique	18
b - Les membres anti apoptotique	18
c - Les protéines « BH3 »only	18
II-2-2-Régulation fonctionnelle des protéines de la famille de BCL-2	20

a- Le concept initial de la dimérisation	20
b - Par phosphorylation	21
c - Par clivage	21
III. Les voies de signalisation apoptotique	23
III-1- Les différents voies de l'apoptose	24
III-1-1-La voie de récepteur de mort « voie extrinsèque »	24
III-1-2- La voie mitochondriale « voie intrinsèque »	26
a -Voie mitochondriale caspase dépendante	26
b- Voie mitochondriale caspase indépendant	27
III-1-3-La voie de réticulum endoplasmique	29
IV- Évolution chronologique des techniques de détection	30
IV-1- Quelque technique de détection	31
IV-1-1- Altération membranaire	31
IV-1-2-Activation des caspases	31
IV-1-3-Modifications mitochondriales	31
IV-1-4-Marquage de l'ADN	31
IV-1-5-Fragmentation de l'ADN	32
IV-1-6-Détection des protéines liées à l'apoptose	32
Deuxième Chapitre : L'apoptose et la transformation cancéreuse	
I. La transformation cancéreuse	33
II. Caractéristique fondamentales de la cellule cancéreuse	34
II-1-L'immortalité ou perte de la sénescence	34
II-2-Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération	35
II-3-Insensibilité aux signaux antiprolifératifs	35
II-4-Capacité d'induire une néo-angiogénèse	36
II-5- L'échappement à l'apoptose	36
II-6-Les capacités d'invasion et de métastase	36
III. Mécanisme de résistance à l'apoptose dans les cancers humains	36
III-1-Altération au niveau des voies des récepteurs de mort	37
a- Récepteur avec une expression ou fonctions affaibli	37
b- L'expression aberrant du récepteur leurre « decoy »	37
c-La surexpression de c FLIP ou PED/PEA-15	38
d- L'inactivation des caspases-8	38
III-2-Altération dans la voie apoptotique mitochondrial dans les cancers humains	39

a- La surexpression des anti-apoptotique BCL-2	39
b- L'inactivation de s BAX ou des protéines « BH3-only»	39
c- Défaut au niveau post mitochondrial : perte d' APAF-1	39
III-3-L'expression aberrante des inhibiteurs d'apoptose « IAP »	40
a- Dérégulation de survivin	40
b- L'expression anormale de CIAP-1 et CIAP-2	40
c- La dérégulation de XIAP	40
Troisième Chapitre : l'apoptose dans le cancer de prostate	
I .La prostate	42
I-1-Anatomie et fonction de la prostate	42
I-2- Contrôle de l'homéostasie de la prostate	44
I-2-1.Les androgènes	44
a- Les androgènes testiculaires	45
b- Les androgènes surrénaliens	45
I-2-2-Les récepteurs des androgènes	46
I-2-2-1.Action génomique des RA	48
I-2-2-2-Action non génomique des androgènes	48
II. La transformation cancéreuse	49
II-1-La localisation	49
II-2-L'extension	49
II-3-Le grade tumorale : classification de Gleason	49
II-4-Le bilan d'extension : la classification TNM	51
II-5-Les traitements	52
III. L'apoptose dans le cancer de prostate	53
III-1-Les androgènes et l'inactivation l'apoptose	53
III-2-La privation androgénique et l'apoptose	53
III-3-L'hormono-indépendance et l'apoptose	57
Conclusion	59

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la cellule en apoptose	4
Figure 2 : les gènes de l'apoptose	7
Figure 3 : structure proteique et classification des caspases	9
Figure 4 : Structure des IAPs	11
Figure 5 : Mécanismes de l'inhibition des caspases par les IAP	
A-Situation non-apoptotique	
B-Situation apoptotique	11
Figure 6 : mécanisme d'activation des pro-caspases	12
Figure 7 : mécanisme d'activation des caspase initiatrice	14
Figure 8 : Activation de pro-caspase -9 et la formation de l'apoptosome	15
Figure 9 : structure et classifications des membres de la famille Bcl-2	19
Figure 10 : Représentation schématique du modèle de « rhéostat » moléculaire	20
Figure 11 : Exemples de mécanismes par lesquels les membres de la famille Bcl-2 régulent l'apoptose	22
Figure 12 : Les phases de l'apoptose - Intégration séquentielle du signal apoptotique	24
Figure 13 : la voie apoptotique extrinsèque	25
Figure 14: la voie apoptotique mitochondrial	28
Figure 15 : Outils pour la détection de l'apoptose	30
Figure 16: les différents mécanismes d'échappements à l'apoptose dans les cancers humains	41
Figure 17 : l'appareil génital masculin	42
Figure 18 : organisation de la glande prostatique	43

Figure 19 : différenciation des cellules basale	44
Figure 20 : le control androgénique	46
Figure 21 : structure du récepteur de l'androgène	47
Figure 22 : le grade de Gleason	50
Figure 24 : immunoblot comparatif des protéines caspase-8, caspase-3 dans des tissus Hyperplasiques et tissus Cancéreux	58

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques substrats des caspases au cours de l'apoptose	17
Tableau 2 : exemples de genes supressuer e tumeurs et proto-oncogenes	34
Tableau 3 : la classification TMN	51
Tableau 4 : les recommandations thérapeutique selon le stade du cancer prostatique	52
Tableau 5 : l'effet de privation androgénique sur les différentes cellules prostatiques cancéreuses	56
Tableau 6 : l'expression des protéines Bcl-2 dans les différents stades de cancer de prostate	57

ABREVIATIONS

AMPC	Adénosine Monophosphate cyclique
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ARE	Androgen Responsive Element
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology
CARD	Caspase recruitment domain
Caspase	Cysteinylnl aspartate-specific proteinase
CED	Cell death abnormal
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DHT	Dihydrotestostérone
DISC	Death inducing signaling complex
EndoG	Endonucléase G
FADD	Fas associated death domain
FasL	Fas ligand
FLIP	FLICE inhibitory protein
HSP	Heat-Shock Protein
IAP	Inhibiteur de l'apoptose
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LHRH	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
LH	Luteinizing Hormone
LOH	Loss of heterozegoty
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NF-κB	Nuclear factor B
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PS	Phosphatidylsérines
PSA	Prostate-Specific Antigen
RA	Récepteur des Androgènes
RE	Réticulum endoplasmique
tBid	Truncated Bid
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRPM-2	Transient Receptor Potential cation channel

Résumé

La prostate est le siège d'affections invalidantes et graves telles l'hyperplasie bénigne et, surtout, le cancer. Ce dernier se caractérise par un taux de prolifération cellulaire particulièrement faible, et il est admis aujourd'hui qu'il résulte essentiellement d'un déficit du processus d'apoptose. La mort cellulaire programmée est un phénomène actif qui requiert la synthèse de nouvelles protéines. Plusieurs gènes, réglés au cours de l'apoptose affectant les cellules épithéliales prostatiques privées d'androgènes, ont été mis en évidence. Toutefois, la (ou les) cascade(s) d'activation conduisant à la mort de ces cellules demeure(nt) encore fort mal connue(s).

L'identification de nouveaux gènes impliqués dans cette apoptose dépendante d'un déficit en androgènes, notamment à l'aide de techniques de clonage différentiel, pourrait s'avérer très importante pour le développement de nouvelles stratégies de traitement du cancer prostatique.

Mots clés : Apoptose, Prolifération, Prostate, Androgènes, Cancer,

Abstract

The prostate is a site of serious pathologies, such as benign hyperplasia and cancer. The latter is characterized by a very low rate of cellular proliferation, and it is recognized that prostate cancer results mainly from a deficit in the apoptotic process. A fundamental study of apoptosis on wellknown experimental models would therefore be very useful for the comprehension of the cancer process.

In particular, castration-induced rat prostatic regression is a good model, characterized by well-defined morphological and biochemical criteria. Prostatic apoptosis is an active process which requires the synthesis of new proteins. Several genes regulated during the programmed death of androgen-deprived epithelial prostatic cells have been described. However, the activation cascade(s) leading to the apoptosis of these cells is (are) still poorly understood. Efforts should be made to identify, for example by the use of differential cloning techniques,

New genes implicated in this androgen-dependant apoptosis. These would be very important for the development of novel strategies for the treatment of prostate cancer.

Keywords: Apoptosis, Proliferation, Prostate, Androgenes, Cancer,

الملخص:

تعتبر البروستاتا مقر للأمراض والإصابات الخطيرة مثل الأورام الحميدة وخاصة السرطان، هذا الأخير والذي يتميز بنسبة ضعيفة في عملية التضاعف الخلوي بشكل خاص، والسبب يرجع إلى اعوزاز في ظاهرة موت الخلايا، الموت المبرمج للخلايا هو ظاهرة نشطة تتطلب تركيب بروتينات جديدة، العديد من الجينات تنظم خلال عملية الموت الخلوي تصيب الخلايا الظهارية للبروستاتا المحرومة من الأندروجين، أثبتت الدراسات ان مجريات التنشيط المؤنية إلى موت الخلايا لا تزال غير معروفة جيدا لحد الآن.

تحديد جينات جديدة تساهم في عملية الموت المبرمج للخلايا والمعتمدة على النقص في الأندروجينات، ولاسيما استخدام تقنيات الاستنساخ التفاضلية بإمكانه أن يكون مهم جدا لتطوير استراتيجيات جديدة في علاج سرطان البروستاتا

الكلمات المفتاحية: الموت المبرمج للخلايا، التضاعف الخلوي، البروستاتا، الأندروجين، السرطان

INTRODUCTION GENERALE

L'apoptose est un phénomène naturel qui va de pair avec la prolifération afin d'assurer le maintien de l'homéostasie tissulaire des organismes multicellulaires. Elle intervient dès l'embryogenèse, mais participe également à des processus aussi divers que la maturation du système immunitaire, le maintien dynamique du nombre de cellules fonctionnelles, l'élimination de cellules anormales ou endommagées de même que le vieillissement. Le déroulement du processus apoptotique peut être divisé en trois phases : une phase d'initiation enclenchée par le stimulus, une phase effectrice où la cellule s'engage vers un point de non retour et une phase de dégradation où les caractéristiques morphologiques de l'apoptose deviennent évidentes. Toute anomalie ou tout dérèglement dans le programme d'exécution ou dans le contrôle du processus apoptotique peut donc potentiellement contribuer à la physiopathologie de nombreuses maladies, ainsi un défaut d'apoptose se traduira par une prolifération cellulaire incontrôlée (cancer).

L'étude de l'apoptose (ou la mort cellulaire programmée) est devenue, au cours de ces dernières années, un des thèmes majeurs de la recherche sur la prostate tant normale que pathologique. Il a à cet intérêt récent plusieurs raisons : d'une part, la prostate est un organe sans équivalent pour comprendre et comparer les phénomènes de prolifération cellulaire et d'apoptose, à la fois dans des tissus sains et néoplasique ; d'autre part c'est aussi un organe glandulaire assez simple sur les plans morphologique et histologique, ses sécrétions jouent également un rôle important pour la vitalité et la mobilité du sperme, et interviennent également dans la défense anti infectieuse du bas appareil urinaire.

La fonction prostatique est sous le contrôle des androgènes qui sont testiculaires et surrénaliens chez l'homme, et exclusivement gonadiques chez le rat. Une déplétion en androgènes résultante d'une castration, ou induite par un traitement médicamenteux conduit à une régression spectaculaire de l'épithélium glandulaire dans les jours qui suivent l'intervention.

Chez l'homme, la prostate est le siège de maladies très invalidantes telle l'hyperplasie bénigne, ou de très mauvais pronostic comme le cancer prostatique.

Dans la prostate, comme dans la plupart des autres organes, les structures tissulaires et la fonction de la glande ne sont maintenues que si la prolifération par mitose des cellules épithéliales est contrebalancée par des morts cellulaires programmées d'égale importance.

Ce contrôle coordonné de la prolifération cellulaire et de l'apoptose est assuré par l'apport permanent d'androgènes, qui agissent comme agonistes et antagonistes de ces deux mécanismes au niveau des cellules épithéliales de ce fait, toute perte de contrôle d'un de ces processus peut conduire à un développement tumoral.

Dans notre étude de recherche bibliographique nous avons ciblé le dérèglement de l'apoptose au niveau de la prostate induite par différents stimulus endogènes et exogènes. Certains stimuli pro-apoptotiques endogènes ou exogènes (stress oxydant, xénobiotiques, UV...) déclenchent différentes voies de signalisation aboutissant à l'activation des caspases puis à la mort de la cellule. La régulation de ce processus est sous contrôle de protéines, dont les mieux caractérisées sont celles de la famille Bcl-2. Un déséquilibre entre les formes pro et anti-apoptotiques orientera la cellule vers sa survie ou sa mort. Il est bien établi que les dérèglements de l'apoptose sont primordiaux dans la formation de tumeurs, puisque les cellules cancéreuses ont perdu leur capacité à se suicider par ce processus actif. Ainsi, les cellules cancéreuses présentent fréquemment une altération des voies d'induction ou d'inhibition de l'apoptose et plusieurs formes de cancers sont liées à une suppression atypique des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl2, Bcl-xL, Mcl-1...

CHAPITRE I

L' APOPTOSE ET MECANISMES DE REGULATIONS

I- L'apoptose

I -1- la mort cellulaire :

Le concept de mort cellulaire et de son contrôle est devenu central dans la physiopathologie du cancer à partir de la fin des années 1970 et notamment à la suite des travaux de Horvitz H. R et son équipe. Néanmoins, le cancer au niveau cellulaire, pourrait ne pas être défini de manière négative, mais plutôt présenté comme un excès de vie corrélé avec un défaut de la réponse à l'induction de mort.

Le mot Apoptose provient d'une locution grecque "απο" et "πτωσις" signifiant "chute des feuilles", Il a été utilisé pour la première fois en 1972 par Kerr et *Al*, pour décrire une mort cellulaire morphologiquement, biochimiquement et moléculairement différente de la nécrose, la seule forme de mort cellulaire connue jusqu'à alors (**Kerr JF et al ; 1991**)

Alors que la nécrose est la conséquence passive d'une agression cellulaire, l'apoptose est parfaitement intégré dans le processus physiologique normal de la cellule par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées de l'organisme. Il joue notamment un rôle déterminant dans l'embryogenèse (par exemple, l'individualisation des doigts), certains changements morphologiques (par exemple, la régression de la queue du têtard et la métamorphose de certains insectes), l'homéostasie cellulaire, l'atrophie (par exemple, les menstruations), le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire (par exemple, l'apprentissage du soi par les lymphocytes), la réparation des tissus et en fin dans la régression des tumeurs.

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), les maladies cardio-vasculaires (infarctus), le SIDA (caractérisé par la disparition des lymphocytes T CD4+). Plusieurs études ont suggéré également qu'un dérèglement du processus apoptotique est à la base de maladies inflammatoires comme l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, etc (**Griffith et al ; 1995**)

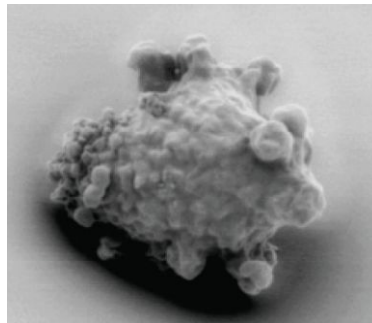
I -2- Caractéristiques de l'apoptose :

En dépit de la diversité des signaux de mort, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires, suggérant l'existence d'une phase de dégradation commune à tous les types cellulaires.

I-2-1- caractéristique morphologique :

Les premiers événements morphologiques observables quand une cellule entre en apoptose sont la ségrégation de la chromatine à la périphérie de l'enveloppe nucléaire, la condensation du cytoplasme et la formation d'invaginations des membranes plasmiques et nucléaires, donnant un aspect de bourgeon à la surface membranaire périphérique.

L'évolution des invaginations membranaires aboutit à la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques, vésicules membranaires contenant le cytoplasme et les organites dégradés.. *In vivo*, les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés principalement par les macrophages ou les cellules voisines. La cellule va signaler son état apoptotique à son environnement, notamment grâce à la translocation des molécules de phosphatidylsérines du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique (allen et al ; 1997). Ce processus de phagocytose rapide empêche la libération du cytoplasme de la cellule apoptotique dans le milieu environnant et évite ainsi toute réaction inflammatoire.



Cellule en apoptose

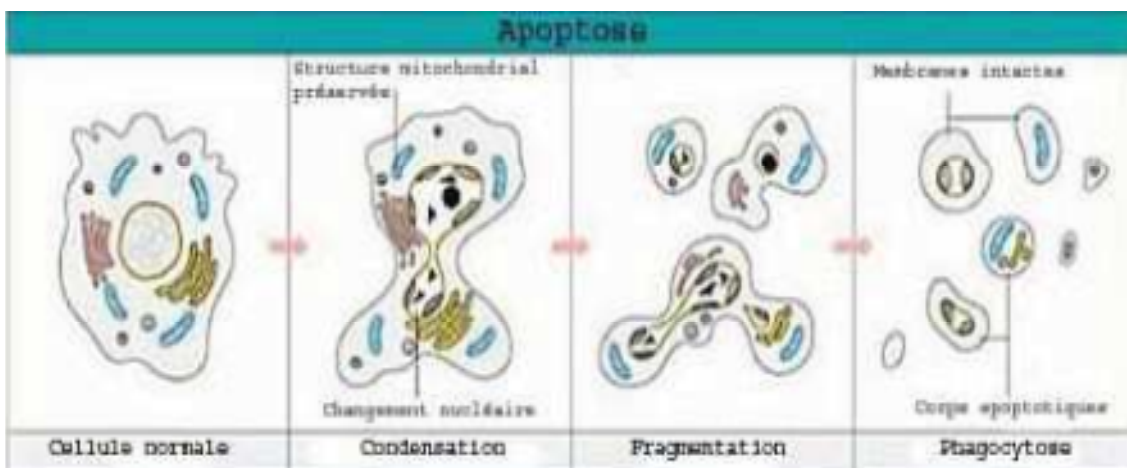


Figure 01 : Représentation schématique de la cellule en apoptose

I-2-2 caractéristique biochimique :

Plusieurs modifications biochimiques sont observées dans les cellules apoptotiques :

- Modification des flux calciques responsables de l'activation de nombreuses enzymes, dont les nucléases qui induisent la fragmentation de l'ADN
- Activation de trans-glutaminases impliquées dans la réorganisation des éléments du cytosquelette menant aux invaginations membranaires et à la formation des corps apoptotiques.
- Activation des protéinases cystéine-aspartate dépendantes (caspases).
- Accumulation des céramides.
- Génération de radicaux libres et FRO.
- Perte de l'asymétrie de la membrane plasmique et externalisation de la phosphatidylsérine (PS) depuis le feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane. Ce phénomène d'externalisation et d'exportation de la PS dans la couche externe de la membrane cellulaire apparaît tôt dans l'apoptose et semble indépendant du type cellulaire. Un changement dans la composition et l'expression des oligosaccharides de surface est également observé à la surface des cellules apoptotiques. la reconnaissance de PS et les oligosaccharides est faites par les récepteurs de la vitronectine et de la fibronectine des macrophages
- clivage inter-nucléosomal de l'ADN : Des endonucléases génèrent des fragments d'ADN réguliers multiples de 180-200 paires de bases (pb) donnant un profil caractéristique dit en « barreaux d'échelle » sur gel d'agarose. Parfois l'ADN peut être fragmenté en éléments de plus grande taille (50-300 kpb) notamment dans le cas d'apoptose indépendant des caspases. (Wyllie et al; 1984)

I-2-3- l'atteinte mitochondriale :

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'implication des mitochondries au cours du processus apoptotique. Leur participation dans l'apoptose est associée à une transition de la perméabilité membranaire (MTP; *Membrane transition permeability*) et l'effondrement du potentiel trans-membranaire mitochondrial, résultant de l'ouverture de mégapores mitochondriaux.

Les conséquences de l'ouverture des pores mitochondriaux sont multiples : rupture du métabolisme énergétique, formation de radicaux libres lors du découplage de la chaîne respiratoire, libération de facteurs apoptotiques séquestrés dans la matrice, comme le cytochrome c, des pro-caspases et AIF (*Apoptosis inducing factor*), augmentation de la concentration de Ca⁺⁺ intracellulaire.

II- les gènes de l'apoptose :

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

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

De plus les homologues des gènes *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* et *egl-1* ont été identifiés chez les mammifères et correspondent chacun à une famille de gènes, Bid/Bim (IAP), Bcl-2, Apaf-1 et Caspases, ce qui aboutit à une grande diversification d'action de ces molécules pro ou anti-apoptotiques.

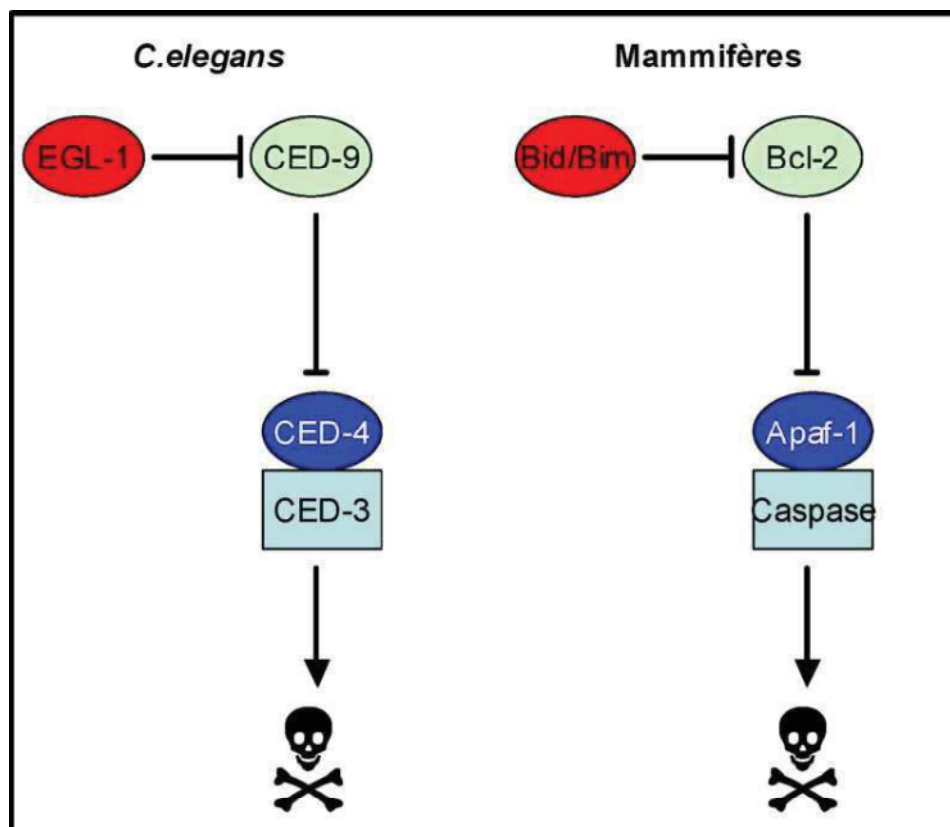


Figure 02 : les gènes de l'apoptose

II-1- les caspases :

La plupart des changements morphologiques et biochimiques observés au cours de l'apoptose résulte de l'activation de protéases intracellulaires spécifiques, les caspases.

Les caspases sont les homologues mammifères de Ced-3. Ces protéases présentent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu aspartique. C'est d'ailleurs sur base de cette propriété qu'Alnemrien 1996 les a dénommées "caspases", pour "*CysteinyI aspartate specific protease*". Ils ont toute une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes.

Les caspases sont constituées d'un pro-domaine N-terminal de longueur variable allant de 23 à 219 acides aminés, suivi d'un domaine de 17 à 21 kDa (P20) qui deviendra après clivage la grande sous-unité et enfin d'un domaine C-terminal de 10 à 14 kDa (P10) qui constituera la petite sous-unité.

II-1-1- classification des caspases :

A ce jour, On connaît 14 caspases différentes dont 11 chez l'Homme, qui peuvent être réparties en 3 groupes en fonction de leur structure et de leur réactivité : les caspases initiatrices, effectrices et activatrices de cytokines (inflammatoire) (**Lavrik et al ; 2005**).

Les pro-caspases initiatrices possèdent un pro-domaine N-terminal long contenant au moins 103 résidus (jusqu'à 200 résidus pour les pro-caspases-8 et -10). Les segments N-terminaux des caspases-8 et -10 contiennent des domaines effecteurs de mort (DED; Death effector domain), alors que les caspases-1,-2,-4 et -9 possèdent un domaine de recrutement (CARD; Caspase recrutement domain). Ces différents domaines (DED et CARD) sont impliqués dans le processus d'activation des caspases par des interactions protéines-protéines. Les caspases effectrices possèdent un pro-domaine court leur maturation et activation dépendent des caspases initiatrices. La séquence des sites de clivage séparant les sous-unités des caspases effectrices correspond aux séquences consensus reconnues par les caspases initiatrices.

Les caspases-1, -4, -5, -11, -12, et -13 ne sont pas directement impliquées dans le processus apoptotique mais semblent plutôt jouer un rôle dans l'inflammation probablement en induisant le clivage de cytokines pro-inflammatoires comme l'Il-1 β et -18.

La caspase-12, bien qu'appartenant à la sous famille des caspases inflammatoires, a été récemment décrite comme la caspase médiant l'apoptose au niveau du réticulum endoplasmique (**Nhan et al ; 2006**).

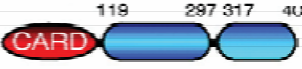

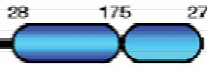


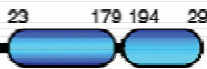
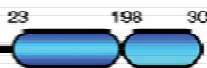




	<i>Structure des procaspases</i>	<i>Séquence de substrat spécifique</i>	<i>Fonction</i>	<i>Type de caspase</i>
Caspase-1		WEHD YEVD	Inflammation	
Caspase-2		DEHD VDVAD	Apoptose	Initiatrice
Caspase-3		DEVD DNQD	Apoptose	Effectrice
Caspase-4		LEVD (W/L)EHD	Inflammation	
Caspase-5		(W/L)EHD	Inflammation	
Caspase-6		VEID VEHD	Apoptose	Effectrice
Caspase-7		DEVD	Apoptose	Effectrice
Caspase-8		(I/L)ETD	Apoptose	Initiatrice
Caspase-9		LEHD	Apoptose	Initiatrice
Caspase-10		IEAD	Apoptose	Initiatrice
Caspase-14		?	Différentiation kératinocytaire	

Figure 03 : structure proteique et classification des caspases

II-1-2- régulations des caspases :

La plupart des cellules animales expriment constitutivement plusieurs types de caspases, conservées sous leur forme inactive de pro-caspases. Etant donné que certaines de ces pro-caspases ont la capacité de s'auto-activer et d'engendrer, via une réaction d'activation en chaîne, un processus protéolytique irréversible et fatale pour la cellule, il n'est pas surprenant que ces protéines soient étroitement régulées tant au niveau de leur activation que de leur activité.

Plusieurs mécanismes jouent un rôle dans la régulation des caspases, nous allons citer quelques un

a- Régulation par phosphorylation :

Il a été montré que le degré de phosphorylation des pro- et/ou caspases module leur activation/activité.

b- Régulations redox :

Bien que leur rôle reste à éclaircir, la formation de FRO est susceptible de moduler directement l'activité des caspases. En effet, le site catalytique des caspases contient un résidu aminé cystéine. Pour que l'enzyme soit actif, le groupement thiol de ce résidu doit être sous forme réduite (Faddeel et *al* ; 1998).

c- Régulations topographique :

La séquestration des pro-caspases dans des compartiments cellulaires différents (comme la mitochondrie, le noyau, le cytoplasme) semble constituer un mode de régulation important, en limitant, par l'existence de barrières physiques, leur activation et en les maintenant à distance de leurs substrats ou de molécules activatrices dans les cellules en vie.

d- Régulations protéine-protéine :

Les caspases sont régulés par plusieurs protéines telles que FADD, TRADD, RAIDD.

e- Régulations par des inhibiteurs de l'apoptose IAPs :

Les IAP ont été décrites pour la première fois à partir de génomes de baculovirus, par l'équipe de Miller en 1993. Cette découverte a permis d'identifier deux motifs conservés dans les IAP : un domaine (répété 1 à 3 fois) appelé BIR (Baculovirus IAP Repeat) et un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de zinc nommé RING. Toutes les IAPs possèdent le domaine BIR et il est essentiel à leurs propriétés anti-apoptotiques, alors que seules quelques-unes des IAPs possèdent un domaine RING. Chez l'Homme on a identifié 8

IAPs d'où 5 seulement contiennent le domaine RING.

Les IAPs agissent soit en bloquant l'activation des pro-caspases, soit en inhibant l'activité des caspases matures (**Hunter et al ; 2007**), Enfin, l'activité des IAPs ne semble pas se limiter à l'inhibition des caspases car elles interviendraient dans la régulation du cycle cellulaire et dans des cascades de signalisation caspases-indépendantes.

L'activité de ces IAPs cellulaires peut être négativement régulée par des protéines mitochondriales tels que Smac/DIABLO

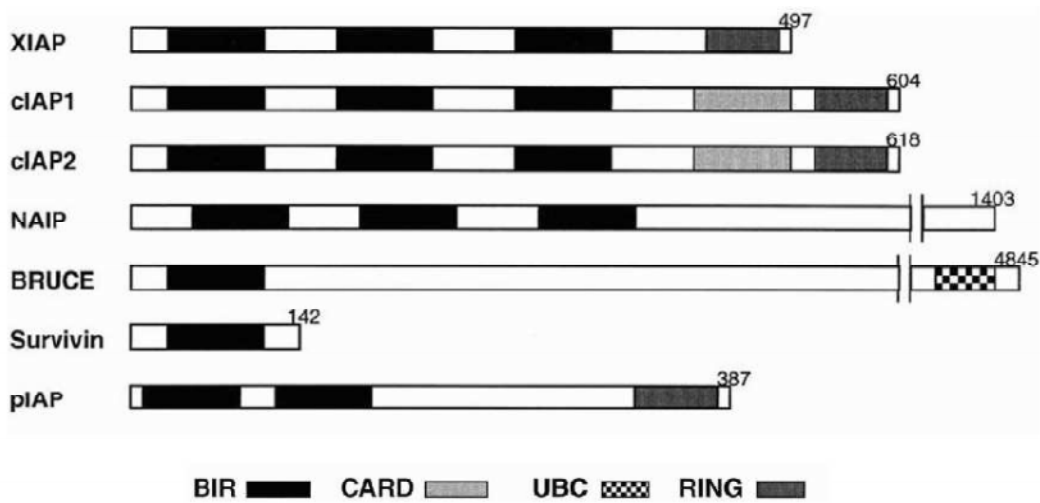


Figure 04 : Structure des IAPs

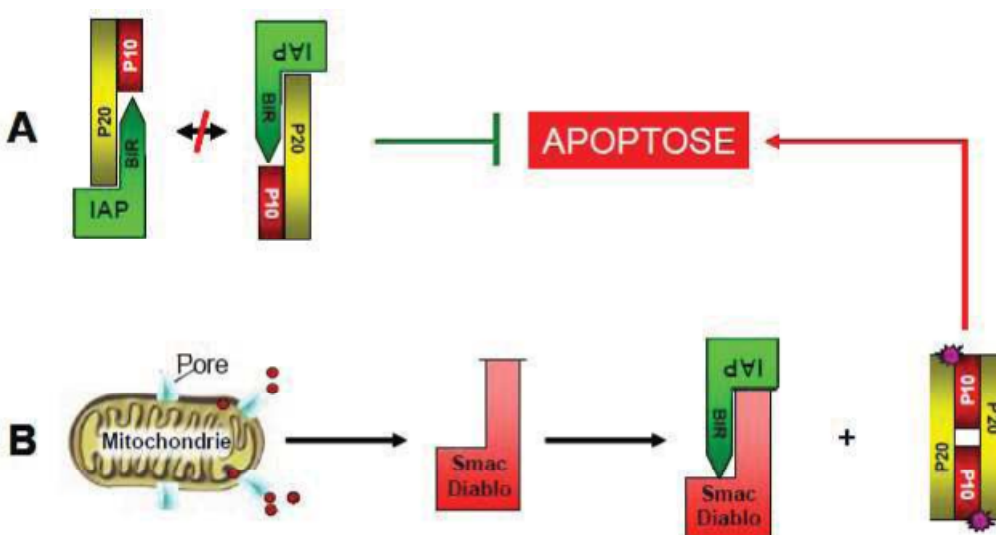


Figure 05 : Mécanismes de l'inhibition des caspases par les IAP.

A-Situation non-apoptotique

B-Situation apoptotique

II-1-3- l'activation des caspases :

L'activation des caspases passe par le clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de 2 sites consensus contenant un résidu aspartique. Le clivage entre les sous-unités précède l'excision du pro-domaine N-terminal. Chaque caspase activée résulte du clivage protéolytique et de l'auto-association de 2 pro-caspases formant un ensemble tétramérique (homodimère d'hétérodimères) contenant 2 sites actifs situés aux extrémités de la protéine. Le pro-domaine N-terminal semble jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines et est impliqué dans la régulation de l'activité de ces caspases. Une propriété importante des caspases initiatrices est leur capacité à s'autoactiver et/ou d'être activées par d'autres caspases. Il peut donc y avoir une cascade d'activation entre les différentes caspases. Une fois activées (mécanisme d'auto-activation), elles vont pouvoir cliver d'autres caspases encore à l'état de zymogène, notamment les caspases effectrices (mécanisme d'hétéro-activation).

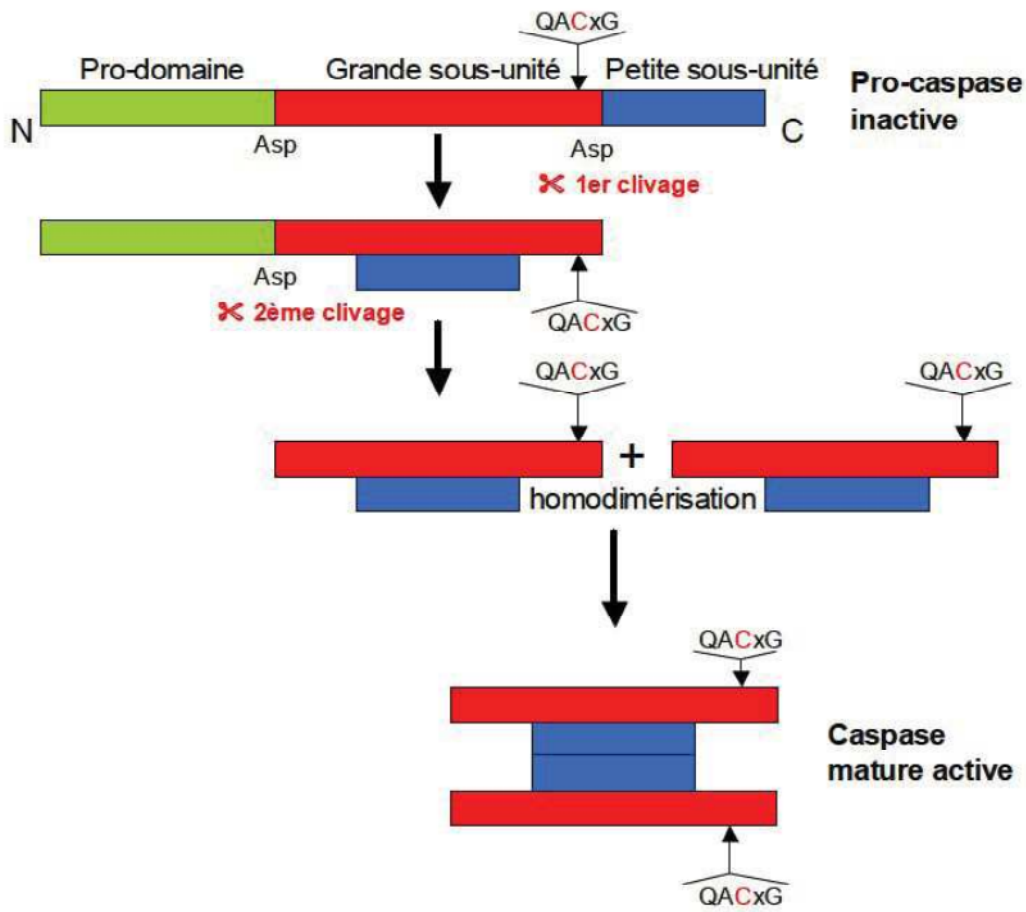


Figure 06 : mécanisme d'activation des pro-caspases

a- L'auto-activation des caspases initiatrice :

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

a-1- Activation des pro-caspases-2, -8, -10 :

L'activation des caspases-2, -8, et -10 résulte de la stimulation de récepteurs membranaires possédant un motif intracellulaire riche en résidus cystéines et un domaine intracellulaire DD(Death domaine). En réponse à un ligand, les récepteurs trimérisent et recrutent des protéines adaptatrices. La pro-caspase-8 ou la pro-caspase-10 s'oligomérisent par l'intervention de la protéine adaptatrice FADD (Fas protein with DD) au niveau de leur domaine DED. FADD, par son domaine DD, peut être directement couplé au récepteur Fas ou indirectement au TNF-RI par l'intermédiaire de TRADD (TNF-R associated protein with DD) (Hsu *et al*; 1995). Le complexe, ainsi constitué du récepteur, de FADD et de la pro-caspase, est nommé DISC (Death-including signaling domains DED complex).

Le recrutement de la pro-caspase-2 au récepteur se fait par l'interaction séquentielle de TRADD, avec la procaspase-2 via leur domaine CARD et avec d'autres protéines telles que la sérine/thréonine kinase RIP (Receptor interacting protein) et la protéine RAIDD (RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with DD) via leurs domaines DD. (Duan et Dixit, 1997)

L'activation des pro-caspases initiatrices par interaction avec les récepteurs membranaires à DD est parfois appelée voie extrinsèque de l'apoptose. En effet cette voie est activée suite à un signal extracellulaire.

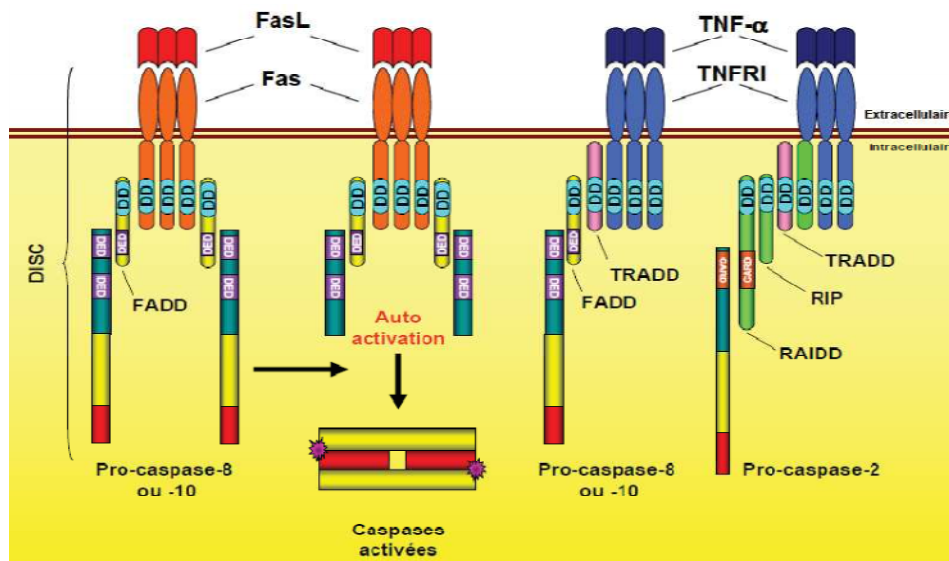


Figure 07 : mécanisme d'activation des caspase initiatrice

a-2- Activation de la pro-caspase-9 :

Le mécanisme de maturation de la pro-caspase-9 est comparable à celui des pro-caspases initiatrices-2, -8 et -10. Son activation dépend de la formation d'un complexe multiprotéique, l'apoptosome. L'apoptosome est constitué du cytochrome c libéré de la mitochondrie, d'Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor-1), d'ATP et de la pro-caspase-9. Dans ce complexe, Apaf-1 joue le rôle de protéine adaptatrice. Il possède en effet une région de liaison CARD, impliquée directement dans le recrutement de la pro-caspase-9. Lorsque les cellules sont quiescentes, Apaf-1, est séquestré à la surface de la mitochondrie dans une conformation tridimensionnelle inactive (Zou et al; 1999).

Dans un contexte apoptotique, le cytochrome c et l'ATP lient Apaf-1, induisant un changement conformationnel permettant de démasquer alors la région CARD : la pro-caspase-9 est ainsi recrutée.

L'activation des pro-caspases initiatrices via la formation de l'apoptosome et altération des structures mitochondriales est appelée voie intrinsèque de l'apoptose. En effet cette voie est généralement activée suite à un signal intracellulaire.

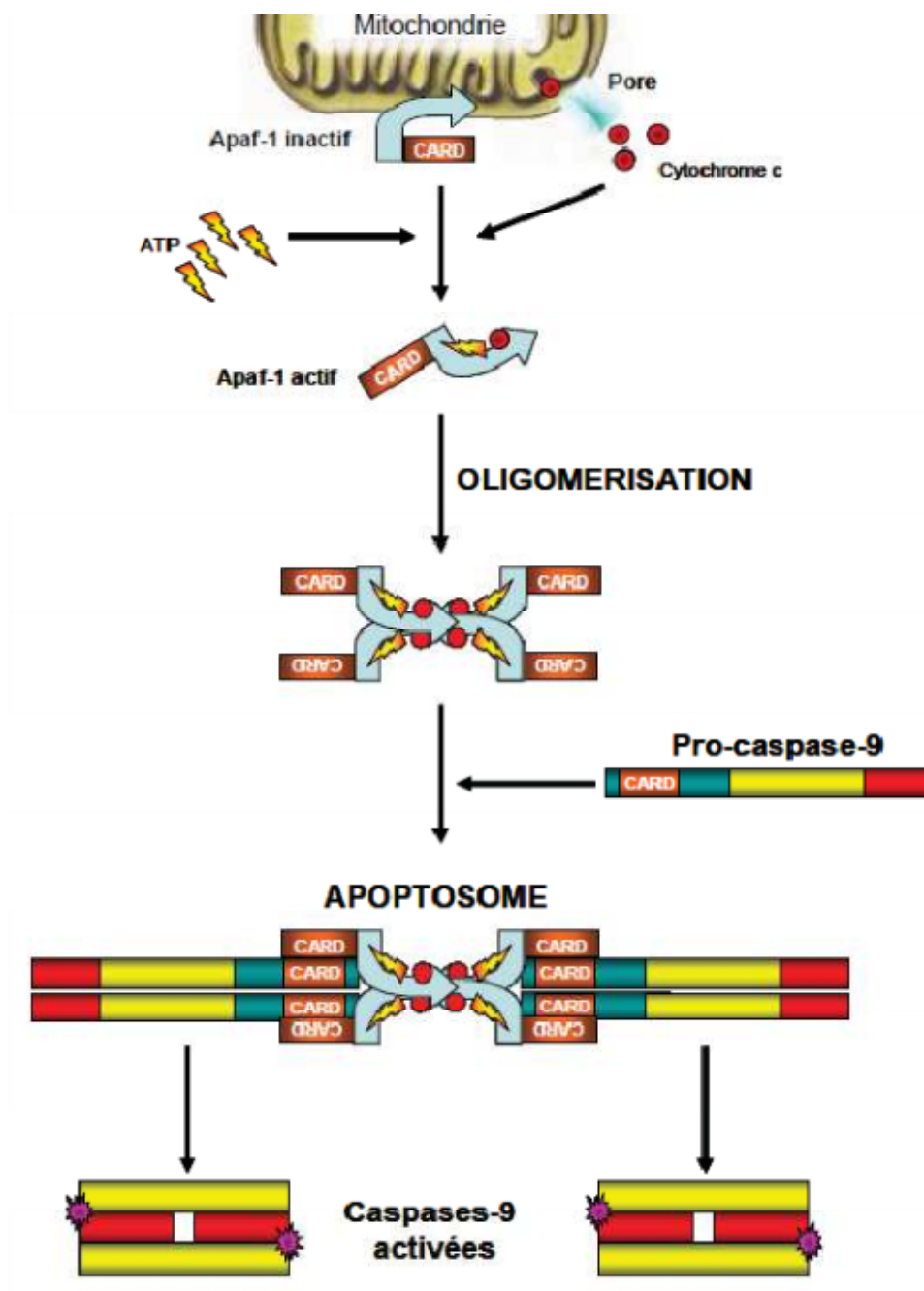


Figure 08 : Activation de pro-caspase -9 et la formation de l'apoptosome

b- La trans-activation des caspases effectrices :

Les caspases-3, -6 et -7, regroupées sous le nom de caspases effectrices, ne peuvent être activées par un mécanisme d'auto-activation. Ainsi leur clivage protéolytique est pris en charge par d'autres caspases, généralement des caspases initiateuses. Des études, menées sur des extraits cellulaires ou sur des cellules de levures transfectées, ont en effet démontré que les caspases initiateuses sont capables d'activer efficacement les caspases effectrices. Dans ces systèmes, l'activation protéolytique des caspases-3 et -7 par l'action directe des caspases-8 et -10 a été mise en évidence (**Kang et al ; 1999**). De même, la caspase-9 est capable d'induire l'activation des pro-caspases-3 et -7 (**Srinivasula et al ;1998**).

Alors que le clivage des pro-caspases-3 et -7 peut résulter de l'action directe des caspases-8, -9, -10, des expériences *in vitro* montrent que la pro-caspase-6 est clivée uniquement par les caspases-3 et -7). Ainsi, les caspases-8, -9, et -10 sont décrites comme les protéases gouvernant l'activation séquentielle des caspases effectrices dans l'apoptose médiée par les récepteurs membranaires ou par la mitochondrie. Ce type d'activation en cascade permettrait la régulation et l'amplification du signal apoptotique. Toutefois, des études *in vitro* démontrent que les caspases effectrices peuvent également cliver des caspases initiateuses. Par exemple, la caspase-3 est douée d'une activité protéolytique vis-à-vis de la pro-caspase-8 et des pro-caspases-2 et -9. Et également la caspase-6 active est capable de protéolyser les caspases initiateuses-8 et -10. Ces différents travaux suggèrent l'existence d'une boucle de rétrocontrôle *in vivo*. (**Stennick et al ; 1999**).

c- Substrats des caspases effectrices :

Au cours de la réponse apoptotique, les caspases effectrices peuvent être comparées à de petits ciseaux découpant spécifiquement des petits «bouts » de la cellule menant *in fine* à sa mort. Plus d'une centaine de protéines substrats des caspases ont été décrites, notamment lors de l'apoptose. Parmi elles, on peut citer une enzyme de réparation nucléaire, la PARP (poly-ADP Ribose Polymerase). Elle est la cible majeure du clivage protéolytique par les caspases effectrices qui l'inactivent. D'autres protéines de structure de l'architecture cellulaire comme, la gelsoline ou certaines lamines de l'enveloppe nucléaire, la fodrine, la β -caténine, sont également clivées. Les caspases effectrices peuvent aussi inactiver par clivage, certaines protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-2 ou Bcl-xL, contribuant ainsi à précipiter irréversiblement la cellule vers la mort. (**Lüthi et al, 2007**)

Parmi les caspases effectrices majeures, la caspase-3 est l'une des plus représentatives de par la nature de ses substrats et ses voies d'activation. En effet, elle catalyse le clivage de

nombreuses protéines essentielles pour la survie cellulaire comme la PARP, la PKC γ , ICAD41 responsables de la fragmentation de l'ADN, DNA-PK, Les protéines impliquées dans la machinerie traductionnelle, tels que des facteurs d'initiation de la traduction, comme eIF4GI, eIF2 α , sont également des cibles de la caspase-3. D'autres cibles sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, comme p21WAF1, dans l'adhésion cellulaire à la matrice, comme FAK (Focal Adhesion Kinase) ou dans l'architecture cytosquelettique, comme l'actine ou l' α -adductine

SUBSTRATS	TYPES DE PROTEINES
Bid, Caspases, DFF45, p28BAP31 (pro-apo.) Bcl-2, Bcl-x _L , FLIP _l , XIAP, IKKp (anti-apo.) IL-1p, IL-16, IL-18 (pro-inflam.)	Régulateurs apoptotiques et inflammatoires
DNA-PK, Raf-1, Weel, Akt, RasGAP, PP2A, FAK, RIP MEKK1	Protéines kinases et acteurs de la transduction du signal
A-fodrine, Actine, p-actine, Lamine A, B, C, Gelsoline, DNA polymérase I, Topoisomérases I et II	Protéines structurales, cytoplasmiques et nucléaires
PARP, DNA-PK, RAD51, ATM P27, p21, Weel, MDM2 Huntingtine, APP	- Facteurs de la réparation de l'ADN - Régulateurs du cycle cellulaire - Facteurs associés à des pathologies

Tableau 01: Quelques substrats des caspases au cours de l'apoptose

II-2- les membres de la famille Bcl-2 :

C'est l'homologue mammifères de Ced-9. Les membres de cette famille se divisent en deux sous-groupes fonctionnels ; les membres pro-apoptotiques et les membres anti-apoptotiques.

II-2-1- Structure des protéines de la famille Bcl-2 :

Quatre régions conservées sont identifiées dans Bcl-2 et retrouvées chez différents membres de cette famille. Elles sont désignées BH1, BH2, BH3 et BH4 pour « Bcl-2 Homology ». Ces domaines protéiques sont impliqués dans la régulation des interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille et avec d'autres protéines cellulaires régulatrices de l'apoptose (Cory *et al*, 2002).

a- Les membres pro-apoptotiques :

Les protéines dont la fonction est de promouvoir l'apoptose sont représentés principalement par : Bax, Bcl-xs, Bik, Bak, Bad, Bid et Noxa. Ils possèdent plusieurs des domaines d'homologie (protéines à « multi-domaines ») à Bcl-2, notamment BH3. Ce domaine est suffisant pour qu'elles interagissent leur interaction avec les membres anti-apoptotiques, ainsi que pour exercer leur fonction pro-apoptotiques. Les protéines dites « BH3-only », comme Bad ou Bid sont également des activateurs potentiels de la mort cellulaire comme nous le verrons plus loin.

b- Les membres anti-apoptotiques :

Ceux-ci incluent majoritairement : Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1 et Bcl-2. Les domaines d'homologie BH1 et BH2 sont essentiels à leur fonction anti-apoptotique et à leur interaction avec Bax. Le domaine BH4 de Bcl-2 est indispensable à son hétérodimérisation avec Bax et à l'inhibition de l'apoptose. Celui-ci correspond à la première hélice- α des ces membres et est largement responsable du contrôle de leurs activités anti-apoptotiques (**Huang et al; 1998**).

c- Les protéines « BH3 only » :

Il existe huit protéines « BH3 only » chez les mammifères (1 seule chez *C. elegans*). Ces protéines peuvent agir sur l'apoptose par deux mécanismes. Le premier consiste en l'inactivation des protéines anti-apoptotiques par liaison directe. L'autre par activation de protéines pro-apoptotiques telles que Bax ou Bak.

Ces protéines « BH3 only » peuvent être classées en deux sous-groupes : les « activateurs » (Bim, Bid) qui interagissent directement avec les protéines pro-apoptotiques et les « sensibilisateurs » qui n'interagissent qu'avec les protéines anti-apoptotiques, entraînant leur déplacement et la libération de protéines pro-apoptotiques.

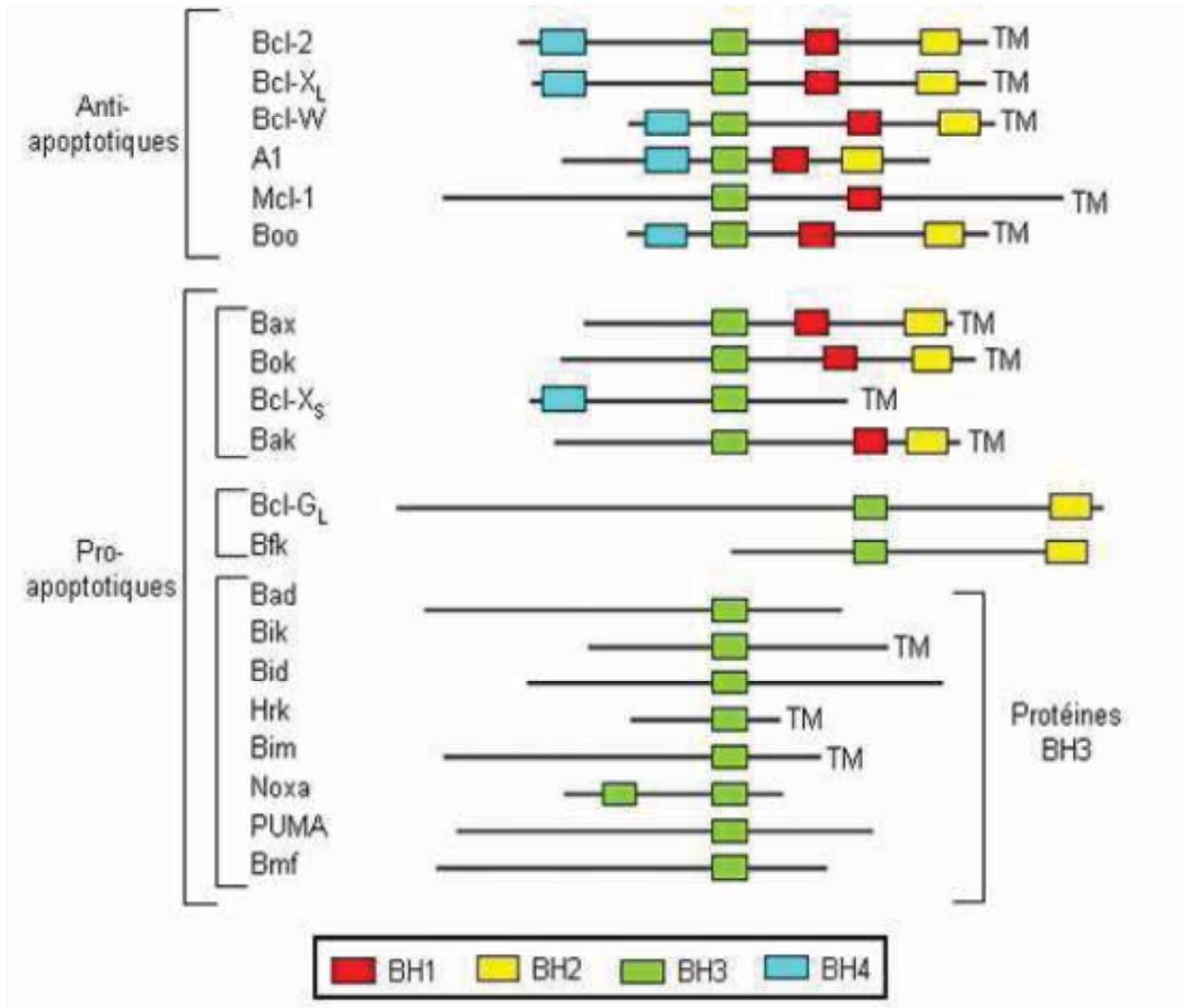


Figure 09 : structure et classifications des membres de la famille Bcl-2

II-2-2-Régulations fonctionnelles des protéines de la famille Bcl-2 :

a- Le concept initial de la dimérisation :

Les mécanismes de régulation de l'activité des protéines codées par les gènes de la famille Bcl-2 reposent essentiellement sur des interactions (homodimérisations ou hétérodimérisations) entre les membres de cette famille. Par exemple, le dimère Bcl-2/Bcl-2 ou Bcl-2/Bax inhibe l'apoptose, alors que l'homodimère Bax/Bax est un promoteur de l'apoptose. Au cours des années 1990, l'équipe de Stanley J. Korsmeyer a proposé un modèle de « rhéostat moléculaire » du contrôle de la réponse apoptotique. D'après ce modèle, l'orientation de la cellule vers la survie ou la mort résulte du rapport entre les niveaux des activateurs et des inhibiteurs de l'apoptose. Toute fois ce modèle ne tient pas compte des modifications post transcriptionnelles et post-traductionnelles des acteurs impliqués, ni de leurs localisations intracellulaires, notamment des protéines « BH3 only » (Puthalakath *et al*; 2002), ces protéines ne comportant qu'un domaine BH3, comme Bad ou Bid, ne peuvent pas former d'homodimères et ne possèdent pas d'activité pro-apoptotique intrinsèque. En fait, ils rempliraient leur rôle pro-apoptotique en formant des dimères avec des membres inhibiteurs de l'apoptose (comme Bcl-xL). Ainsi, ils réduiraient la capacité de ceux-ci à former des homodimères protecteurs, et dans le même temps favoriseraient la constitution de dimères pro-apoptotiques.

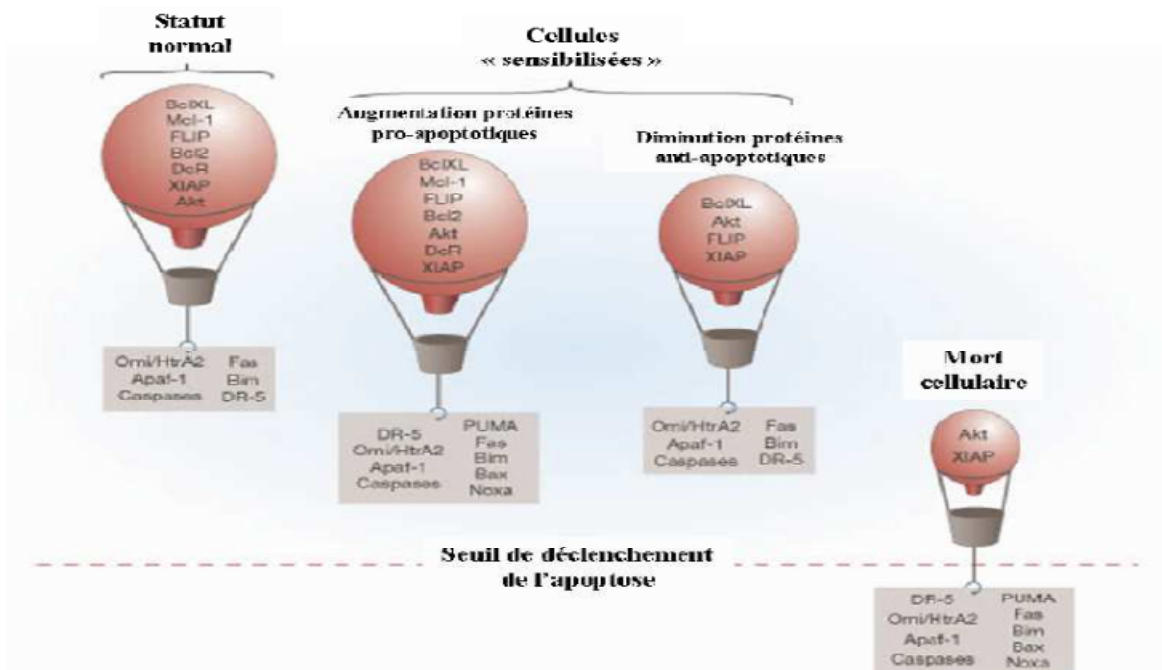


Figure 10 : Représentation schématique du modèle de « rhéostat » moléculaire.

b- Par phosphorylation :

Le rôle des protéines de cette famille peut également être modulé par des modifications post-traductionnelles, telles que les phosphorylations (la phosphorylation empêche la dimérisation). En présence de facteurs de croissance liés à leurs récepteurs membranaires, Bad est phosphorylée par la voie de la kinase Akt/PKB. Ceci entraîne l'association de Bad avec la protéine cytosolique 14-3-3. En période de stress trophique, Bad n'est plus phosphorylée et ne peut être alors séquestrée par la 14-3-3. Une fois le domaine BH3 de Bad ainsi libéré, celle-ci peut interagir avec Bcl-xL, inhibant ainsi son action protectrice, libérant à son tour Bax et Apaf-1.

D'autres documents suggèrent que la protéine Bax peut également être séquestrée dans le cytoplasme par l'isoforme 14-3-3 θ , indépendamment de la phosphorylation de Bax. Un autre exemple de régulation par phosphorylation est celui de Bcl-2. Après traitement des cellules avec du Taxol (agent chimiothérapeutique) ou l'utilisation d'acideokadaïque (inhibiteur de phosphatase), la protéine Bcl-2 est phosphorylée sur des résidus sérine 70 et 87, rendant Bcl-2 incapable d'inhiber l'apoptose. (Basu *et al* ; 2006)

c - Par clivage :

Un autre mécanisme de régulation des protéines de la famille Bcl-2, est leur clivage, entraînant leur activation fonctionnelle. L'exemple le plus documenté est celui de Bid qui devient active après protéolyse spécifique. Lors de l'initiation de la signalisation apoptotique par les récepteurs de mort, et si la réponse de mort engendrée n'est pas suffisante, la caspase-8 clivera alors Bid (tBid) au niveau de son extrémité C-terminale. Le domaine BH3 de tBid est alors démasqué et l'augmentation de sa surface hydrophobique provoque sa translocation du cytosol vers la membrane mitochondriale.

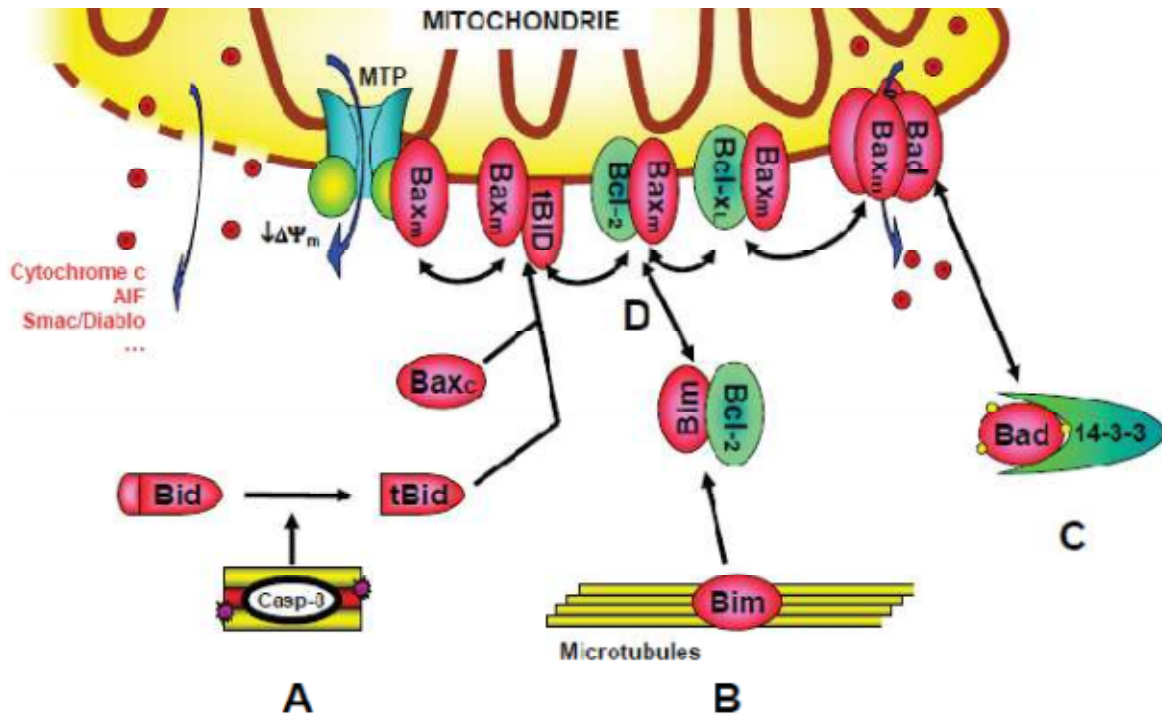


Figure 11 : Exemples de mécanismes par lesquels les membres de la famille Bcl-2 régulent l'apoptose.

III -Les voie de signalisations apoptotique

Malgré la découverte d'acteurs importants dans le processus du mort cellulaire, peu d'éléments sont encore connu pour construire une image cohérente de la façon dont le programme apoptotique se déclenche et est régulé. Cependant, on peut dégager des mécanismes généraux qui se sont conservés au travers de l'évolution et qui font intervenir des protéines dont l'expression conditionne la survie cellulaire comme par exemple les caspases, des cytokines, les protéines de la famille Bcl-2, *etc.* Le processus apoptotique peut être divisé en trois phases chronologiques successives. Les deux premières, dites d'initiation et de décision sont toutes les deux réversibles et modulables par des facteurs anti-apoptotiques. La troisième phase, dite d'exécution ou de dégradation protéique et nucléaire est une phase irréversible.

a- La phase d'initiation :

L'apoptose peut être déclenchée par des stimuli aussi variés qu'ils soient extra-cellulaires ou intra-cellulaires.

Les signaux extra-cellulaires

- L'absence de signaux de survie
- L'activation des récepteurs de mort

Les signaux intra-cellulaires

- endommagement de l'ADN
- Le stress du réticulum endoplasmique (ER stress)

b- La phase de décision :

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

c- La phase d'exécution :

Cette étape fait appel aux caspases effectrice et aux nucléase, une phase irréversible qui confère à la cellule les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose.

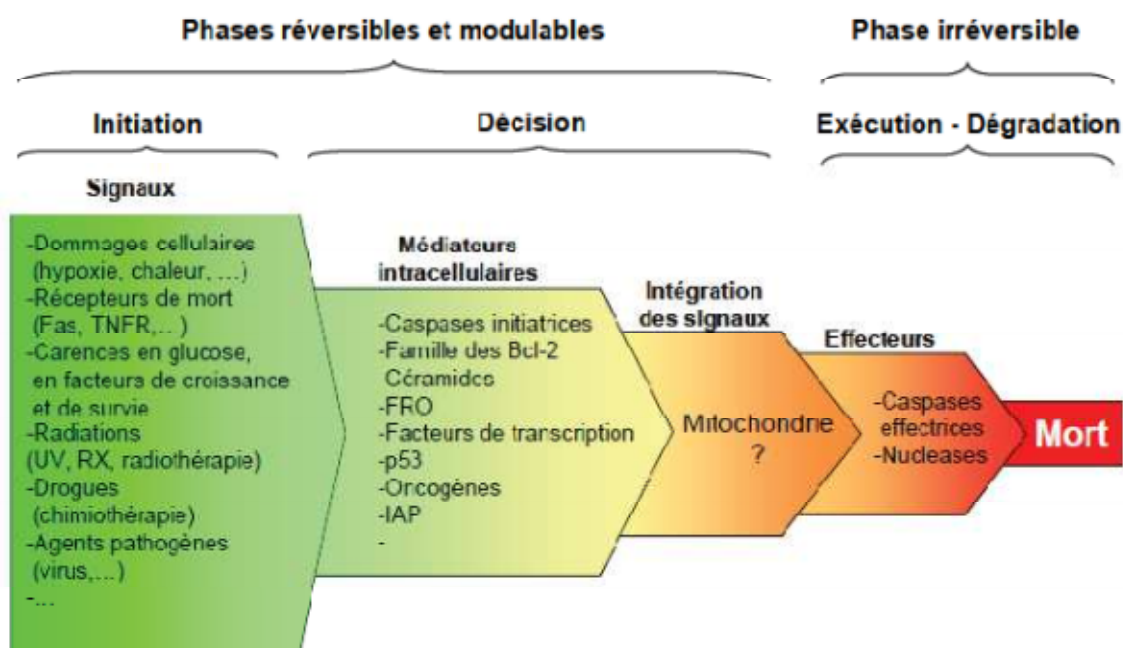


Figure 12 : Les phases de l'apoptose - Intégration séquentielle du signal apoptotique.

III-1- Les différentes voies de l'apoptose :

Il existe deux voies principales de signalisation aboutissant à l'apoptose :

La voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (voie intrinsèque) mettant en jeu la mitochondrie. Ces deux voies aboutissent à l'activation des caspases. Toutefois, il existe également une voie indépendante des caspases qui met en jeu la protéine mitochondriale AIF (« apoptosis-inducing factor »), ainsi qu'une voie passant par le réticulum endoplasmique.

III-1-1-La voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) :

Cette voie est initiée par des ligands de mort extracellulaires de la famille du TNF (« tumor necrosis factor ») tels que TNF α , FasL/CD95L (« fibroblast-associated ligand »), et TRAIL (« TNF related apoptosis-inducing ligand ») qui se lient à des récepteurs de mort situés à la surface membranaire. Les récepteurs les plus décrits appartiennent à la famille du TNFR (« tumor necrosis factor receptor ») (Borner, 2003).

La fixation du ligand sur les récepteurs entraîne leur trimérisation. Grâce à un domaine d'environ 80 acides aminés (le domaine de mort ou DD pour « death domain »), les récepteurs trimérisés recrutent, dans le cytoplasme, une protéine adaptatrice telle que TRADD ou FADD.

Ces deux protéines adaptatrices se lient à la caspase-8 (caspase initiatrice) pour former le DISC (« death-inducing signaling complex ») ou casposome, *via* un domaine DED (« death effector domain »). La proximité de TRADD ou FADD stimule l'autoprotéolyse/activation de la pro-caspase-8. La caspase-8 activée est libérée du DISC et active alors les caspases effectrices -3, -6 et -7 pour amplifier le signal de mort. Cette voie peut être bloquée par :

- Des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP),
- Des inhibiteurs de caspases,
- Des FLIP (« FLICE-inhibitory proteins »), protéines homologues de la caspase-8 qui contiennent un domaine DED pour se lier à FADD sans pouvoir servir d'intermédiaire entre le signal apoptotique et les caspases effectrices. Ce ne sont pas des caspases initiatrices (**Thome *et al*; 1997**).

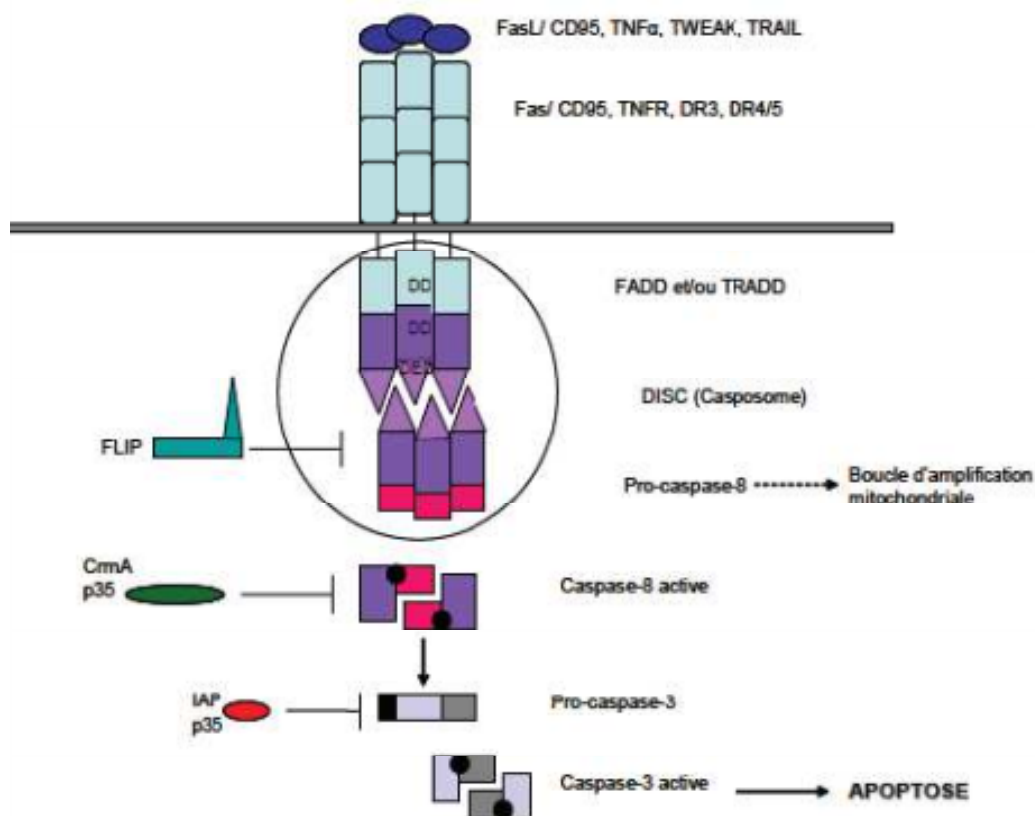


Figure 13 : la voie apoptotique extrinsèque

III-1-2-La voie mitochondriale (voie intrinsèque) :

La mitochondrie est un organite présent dans la majorité des cellules eucaryotes. Elle possède une double membrane, un génome circulaire et des systèmes propres de transcription/traduction. Elle a trois fonctions principales :

- La production d'énergie,
- La génération d'espèces réactives oxygénées
- La régulation de l'apoptose.

La mitochondrie est l'acteur principal des phénomènes apoptotiques (**Green et Kroemer, 1998**).

a- Voie mitochondriale caspase-dépendante :

La voie mitochondriale met en jeu de nombreuses protéines comme le cytochrome c (Cyt-c), et la protéine Smac/DIABLO

Le cytochrome c a été identifié pour la première fois en 1930 par Keilin et coll. Il est codé par un gène nucléaire, transcrit puis traduit dans le cytoplasme en un précurseur, l'apocytochrome, et transloqué dans la membrane externe mitochondriale. Il est ensuite transformé en un holo-cytochrome c suite à son attachement à un noyau hème. Le cytochrome c participe à l'assemblage de l'apoptosome. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1, et la pro-caspase 9, via des domaines CARD (caspase recruitment domain) ils forment ainsi un complexe multiprotéique à l'origine du clivage de la pro-caspase-9, et donc à son activation. Cette dernière activera à son tour des caspases exécutrices comme les caspases 3 ou 7 (**Slee et coll; 1999**)

La protéine murine Smac et son orthologue humain DIABLO, présentent un deuxième mécanisme aboutissant à l'activation en cascade des caspases. Ce sont des protéines mitochondriales synthétisées sous la forme de précurseurs de 29 kDa ; après protéolyse, elles deviennent des protéines matures de 23 kDa, pouvant être libérées en réponse à un stimulus apoptotique). Elles agissent sous forme de dimères et contribuent à l'activation des caspases en séquestrant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs :inhibitors of apoptosis). (**Verhagen et coll; 2000**)

b- Voie mitochondriale caspase-indépendante :

Plusieurs protéines contenues dans l'espace intermembranaire peuvent induire l'apoptose directement sans activation des caspases. C'est le cas de l'AIF et de l'endonucléase G (endo G) qui sont libérés de la mitochondrie puis transloqués dans le noyau provoquant la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN.

L'AIF (apoptosis inducing factor) est une flavoprotéine, Son gène est situé sur le chromosome X. L'AIF, présentant des homologies avec des enzymes de type oxydoréductases de plantes ou de bactéries. Ce facteur est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 67 kDa dont la partie N-terminale contient un domaine signal de localisation mitochondriale. Une fois introduit dans l'espace intermembranaire mitochondrial, il est clivé et libère une protéine mature de 57 kDa. L'AIF est libéré par la mitochondrie, transloqué dans le noyau des cellules en apoptose et induit, en coopération avec des endonucléases (notamment l'endonucléase G), le clivage de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires de 50 kpb (**Susin et coll; 1999**).

L'endonucléase G est une nucléase mitochondriale non-spécifique très conservée chez les eucaryotes. Elle est relarguée de la mitochondrie puis est transloquée dans le noyau. Elle digère l'ADN en absence d'activité caspase. L'endo G pourrait agir avec l'exonucléase et la DNase I dans le noyau pour générer les fragments d'ADN de haut poids moléculaire. Mais elle peut également générer des fragments oligonucléosomiques (**Samejima et al ; 2001**).

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

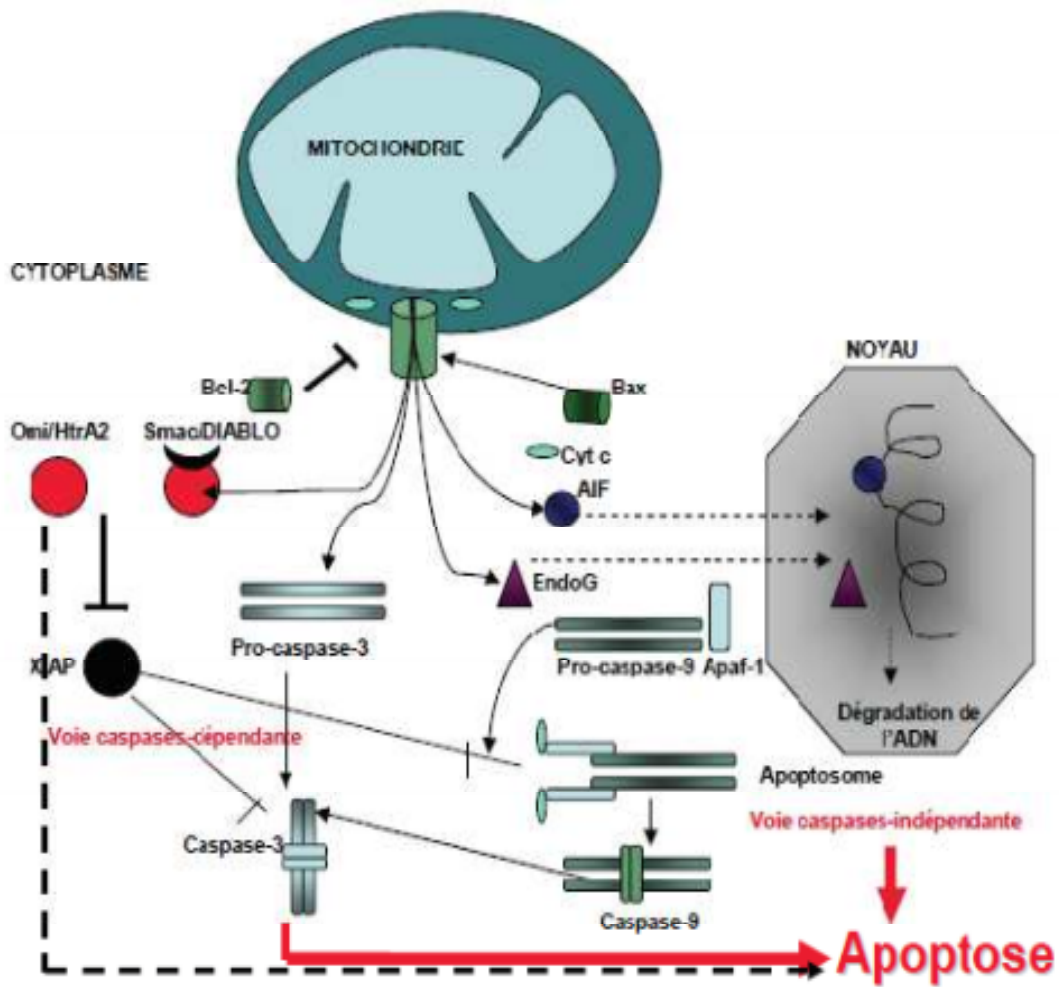


Figure 14: la voie apoptotique mitochondrial

III-1-3- La voie du réticulum endoplasmique :

Le réticulum endoplasmique régule la synthèse et le repliement des protéines, et a un rôle de maintien de l'homéostasie calcique. Il est essentiel à la survie de la cellule et toute perturbation de sa fonction induit l'apoptose.

Comme la mitochondrie, le réticulum endoplasmique contient des molécules pro-apoptotiques (caspase-12, p28Bap31 et GADD153) et anti-apoptotiques (GRP78, calreticuline et DAD1), de plus des membres de la famille Bcl-2 (Bcl-XL, Bax, Bak et Bik) sont associés avec le réticulum endoplasmique pour réguler l'homéostasie calcique et la mort cellulaire.

Plusieurs voies conduisant à l'apoptose par un stress prolongé du RE sont identifiées telle que :

- Premièrement, voie impliquant le facteur de transcription CHOP (« C/EBP homologue protein »)/GADD153. Il n'est pas ou peu exprimé dans les conditions physiologiques, mais suite à un stress, sa surexpression provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (**McCullough et al ; 2001**)

- Deuxièmement, voie passant par l'activation de la kinase c-JUN NH2-terminale (JNK). JNK est une protéine qui régule l'expression des gènes et qui est décisionnelle entre survie ou la mort cellulaire (**Oyadomari et al; 2002**).

- Troisièmement, voie mettant en jeu la caspase-12 localisée sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Cette caspase est activée après un stress au niveau du réticulum endoplasmique et non par la voie des récepteurs de mort ou par la voie mitochondriale. La caspase-12 serait activée par la m-calpaïne (« cytosolic calcium-activated neutral cysteine endopeptidase »), par IRE1a/TRAF2 et par la caspase-7. La m-calpaïne activée serait responsable du clivage de la procaspase-12 et de Bcl-XL. Une augmentation de calcium cytosolique activerait alors la caspase-12. La protéine TRAF2 pourrait recruter et activer la caspase-12. On a également décrit la translocation de la caspase-7 au niveau du réticulum endoplasmique après un stress. Elle pourrait donc activer, par clivage, la caspase-12.

L'apoptose induite par le calcium est régulée par les membres de la famille Bcl-2. Ils agissent sur la perméabilité des membranes du réticulum endoplasmique. Une surexpression de Bcl-2 empêche la libération trop importante de calcium, alors qu'une surexpression de Bak ou de Bax induit la libération de calcium. Il pourrait donc exister une redistribution précoce de Bax et de Bak au niveau des membranes du réticulum endoplasmique lors de l'apoptose. (**Hajnoczky et al; 2003**).

IV-Evolution chronologique des techniques de détection

Depuis sa première description, les outils de détection se sont développés. Les premières techniques mettaient en évidence les modifications morphologiques des cellules en apoptose, telles que la condensation du noyau ou la formation des corps apoptotiques. Des techniques plus récentes permettent de détecter des modifications au sein des cellules, notamment au niveau mitochondrial avec la libération du cytochrome c ou de l'AIF

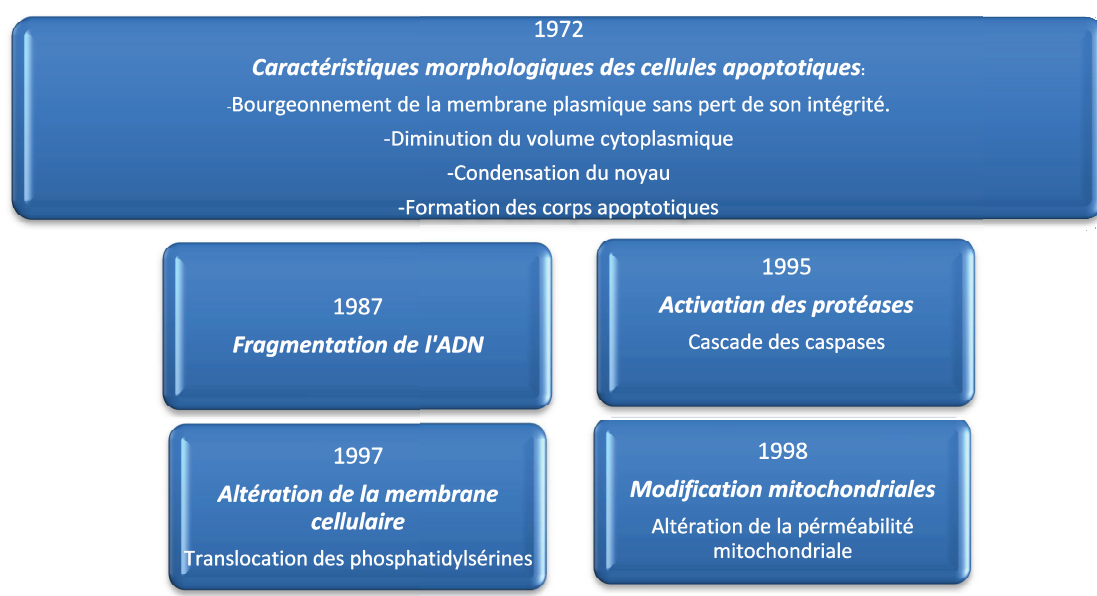


Figure 15 : Evolution chronologique des techniques de détection de l'apoptose

IV-1- Quelques techniques de détection :

Il existe de nombreuses techniques, permettant l'étude d'une étape précise de l'apoptose. Quelques une d'entre elles sont mentionnées ci-dessous.

IV-1-1-Altérations membranaires :

Pendant les stades précoces de l'apoptose, il y a translocation des phosphatidylsérines (PS) du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe. L'annexine V est une protéine qui se lie aux PS exposés à la surface des cellules apoptotiques. Ce phénomène a également lieu pendant la nécrose mais une discrimination est possible grâce à un double marquage avec un marqueur de viabilité (iodure de propidium).

Ce marquage peut être visualisé par microscopie en fluorescence, microscopie confocale ou cryométrie en flux. C'est une technique fiable pour des cellules non adhérentes. En revanche, dans le cas de cellules adhérentes, il est nécessaire de les décoller du support, ce qui peut entraîner des biais dans les résultats.

IV-1-2-Activation des caspases :

Plusieurs techniques peuvent être utilisées :

- dosage de l'activité des caspases, notamment de la caspase-3, par quantification du substrat clivé (fluorimétrie, colorimétrie)
- mise en évidence des caspases actives (immunohistochimie, western blot,...) ;
- détection d'un produit de clivage tel que la PARP (poly ADP-ribose polymérase) les caspases clivent la PARP en deux fragments de 85 et 25 kDa. Il est possible de détecter le fragment de 85 kDa, qui est un marqueur précoce de l'apoptose en immunofluorescence ou western blot.

IV -1-3-Modifications mitochondriales :

Ces modifications concernent essentiellement la chute du potentiel membranaire (mise en évidence par la rhodamine 123 ou le DIOC6(3) par exemple), la libération du Cyt-c et la libération éventuelle de l'AIF. Le Cyt-c et l'AIF peuvent être détectés en immunofluorescence ou western blot.

IV-1-4-Marquage de l'ADN :

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

- Coloration avec le bleu trypan ou l'iodure de propidium, qui ne pénètrent dans la cellule que si la membrane est endommagée (microscopie, cytométrie en flux) ;

- Contenu en ADN : en cas d'apoptose, un pic en sub-G1 est détectable par marquage à l'acridine orange, le DAPI ou l'iodure de propidium (cytométrie de flux) ;
- Morphologie du noyau, avec la visualisation des noyaux condensés ou fragmentés par marquage au DAPI ou à l'iodure de propidium (microscopie, cytométrie en flux).

IV -1-5-Fragmentation de l'ADN :

Pendant le processus apoptotique, des endonucléases spécifiques sont activées et induisent la fragmentation de l'ADN. Les fragments peuvent être mis en évidence par plusieurs techniques:

- TUNEL : la TdT (terminal déoxynucléotidyl transférase) catalyse la polymérisation de désoxynucléotides couplés à la fluorescéine aux extrémités 3'-OH libres (microscopie, cytométrie en flux) ;
- DNA ladder: électrophorèse sur gel d'agarose permettant de visualiser les fragments de 180 paires de bases ;
- ELISA : quantification des nucléosomes.

IV-1-6-Détection des protéines liées à l'apoptose :

De nombreuses protéines interviennent dans l'expression et la régulation de l'apoptose : Bcl- 2, p53, c-myc, récepteur (Fas). Leur étude (immunofluorescence, western blot,...) peut permettre de détecter l'apoptose et les mécanismes mis en jeu.

CHAPITRE II

LA TRANSFORMATION CANCEREUSE ET L' APOPTOSE

I- La transformation cancéreuse :

La transformation cancéreuse est un processus multi-étape qui nécessite une accumulation de transformations génétiques menant au dysfonctionnement de la cellule et à sa transformation vers une cellule tumorale. Ces changements résultent de l'exposition à des substances cancérigènes d'origine chimiques, physiques ou endogènes. Les molécules chimiques telles que les agents alkylants, les métaux lourds, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les nitrosamines sont responsables de nombreux dommages à l'ADN. D'autres agents, tels que les rayonnements UV, les rayonnements gamma et X, le tabac ou l'exposition à des insecticides sont également responsables d'atteintes génétiques ou épigénétiques. Et fréquemment, les sous-produits du métabolisme cellulaire, comme les radicaux libres, mais également certaines infections virales ou bactériennes sont aussi reconnus comme des éléments carcinogènes.

Ces modifications confèrent à la cellule des capacités particulières de prolifération, d'adaptation à l'environnement et de survie soit par l'altération du contrôle de l'expression des gènes, ou de l'activité des protéines correspondantes, conduisant à la sélection progressive de cellules (les cellules transformées ont un avantage naturel).

Dans la grande majorité des cas, ces lésions sont somatiques et spécifiquement présentes dans les cellules tumorales (**Houghton et al, 2007**), mais elles sont présentes également dans la ligne germinale (mutation constitutionnelle) dans des rares cas dit de prédispositions héréditaires aux cancers.

Pour que ces lésions causent une transformation, elles doivent d'abord être « fixée », c'est-à-dire qu'elle se maintienne dans le génome au cours des divisions cellulaires, celle-ci doit apporter un avantage de prolifération ou de résistance par rapport aux cellules saines. C'est pourquoi, pour une transformation cancéreuse ce sont des gènes spécifiques qui sont fréquemment touchés :

- Les proto-oncogènes : les gènes stimulant la prolifération cellulaire ou codant pour des facteurs anti-apoptotiques.
- Gènes suppresseurs de tumeur : ceux inhibant la croissance ou induisant la mort cellulaire.

Proto oncogènes			Gènes suppresseurs de tumeur		
erbB1	7q12-13	glioblastome	P53	17p13.1	Plusieurs types de cancers
K-Ras	16p12	plusieurs types de cancers	Rb	13q14	Rétinoblastome
Myc	8q24	leucémie	WT1	11p13	Tumeur de Willms
BCL-2	18q21.3	lymphome folliculaire	APC	5p21	Cancer de colon
MET	7q31	cancer gastrique	BRCA1	17q21	Cancer de sein
Mdm2	12q13	sarcome	BRCA2	13q12-13	Cancer de sein

Tableau 02 : exemples de gènes suppresseurs de tumeurs et proto-oncogènes

De plus, même la fixation des ces mutations n'est pas suffisante pour une transformation maligne, dans cette phase de contact avec le carcinogène - dite une phase d'initiation - les cellules ayant subi une mutation dans leur génome sont appelées : cellules pré-néoplasiques et ne sont pas encore transformées. En effet, elles peuvent, ne pas exprimer le phénotype de la mutation acquise, durant toute leur vie. Néanmoins, les mécanismes de promotion de la carcinogenèse dépendent du type de mutations (translocation, amplification, locus génétique de l'intégration virale) apparu dans un gène, et de la fonction du produit de l'expression de celui-ci (contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose, facteurs trophiques...). Ces changements peuvent conférer soit un gain de fonctions pour les oncogènes ou bien une perte de fonctions pour gènes suppresseurs de tumeur.

Enfin, le passage de l'état d'une cellule « initiée » en cellule cancéreuse, marque le début de la progression, étape de la carcinogenèse dans laquelle la croissance cellulaire devient autonome (**Rando T. A., 2007**).

Ceci entraîne une capacité prolifératif anarchique, ce qui conduit à l'apparition de nouvelles mutations, dites spontanées, vu que des cellules en prolifération, sont plus exposées que des cellules quiescentes, à des erreurs de réplication de l'ADN. En outre, les mutations acquises au stade initiation, et qui touchent fréquemment des gènes codant pour des enzymes de réparation de l'ADN, vont introduire une instabilité génétique encore plus grande.

Ces avantages de prolifération et de survie, ainsi que l'instabilité génétique qui va se produire, entraînent l'apparition et le développement de tumeur.

II- Les caractéristiques fondamentales de la cellule cancéreuse

La transformation aboutit à l'acquisition par la cellule de caractéristiques particulières, retrouvées chez toutes les cellules cancéreuses. Les travaux de Weinberg (1982) suggéraient que les cellules transformées présentent en commun au moins six caractéristiques.

II-1- L'immortalité ou perte de la sénescence

Elle définit la capacité des cellules cancéreuses à proliférer de manière illimitée. Dans le cas d'une cellule saine, le nombre de division cellulaire est limité. Après un certain nombre de génération, la cellule entre en sénescence et puis meurt par apoptose. Ce processus est sous la dépendance d'un système de détection et de contrôle de la longueur des télomères. En effet, le lien entre le raccourcissement des télomères et la sénescence répliquative est bien établi. Pour contourner la limitation imposée par le raccourcissement des télomères, les cellules cancéreuses possèdent deux mécanismes connus. Il s'agit pour l'un de la réactivation de la télomérase (de type transcriptase inverse) permettant la synthèse de novo de séquences télomériques et le maintien de la longueur des extrémités des chromosomes. Son activité est détectée dans 85 % des tumeurs étudiées. L'autre, beaucoup moins connu, est un mécanisme alternatif indépendant de la télomérase connu sous le terme d'ALT6 (Muntoni *et al* ; 2005). Le maintien des longueurs des télomères semble impliquer, dans ce cas, des événements de recombinaison nécessitant des protéines de recombinaison telles que RAD50 et RAD52. Ces événements de recombinaisons, ainsi que des cytotélerèses asymétriques seraient à l'origine du maintien des capacités répliquatives des cellules transformées.

II-2- Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération

La cellule transformée présente une capacité de prolifération exagérée, stimulée de façon non physiologique. Les mécanismes par lesquels la cellule cancéreuse parvient à cet état sont variables. Parmi les plus fréquents, on retrouve : une production autocrine de facteurs de croissance, ou une induction de la production de ces facteurs par le stroma tumoral. En outre, la surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance, la mutation et l'activation constitutionnelle de ces récepteurs ainsi que l'activation par mutation ou via la surexpression d'un ou plusieurs acteurs moléculaires des voies de transduction des signaux mitogènes, participent aussi à ce processus.

II-3- Insensibilité aux signaux antiprolifératifs

L'insensibilité aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaire, comme ceux régulant la transduction du signal au cours de l'activation des voies MAPK, ou le déroulement du cycle cellulaire (p53, p16, inhibiteurs des Cdk7), peuvent impliquer soit l'inactivation du récepteur membranaire correspondant, soit un des maillons de la chaîne de transduction de signaux anti-prolifératifs. Dans ce cas, on peut citer l'exemple du TGF β 8, qui exerce une activité anti-tumorogénique au niveau des épithéliums via le facteur de transcription SMAD4.

Dans 50 % des cancers du pancréas et dans la majorité des cancers de l'estomac, du sein, de l'ovaire, de la prostate, le gène *smad4* est retrouvé inactivé.

L'échappement à la signalisation conduisant à la différenciation cellulaire, est alors une autre stratégie de survie (**Ruscetti et al ; 2005**).

II-4- Capacité d'induire une néo-angiogenèse

Une des caractéristiques majeures d'une tumeur évolutive, est son besoin accru en oxygène et nutriments (surtout du glucose). Pour gérer cette dépendance, les cellules cancéreuses la formant, doivent posséder la capacité d'induire la formation de nouveaux vaisseaux en modifiant l'équilibre entre activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. Dans le cas des tumeurs solides, cette néo-angiogenèse aboutit, néanmoins, en la production de vaisseaux imparfaits impliquant une microcirculation incomplète au sein de la tumeur. Ceci a pour conséquence l'apparition de zones nécrotiques et hypoxiques (**Shchors et al ; 2007**).

II-5- L'échappement à l'apoptose

La cellule peut déclencher la mort cellulaire, évitant ainsi la prolifération de cellule n'ayant pas hérité intégralement du matériel génétique ou ayant fixé une mutation non réparée. Les cellules tumorales sont, quant à elles, capables d'échapper à cette mort par la sécrétion autocrine de facteur de survie, tels que l'IGF1/29, les interleukines... Plus fréquemment, on observe l'inactivation de gènes activateurs de l'apoptose ou la surexpression d'inhibiteurs physiologiques de l'apoptose comme les membres de la famille Bcl-2.

II-6- Les capacités d'invasion et de métastase

Les cellules transformées en prolifération accrue sont capables de proliférer à distance. Témoin de la malignité de la tumeur, cette capacité à envahir les tissus voisins ou, via la circulation systémique, des zones à distance, est due à l'expression de protéines particulières comme, par exemple, les métalloprotéases. Celles-ci permettent la dégradation de la matrice extracellulaire et favorisent la migration des cellules tumorales vers les vaisseaux (**Golubkov et al ; 2006**). L'inhibition de protéines impliquées dans les liaisons entre cellules ou avec la matrice extracellulaire (cadhérines, intégrines...).

III- Mécanisme de résistance a l'apoptose dans les cancers humains

En principe, la signalisation de la mort cellulaire peut être bloquée par une augmentation dans les molécules anti-apoptotiques et / ou par une diminution ou pertes de fonctions des protéines pro-apoptotiques. Dans cette partie nous allons discuter quelques

exemples de modifications dans les voies de signalisation apoptotique qui se produisent souvent dans les cancers humains.

III-1- Altérations au niveau de voie des récepteurs de la mort

Nous avons déjà parlé des récepteurs de la mort, ce sont des protéines qui appartiennent à la superfamille de gène TNF-R qui regroupe plus de 20 protéines avec des fonctions biologiques diverses, comme la régulation de la mort et la survie cellulaire, la différenciation, ou l'immunité. Les membres de cette famille partagent un domaine cytoplasmique caractéristique s'appelle le Domaine de la mort, ou « Death Domaine » qui est primordial à la transduction du signal de mort. Les récepteurs de la mort cellulaire les plus connus sont : CD95 (APO-1/Fas) et son ligand CD95, TNF-R1 et son ligand TNF α , et TRAIL-R et son ligand TRAIL .

a- Récepteur avec une expression ou fonctions affaibli

La signalisation peut être altérée dans les cancers humains à plusieurs niveaux : Au niveau de récepteurs, leur expression à la surface cellulaire peut être diminuée voir absente ce qui bloque la transmission du signal de la surface cellulaire aux cascades intracellulaires, par exemple, une diminution d'expression de CD95 a été rapporté dans des leucémies ou des neuroblastomes, qui résistent à des agents chimio-thérapeutique ce qui suggère qu'une expression intact de CD95 est crucial à la sensibilité au traitement (**Fluda et al ; 1988**).

Dans le système de TRAIL, la perte d'expression des récepteurs TRAIL induisant l'apoptose, c'est à dire, TRAIL-R1 et R2, peut conférer une résistance à TRAIL. Notamment, les deux récepteurs sont situés sur le chromosome 8p, qui est souvent perdue en raison de l'hétérozygotie (LOH) dans les cancers humains. Des délétions ou des mutations résultant la perte de deux copies du TRAIL-R1 ou R2-TRAIL a été détectés aussi dans un petit pourcentage des cancers, par exemple, le lymphome non hodgkinien, carcinome hépatocellulaire, le cancer du sein, cancer des voies aéro-digestives supérieur, ostéosarcome ou cancer du poumon (**Seitz et al ; 2002**).

b- L'expression aberrant du récepteur leurre « decoy »

L'expression aberrante d'un récepteur leurre est un autre mécanisme pour échapper à l'apoptose induite par CD95 ou TRAIL. A cet effet, la surexpression génétique ou amplification du récepteur leurre, qui s'oppose à l'apoptose à la médiation de CD95 par liaison compétitive de ligand CD95, était identifier dans le cancer des poumons ou du colon et dans des glioblastomes (**Pitti et al ; 1998**). De plus la surexpression de TRAIL-R3 (un

récepteur leurre de TRAIL) était signaler dans des carcinomes gastrique (Sheikh et al ; 1999).

c- La surexpression de cFLIP ou PED/PEA-15

En additions à ces mécanismes génétiques et épigénétiques, la transductions via les récepteurs de la mort peut être bloquée aussi au niveau de récepteur, par exemple par la l'expression aberrante des protéines anti-apoptotiques qui empêchent l'activation de caspase-8 au niveau du récepteur cellulaire, la protéine cFlip – pour Cellulaire FLice Inhibitory protéine - et PED/PEA-15 – pour Phosphoprotéine Enriched in Diabetes/ Astrocytes-15 – sont des exemples types de ces mécanismes (Micheau et al ; 2003), ces molécules sont recrutées au niveau du complexe DISC à la place des pro- caspases-8 vu leur homologie avec les caspases-8 ce qui empêche leur activation (Barnhart et al ; 2003).

d- L'Inactivations des caspase-8

L'expression ou la fonction de caspase-8 peuvent être altérés par des mécanismes génétiques ou épigénétiques. Malgré son importance à la transduction du signal de mort, la fréquence des mutations au niveau de caspase-8 est relativement faible, Ces variantes mutantes de la caspase-8, qui ont par exemple été identifiée dans des carcinomes colorectals, peuvent agir d'une manière négative dominante en empêchant la recrutement de la forme sauvage de la caspase-8, inhibant ainsi l'apoptose (Kim HS et al ; 2003).

L'expression des caspase-8 peut être altérée aussi par l'épissage transcriptionnelle (maturation d'ARN messager) dans la leucémie et le neuroblastome par exemple le splicing alternative de l'intron 8 des gènes des caspases-8 donne une génération altérée des caspases 8, les caspases -8L, qui manquent le site catalytique toute en gardant ces 2 répétitions DED au niveau de ses N-terminal. En interférant avec les caspases-8 dits « sauvages » les caspase-8L peuvent agir comme un inhibiteur de l'apoptose dominant négatif (Miller et al ; 2006)

Encore plus, l'expression des caspase-8 est fréquemment inactivée par l'hyperméthylation des séquences régulatrices des gènes caspase-8 dans des plusieurs tumeurs, Tumeur d'Ewing, le rétinoblastome, rhabdomyosarcome ou carcinome à petites cellules du poumon (Fulda et al; 2001).

La Co-méthylation pour les caspases-8 et FLIP toutes comme pour les pair de récepteurs agonistiques TRAIL-R1/ TRAIL-R2 ou an agonistiques TRAIL-R3/ TRAIL-R4 était décrite dans des neuroblastomes (Van Noesel et al ; 2003).

III-2- Altérations dans la voie apoptotique mitochondrial dans les cancers humains

a- La surexpression des anti-apoptotique Bcl-2

L'augmentation des ratios anti-apoptotique / pro-apoptotiques des protéines Bcl-2 a été détectée dans des divers cancers et a été corrélée à la survie des cellules tumorales et la résistance à l'apoptose. Par exemple la surexpression de Bcl-2, caractéristique du lymphome folliculaire humain, est causée par translocation chromosomique de l'oncogène bcl-2 dans un locus de gène des chaînes lourdes de l'immunoglobuline.

La génération de souris transgéniques de Bcl-2 a révélé que la surexpression de Bcl-2 favorise la transformation néoplasique des lymphocytes B et T et également des cellules myéloïdes (**McDonnell et al ;1991**). Dans la leucémie lymphoïde chronique, l'expression de Mcl-1a été récemment identifié comme un régulateur important de la progression de la maladie (**Pepper C et al ; 2008**)

b- L'inactivation des Bax ou des protéines BH3-only

Des mutations somatiques résultant dans l'inactivation du gène pro-apoptotique Bax ont été identifiés dans certaines tumeurs solides et tumeurs hématologiques malignes. Par exemple, la substitution d'un seul nucléotide ou des décalages du cadre de lecture du gène Bax peuvent se produire dans le cancer du côlon liés à une déficience du système de réparation des mésappariements ou des affections malignes hématopoïétiques (**Kitada et al ; 2002**)

Les BH3-only peuvent aussi agir comme des suppresseurs de tumeur *bona fide*, dans un modèle de souris avec un lymphome B, il était montré que la perte d'un seul allèle de gène Bim accélère la lymphomagenèse B induite par l'expression de transgène c-myc (**Egle et al ; 2004**)

Un autre exemple est la souris déficiente en Bid qui développe spontanément un désordre myéloprolifératif qui peut éventuellement progresser en une forme de leucémie myélomonocytaire chronique (**Zinek et al ; 2003**).

De plus, la protéine pro-apoptotique Noxa, qui fait parti des BH3-only, était signalé muté ou épigénétiquement désactivé dans des lymphomes diffus à grandes cellules B. Dans le cancer de rein (**Mestre-Escribuela; 2007**).

c- Défaut au niveau post-mitochondrial : perte d'Apaf-1

En additions aux altérations génétiques au niveau des molécules Bcl-2, les défauts de voie apoptotique mitochondrial peuvent également se produire au niveau post-mitochondrial,

par exemple, la diminution voir l'absence d'expression ou d'activité d'Apaf-1 a été signalé à détecteur l'assemblage fonctionnel de l'apoptosome dans des mélanomes, leucémies, glioblastomes, et les cancers gastriques, ça peut être à cause d'une hyperméthylation du promoteur, ou perte d'hétérozygotie au niveau du chromosome 12q22-23 (Watanabe *et al* ; 2003)

III-3- L'expression aberrante des inhibiteurs d'apoptose IAP

a- Dérégulation de survivin

L'expression ou la fonction des IAP peuvent être altérée dans plusieurs cancers humains, et leur niveaux d'expression ont été corrélés aux paramètres cliniques et pronostiques. Par exemple Survivin était identifié comme le quatrième transcriptome le plus courant de génome humain dans les cancers. En revanche ses niveaux d'expression élevés dans la plupart des cancers, la survivin a été trouvée à s'exprimer à des niveaux faibles ou indétectables dans la plupart des tissus adultes normaux (Velculescu *et al*; 1999).

b- L'expression anormale de cIAP1 et cIAP2

L'expression anormale de cIAP2 peut être causée par une translocation chromosomique, par exemple la translocation $t(11;18)(q21;q21)$, une translocation qui touche le gène cIAP2 dans une large proportion de lymphome de MALT (mucosa-associated lymphoid tissue). Cette translocation fusionne le domaine BIR de cIAP2 avec la protéine MALT1, une paracaspase et un médiateur crucial à l'activation de NF- κ B via des récepteurs de cellule T (Varfolomev *et al* ; 2006).

c- La dérégulation de XIAP

En ce qui concerne la signification d'expression des XIAP, les données sont contradictoires.

Bien qu'il ait été rapporté dans une étude que les patients atteints de AML avec des niveaux inférieurs ont une survie significativement meilleure (Tamm *et al* ; 2000), une autre étude montre que l'expression des XIAP n'a aucun impact pronostique dans cette malignité (Carter *et al* ; 2003).

Dans le cancer de rein, XIAP était identifié comme un facteur de mauvais pronostic, tandis que la haute expression des XIAP a été associée à une survie globale plus longue dans le cancer du poumon non à petites cellules (Ferreira CG *et al* ; 2001).

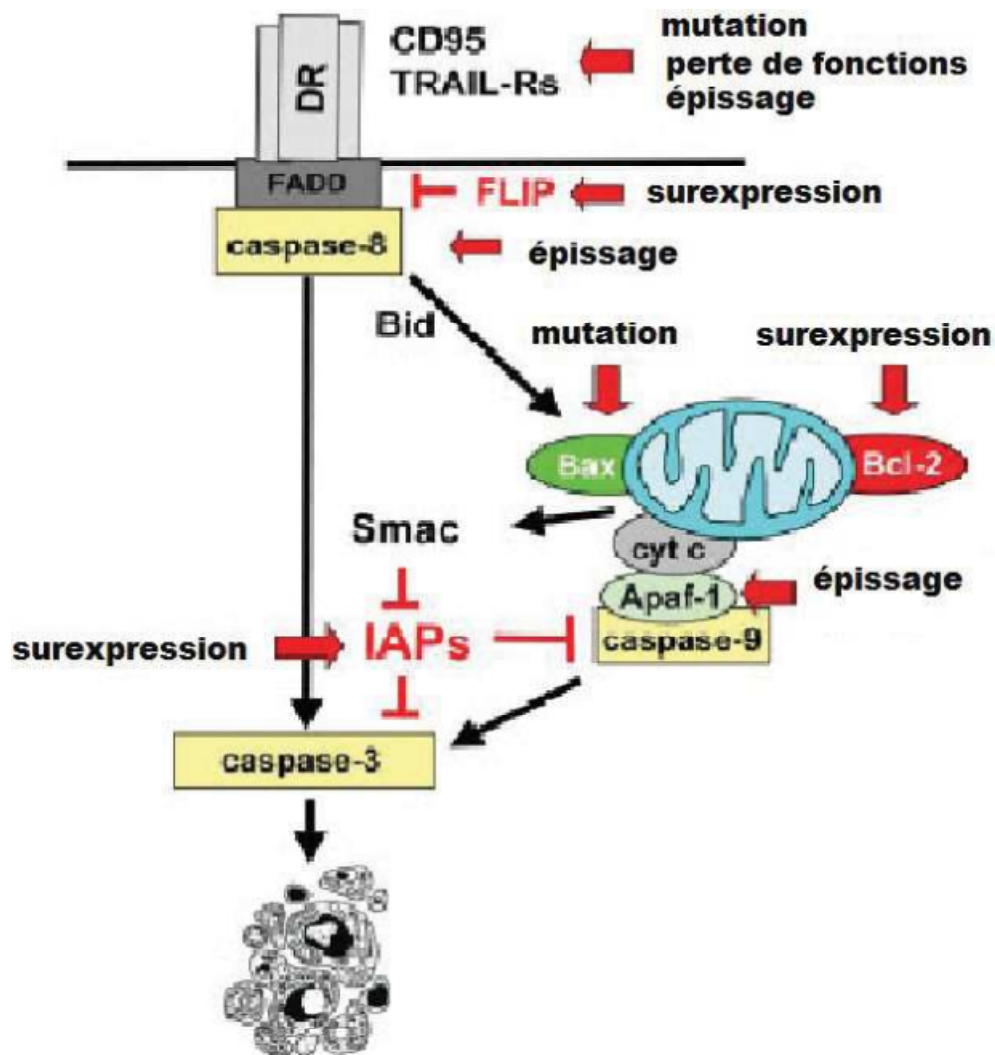


Figure 16 : les différents mécanismes de résistance à l'apoptose dans les cancers humains

CHAPITRE III

L'APOPTOSE DANS LE CANCER DE PROSTATE

I- La prostate

I-1- Anatomie et fonction de la prostate

La prostate est un organe présent exclusivement chez les mammifères mâles. D'environ 3 cm de haut et 2,5 cm de profondeur et pèse 15 à 25 g à l'âge adulte. Située dans le pelvis, sous la vessie et en avant du rectum, la prostate entoure le col de la vessie et la partie initiale de l'urètre (urètre prostatique), le canal qui permet l'évacuation des urines et du sperm.

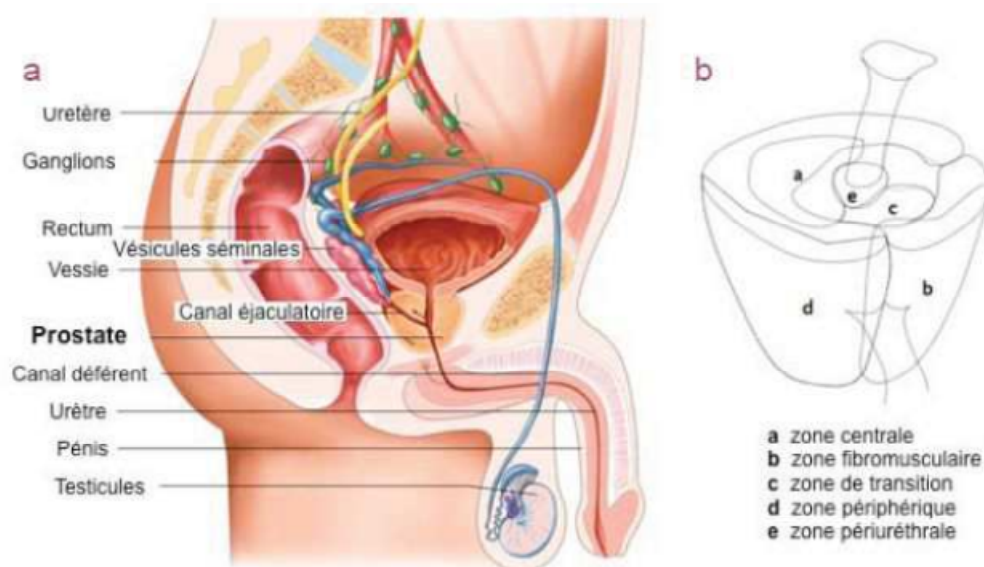


Figure 17 : l'appareil génital masculin

La prostate est composée de 30 à 50 glandes tubulo-alvéolaires, qui déversent leurs sécrétions dans 15 à 30 canaux sécrétoires indépendants. Les glandes sont entourées par un stroma fibromusculaire, constitué de collagène, de cellules musculaires lisses, de fibres élastiques, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de nerfs et de cellules paraganglionnaires. Les sécrétions prostatiques participent à la formation du sperme et constituent 30% du volume du liquide séminal. Celui-ci est essentiellement composé de liquide sécrété par les vésicules séminales, les glandes bulbo-urétrales (glandes de Cowper) et la prostate. Les canaux déférents provenant des testicules acheminent les spermatozoïdes jusqu'à la prostate. Le mélange de ceux-ci avec le liquide séminal constitue le sperme.

Bien qu'étant macroscopiquement homogène, la prostate comporte cinq zones anatomiques. Deux sont fibromusculaires et trois sont glandulaires.

Les trois zones glandulaires (périphériques, centrales et de transition) occupent 70% de la prostate. La zone périphérique occupe environ 70% du tissu glandulaire. Elle est constituée de glandes entourées par un stroma peu dense constitué de cellules musculaires largement espacées. La zone centrale (25% du volume prostatique glandulaire) comporte des glandes de grande taille et irrégulières, qui sont appelées glandes principales ou sub-mucosales, entourées par un stroma très dense. Entre les deux se trouve la zone de transition (5% du volume prostatique glandulaire) qui contient les glandes dites mucosales.

Dans la glande prostatique, l'épithélium stratifié est principalement constitué de deux couches: la couche basale faite de cellules cubitales basses, et la couche de cellules épithéliales sécrétrices lumineales en colonnes

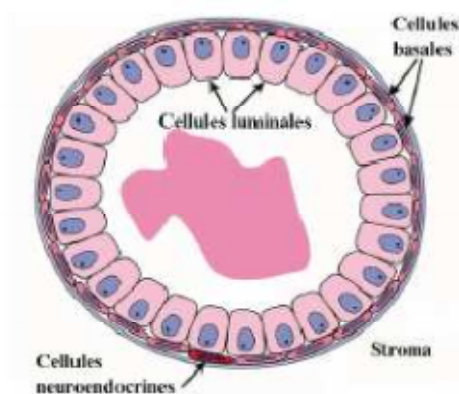


Figure 18 : organisation de la glande prostatique

a- Les cellules basales

Situées entre la membrane basale et le pôle basal des cellules sécrétrices, inclut des cellules souches, qui donnent naissance à plusieurs sous populations de cellules progénitrices

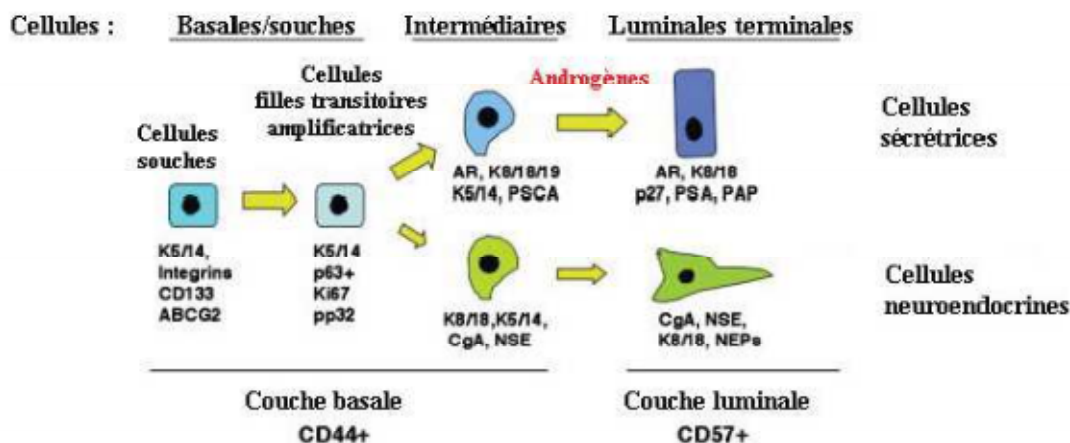


Figure 19 : différenciation des cellules basales

b- Les cellules luminales sécrétrices

Synthétisent et sécrètent les composants du liquide séminal, notamment l'antigène spécifique de la prostate (PSA), la phosphatase acide spécifique de la prostate (PAP), des polyamines et des prostaglandines.

c- Les cellules neuroendocrines

Des cellules intraglandulaires hybrides épithéliales neuroendocrines qui sécrètent de nombreuses hormones et neuropeptides qui régulent la croissance, la différenciation et l'activité sécrétrice de l'épithélium prostatique (Abrahamsson ; 1996).

I-2- Contrôle de l'homéostasie de la prostate

L'homéostasie de la glande prostatique est maintenue grâce à l'équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. Les androgènes et leurs récepteurs jouent un rôle important dans ce mécanisme. Lors la puberté, et sous le control des androgène, la prostate croît rapidement, puis maintient un développement très lent jusqu'à l'andropause.

I-2-1- Les androgènes

Les androgènes proviennent de deux origines différentes : les testicules et les glandes surrénales.

a- Les androgènes testiculaires

Les testicules (les cellules de Leydig plus précisément) produisent environ 95% de la testostérone circulante. Les testicules produisent aussi de petites quantités de dihydrotestostérone (DHT), d'androstènedione ou 4-dione, d'oestradiol et de progestagènes.

Seul 2% de la testostérone circulante est sous forme libre et capable de pénétrer dans les cellules. 40% circule sous forme liée à l'albumine ou à la globuline liant les hormones sexuelles (SHBG).

Dans les cellules prostatiques, 90% de la testostérone est rapidement convertie en DHT par la 5 α -réductase. La testostérone et la DHT se lient toutes deux au récepteur des androgènes ; cependant l'affinité de la DHT est cinq fois supérieure à celle de la testostérone.

b- Les androgènes surrénaliens

La glande surrénale sécrète des précurseurs inactifs de la DHT : la DHEA, qui est un précurseur des œstrogènes et de la testostérone, une forme sulfatée de la DHEA (la DHEAS) et l'androstènedione ou 4-dione. La DHEAS est très abondante dans la prostate. Les complexes enzymatiques responsables de la transformation de ces précurseurs en DHT sont aussi exprimés dans la prostate, en particulier dans le compartiment stromal (**Mizokami et al ;2009**).

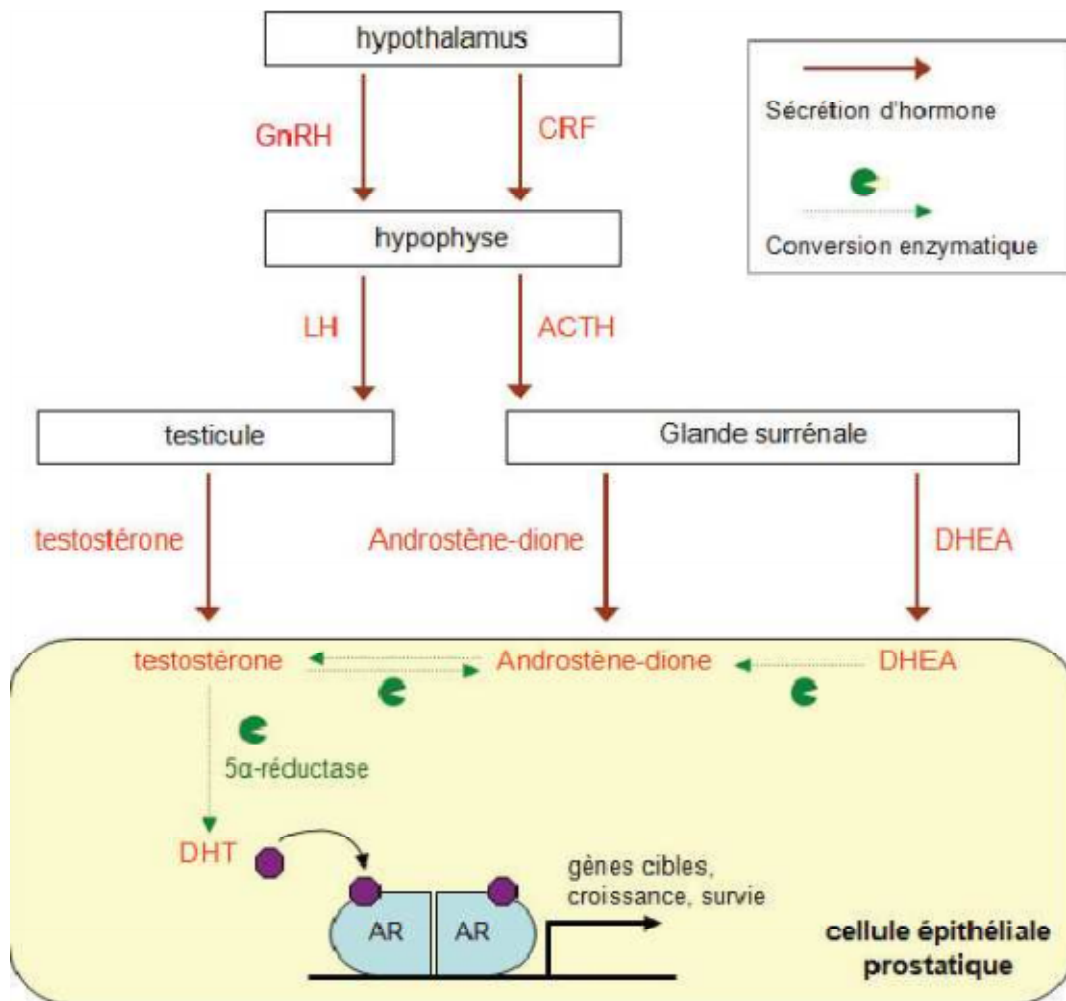


Figure 20 : le control androgénique

I-2-2- Le récepteur des androgènes (RA):

Le RA est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires a simultanément été découvert par les équipes de Liao, Bruchovsky et Mainwaring (**Mangelsdorf ; 1995**).

Comme tous les récepteurs nucléaires, le RA comprend :

- un domaine N-terminal impliqué dans l'activation de la transcription;
- un domaine central de liaison à l'ADN et qui participe également à la dimérisation du récepteur.
- un domaine charnière abritant une séquence de localisation nucléaire.
- un domaine C-terminal responsable de la liaison de l'hormone mais possédant aussi une surface d'interaction avec les protéines de choc thermique HSP (Heat-Shock Protein), une fonction de transactivation dépendante de la liaison du ligand, un site impliqué dans la dimérisation ainsi qu'une autre séquence de localisation nucléaire (Poujol N; 2000).

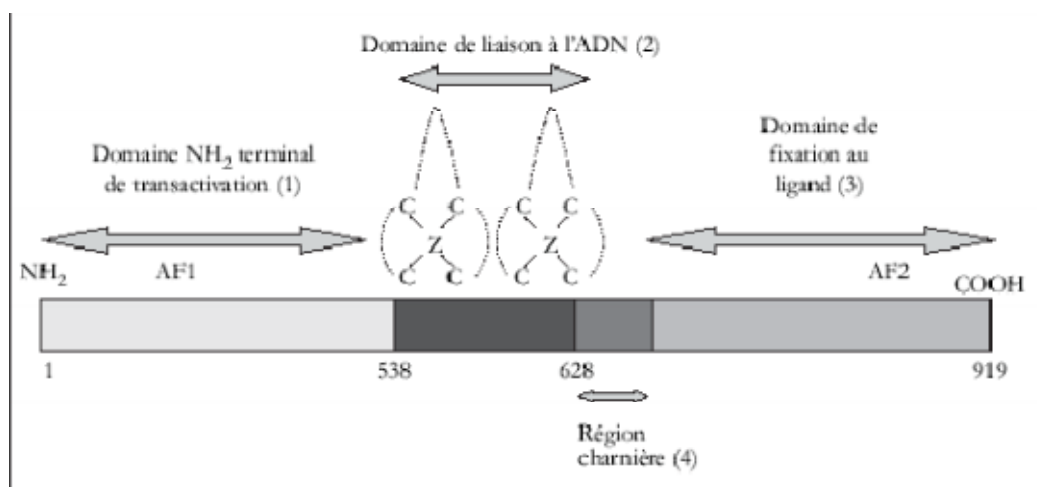


Figure 21: structure du récepteur de l'androgène

I-2-2-1- Action génomique des RA

A l'état basal, le RA est lié à des protéines HSP (HSP 90, HSP 70, HSP 56) ainsi que d'autres protéines chaperonnes telle que FKBP52 (*FK506-Binding Protein 52*) dans une conformation qui empêche l'interaction entre le récepteur et l'ADN. La liaison de la DHT au niveau des RA présents dans le cytoplasme provoque un changement de conformation du récepteur et la dissociation des protéines qui lui sont associées, ce qui démasque le site de liaison du ligand, les sites de dimérisation ainsi que la séquence de localisation nucléaire. Il a été mis en évidence que la liaison des androgènes conduit à une hyperphosphorylation et dimérisation du RA nécessaires pour la liaison du récepteur au niveau de l'ADN. Le complexe RA/DHT transloque dans le noyau en passant par les pores nucléaires et se lie au niveau de séquences spécifiques de l'ADN appelées ARE (*Androgen Response Element*) situées dans les régions promotrices de gènes cibles. Cette interaction stimule ou inhibe la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération et de la survie des cellules épithéliales prostatiques. Le recrutement de protéines co-régulatrices telles que ARA70 (*AR-Associated protein 70*) est nécessaire pour permettre l'interaction du RA avec l'appareillage de la transcription. (McKenna NJ; 1999)

Les mécanismes impliqués dans la régulation de la prolifération et de la survie des cellules épithéliales prostatiques induite par les androgènes ne sont pas clairement identifiés.

I-2-2-2- Actions non-génomiques des androgènes

En plus du mode d'action génomique des stéroïdes, de nombreuses études suggèrent que les androgènes, comme la progestérone et les oestrogènes, peuvent exercer un effet rapide, non-génomique.

L'activité stéroïdienne non-génomique active des cascades de transduction du signal, comme les voies MAPK, PI3K/AKT, PLC γ /PKC/PKA, aboutissant à l'activation de protéines cytoplasmiques, de canaux ioniques et/ou de facteurs de transcription. Ces effets apparaissent dans les secondes ou minutes et sont considérés comme étant trop rapides pour impliquer des changements dans la transcription ou la synthèse protéique (Michels et Hoppe ; 2008)

II- La transformation cancéreuse

L'adénocarcinome prostatique est la première cause de mortalité par cancer chez les hommes de plus de cinquante ans. La voie androgénique joue un rôle central dans cette pathologie, et la surproduction du PSA est le critère de diagnostic principal. Cependant les mutations d'AR dans les tumeurs prostatiques primaires sont peu nombreuses. Il semblerait qu'elles apparaissent préférentiellement au stade métastatique de la maladie. Ces mutations provoquent un gain de fonction d'AR qui aboutissent à l'activation constitutive de la prolifération des cellules cancéreuses (**Rajender et al; 2007**).

II-1- localisation

La majorité des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes c'est-à-dire des cancers de l'épithélium glandulaire et plus particulièrement des cellules sécrétrices. Dans 70% des cas, les cancers se développent dans la zone périphérique de la prostate. La zone centrale héberge 10% des cancers et 20% siègent dans la zone de transition (**McNeal JE; 1988**).

II-2- l'extension

Après avoir franchi la capsule prostatique, la tumeur s'étend dans la graisse périprostatique puis vers les vésicules séminales par contiguïté. Les sites métastatiques les plus fréquents sont ganglionnaires et osseux. L'extension ganglionnaire est d'abord pelvienne puis rétropéritonéale. Les atteintes osseuses touchent préférentiellement le bassin, le rachis, les côtes et le sternum.

II-3- le grade tumoral : la classification de Gleason

La classification de Gleason est une classification anatomopathologique utilisée pour exprimer les résultats obtenus sur les biopsies prostatiques, les copeaux de résection endoscopique ou les pièces de prostatectomies. Le grade de Gleason comporte cinq sous-groupes notés de 1 (bien différencié) à 5 (indifférencié) selon l'architecture glandulaire de la tumeur. Étant donné que les tumeurs prostatiques ont en général une structure hétérogène, la différenciation est exprimée par le score de Gleason qui est la somme du grade des deux contingents tumoraux les plus représentés au sein de tumeur étudiée.

On distingue :

- les tumeurs bien différenciées : score 2 à 4;
- les tumeurs moyennement différenciées : score 5 à 7;
- les tumeurs peu ou pas différenciées : score 8 à 10.

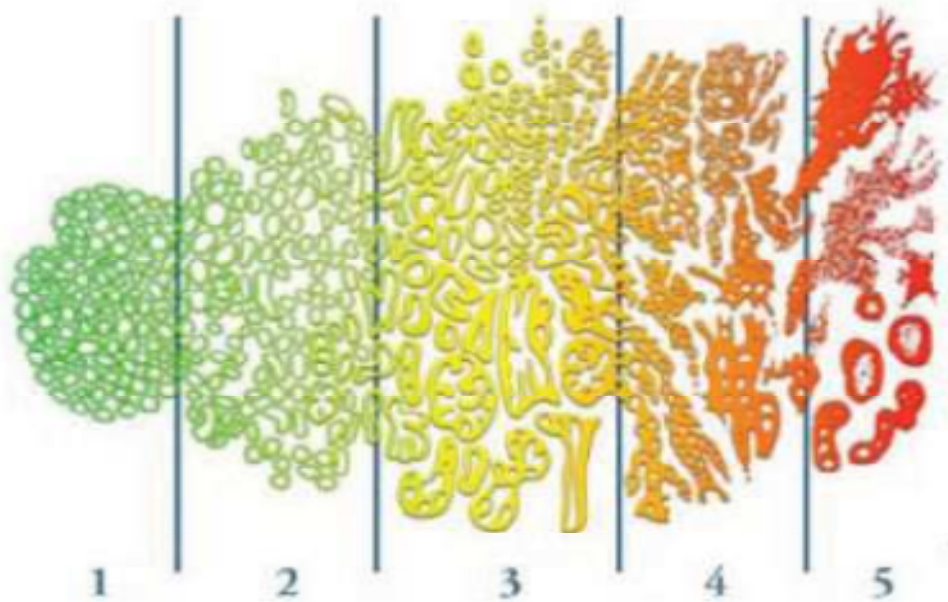


Figure 22: le grade de Gleason.

II-4- Le bilan d'extension : la classification TNM

Le bilan d'extension permet d'évaluer le stade du cancer, le pronostic et de préciser les indications thérapeutiques. Plusieurs éléments permettent d'établir le bilan d'extension :

- le toucher rectal qui apprécie l'extension locale.
- les examens d'imagerie qui évaluent l'extension locale et régionale par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et les métastases à distance par scintigraphie osseuse.
- le grade histologique déterminé par le score de Gleason établi sur biopsies.

La tumeur est ensuite systématiquement "classée" à l'aide de la classification TNM

T: Tumeur primitive	
TX	Tumeur primitive non évaluée
TO	Tumeur primitive non retrouvée
T1	Tumeur non palpable au toucher rectal et invisible en imagerie
T1a	- découverte histologique : > 5 % du tissu réséqué et score de Gleason < 7
T1b	- découverte histologique : > 5% du tissu réséqué et/ou score de Gleason > 7
T1c	- tumeur découverte sur une biopsie prostatique en raison d'un PSA élevé
12	Tumeur palpable au toucher rectal, limitée à la prostate
T2a	- atteinte de la moitié d'un lobe
T2b	- atteinte d'un seul lobe
T2c	- atteinte des deux lobes
T3	Tumeur dépassant la capsule prostatique
T3a	- extension au-delà de la capsule
T3b	- envahissement des vésicules séminales
T4	Tumeur envahissant les organes adjacents (col vésical, sphincter urétral, rectum) ou tumeur fixée à la paroi pelvienne
N: Ganglions régionaux	
NX	Ganglions régionaux non évalués
NO	Absence de métastases ganglionnaires régionales
NI	Atteinte ganglionnaire régionale
M: Métastases à distance	
MX	Métastases à distance non évaluées
MO	Absence de métastases à distance
M1	Métastases à distance
M1a	- ganglions non régionaux
M1b	- os
M1c	- autres sites métastatiques

Tableau 2: la classification TNM

II-5- Les traitements

Le choix du traitement prend en compte le bilan d'extension associé au taux de PSA (*Prostate-Specific Antigen*) dans le sang, le score de Gleason, l'âge, l'espérance de vie du patient et les effets secondaires des traitements.

stade		Recommandations thérapeutiques
localisé	T1-T2 N0-NX,M0	Surveillance Prostatectomie radicale Radiothérapie curiethérapie
Localement avancé	T3-T4 N0-NX,M0	Prostatectomie radicale Radio thérapie + hormonothérapie Hormono thérapie seule
Metastatique	T1-T4 N1,M0-M1	hormonothérapie
Echappement hormonal		chimiothérapie

Tableau 04: les recommandations thérapeutique selon le stade du cancer prostatique

III- L'apoptose dans le cancer de prostate

III-1- Les androgènes et l'inactivation de l'apoptose

Les androgènes bloquent l'activation des caspases dans les voies intrinsèques et extrinsèques de la mort cellulaire programmée, et protègent ainsi les cellules de cancer de la prostate de l'apoptose induite par divers stimuli.

Berchem a montré que les androgènes bloquent l'apoptose induite par l'addition d'étoposide +/- irradiations ou de TNF- α (ou anti-Fas) +/- irradiations. Des études menées par Kimura et Coffey ont montré une inhibition des caspases 8, 7, 2, 9, 3 et Rokhlin a montré que le promoteur du gène codant pour la caspase 2 contient deux séquences ARE (**Rokhlin CW; 2005**). Par ailleurs, l'inactivation des caspases est associée à une diminution de :

- L'expression des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.
- Clivage de Bid,.
- La dépolarisation mitochondriale.
- La libération du cytochrome c.

A l'inverse, les androgènes régulent positivement l'expression de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques. Dans les cellules LNCaP, les androgènes entraînent une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (**Coffey RNT; 2002**).

III-2- La privation androgénique et l'apoptose

La privation androgénique est le traitement de référence des carcinomes prostatique avancés et métastatiques, elle agit au niveau de plusieurs processus biologiques dans les cellules épithéliales sécrétrices de la prostate.

De nombreuses études ont été menées pour mettre en évidence les effets de la privation androgénique sur l'activation de la mort cellulaire programmé ; que ce soit dans la prostate ventrale de rat, dans des lignées humaines de cancer de la prostate, dans des modèles de xéno greffe tumorale et même aussi dans des biopsies de patients. Mais les résultats de ces études restent controversés. La privation androgénique induit l'apoptose dans la majorité des tissus étudiés, mais on a également observé l'absence de l'apoptose dans des tissus tumoraux même après la privation androgénique ce qui peut être expliqué par l'insensibilité de ces tissus aux androgènes.

a- Dans la prostate ventrale de rat :

L'induction de l'apoptose après castration a été mise en évidence par une augmentation de l'activité endonucléase Ca²⁺ et Mg²⁺ dépendante, fragmentation de l'ADN nucléaire et expression de protéines marqueurs de l'apoptose comme TRPM-2 (Transient Receptor Potential cation channel M2) et t-PA (tissue Plasminogen Activator) (**Brändström A; 1994**).

Dans une étude menée par Shabisgh, l'apoptose est mise en évidence dans des sections de prostate ventrale de rat par la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling). L'apoptose apparaît dans les cellules endothéliales et stromales dès 12 heures après la castration. Dans les cellules épithéliales, l'apoptose n'est pas significative et n'apparaît qu'à partir de 24 heures après la castration (**Shabisgh A; 1999**).

b- Les études réalisées dans la lignée LNCaP :

Ces études présentent des résultats plus contrastés. Après privation androgénique, ces cellules ne présentent pas de signes évidents d'apoptose. Elles se trouvent dans un état cytotatique qui peut être reversé par l'addition de DHT (**Saeed B ;1997**). Par ailleurs, il a été montré que la privation androgénique conduit à une augmentation de l'activité PI3K et de la phosphorylation de la protéine Akt sur la sérine 473. Ceci est observé dès J1 après le début de la privation et augmente progressivement jusqu'à J4 (**Murillo H; 2001**). La stimulation de la voie PI3K/Akt, pourrait être un élément permettant d'expliquer la survie des cellules LNCaP en absence d'androgènes. A contrario, il a été montré que la privation pouvait conduire à l'apoptose des cellules LNCaP caractérisée par l'accumulation de C16-céramide qui est un second messenger lipidique suivi de l'activation de la caspase 3 et du clivage de PARP (Poly(ADPRibose) Polymerase) (Eto M; 2003). Une autre étude a montré une condensation et une fragmentation nucléaire ainsi que le clivage de la caspase 9 (**Lee SO; 2004**). La privation androgénique n'induit pas l'apoptose dans les cellules androgéno-insensibles DU-145 et PC-3 (**Eto M; 2003**).

c- Dans des modèles de xéno greffes

Dans des modèles implantés dans des souris nude (PC-82, PC-EW, LuCaP-23.1, CWR22) ou dans des rats (Dunning R3327 PAP) la majorité des études mettent en évidence l'activation du processus apoptotique. La castration des animaux xénotransplantés avec le modèle tumoral PC-82, LuCaP ou CWR22 induit une régression des tumeurs qui est due à l'activation de l'apoptose (**Smitherman AB; 2003**). Kyprianou et al, ont mis en évidence une augmentation de l'expression de TRPM-2, la fragmentation de l'ADN ainsi que la formation

de corps apoptotiques dans les tumeurs PC-82. Dans le modèle PC-EW, Van Weerden et al. ont montré que la régression des tumeurs après castration est due à une mort qui est majoritairement de type nécrotique (**Van Weerden WM; 1993**). Enfin, Brändström et al. n'ont pas trouvé de signes évidents d'apoptose après castration dans le modèle Dunning R3327 PAP (**Brändström A; 1994**).

d- Dans des biopsies de patients ayant suivi une hormonothérapie

La mise en évidence de l'induction de l'apoptose est également controversée. Reuter et al. ont montré une activation de l'apoptose dans les adénocarcinomes prostatiques notamment via l'apparition de noyaux picnotiques (**Reuter VE; 1997**). Cependant, Ohlson démontre que l'apoptose dans le tissu tumoral est plus faible que dans le tissu normal (**Ohlson N; 2005**). Enfin, les travaux de Westin montrent une activation de la mort cellulaire programmée dans seulement 33% des tumeurs étudiées (**Westin P; 1995**).

Modèle étudié	Technique de mise en évidence de l'apoptose	Apoptose après castration	Référence
Prostate de rat	Activité endonucléase Fragmentation AON Analyse morphologique	Apoptose	Kypnanou N.. 1988
Prostate de rat	Activité endonucléase Fragmentation de l'ADN Analyse morphologique	Apoptose	English MF.. 1989
Prostate ventrale de rat	Activité endonucléase Fragmentation ADN	Apoptose	Kypnanou N., 1988
Prostate ventrale de rat & xéno greffe Dunning R3327 PAP	Immunohistochimie et NB pour ARNm de TRPM-2 et t-PA Fragmentation ADN ISEL	Apoptose dans la prostate ventrale de rat mais pas dans le modèle Dunning	Brandström A.. 1994
Prostate ventrale de rat	TUNEL Analyse morphologique par microscopie électronique	Apoptose dans les cellules endothéliales et stromales précède l'apoptose dans les cellules épithéliales	Shabisgh A., 1999
Cellules LNCaP Cellules LNCaP. DU-145 & PC-3	ISEL Analyse morphologique Marquage NAO WB PARP et caspase 3	Apoptose initiée mais pas complète Apoptose dans les cellules LNCaP mais pas dans les cellules DU-145 et PC-3	Saeed B.. 1997 Eto M.. 2003
Cellules LNCaP	Analyse morphologique WB PARP et caspase 9	Apoptose	Lee SO.. 2004
Xéno greffe PC-82	NB pour ARNm de TRPM-2 Fragmentation ADN Analyse morphologique	Apoptose avec un max à J3	Kypnanou N., 1990
Xéno greffés PC-82 & PC-EW	Analyse morphologique Fragmentation de TADN	Apoptose dans les tumeurs PC-82 et nécrose dans les tumeurs PC-EW	Van Weerden WM., 1993
Xéno greffe PC-82	Analyse morphologique Fragmentation de TADN	Apoptose avec un max à J5	Biadou F.. 1996
Xéno greffe CWR22	TUNEL Fragmentation de TADN	Apoptose détectée dès 24h	Gregory CW.. 2001
Xéno greffe CWR22	Immunohistochimie et WB pour la caspase 3 TUNEL	Apoptose avec un max d'expression de la caspase 3 à J2	Smitherman AB.. 2003
Biopsies de 18 patients avant et après castration	Analyse morphologique ISEL	Augmentation de l'apoptose dans 6 tumeurs. 6 sont inchangées et 3 tumeurs présentent une diminution de l'apoptose	Westin P.. 1995
Tissu prostatique humain tumoral	Analyse morphologique Microscopie électronique	Apoptose	Reuter VE.. 1997
Biopsies de 77 patients avant et après castration	Analyse morphologique	Apoptose x2 dans le tissu tumoral et x7 dans le tissu	Ohlson N.. 2005

Tableau 05 : l'effet de privation androgénique sur les différentes cellules prostatiques cancéreuses

III-3- L'hormono-indépendance et l'apoptose

Dans la prostate normale ou hypertrophique, la protéine Bcl-2 est essentiellement exprimée dans les cellules basales. La surexpression de Bcl-2 dans le cancer de prostate est un signe d'une pathologie avancé, hormono-réfractaire.

Des études menées chez des patients atteints de cancer de la prostate ont mis en évidence que l'expression Bcl-2 au niveau des cellules épithéliales corrèle avec la progression de la maladie. Bcl-2 est indétectable dans la majorité des cas de cancers de la prostate androgéno-dépendants alors que la protéine est fortement exprimée dans les cancers androgéno-réfractaires ainsi que dans les métastases (Colombel M; 1993).

L'expression de Bcl-2 favorise la survie des cellules épithéliales prostatiques dans un environnement pauvre en androgènes : la privation n'a pas d'effet sur la prolifération de cellules LNCaP qui surexpriment Bcl-2. De plus, il a été montré que ces cellules sont plus tumorigènes notamment dans des souris castrées (Raffo AJ; 1995).

Dans des souris implantées avec les cellules LNCaP, la castration conduit à une augmentation de l'expression de Bcl-2 dans les tumeurs. L'injection d'oligodéoxynucléotides antisens dirigés contre Bcl-2 sensibilise les tumeurs vis-à-vis de la castration : diminution du volume tumoral (Gleave M; 1999).

Il a été montré que la surexpression de Bcl-2 confère au cancer une résistance à la chimiothérapie. D'autres études ont examiné le rôle de Bcl-2 dans la récurrence (Miyake et al. 1999).

type	Catégorie	Nombre de spécimens	Intensité d'immunofluorescence			
			-	+	++	+++
Carcinome prostatique local	Gleason < 4	5	1		2	2
	Gleason 4-6	20	5	4	8	2
	Gleason > 6	13	8	2	3	
Carcinome prostatique métastatique	2-3 mois LHRH	6			1	5
	>3 mois LHRH	6		2	2	2
Carcinome prostatique métastatique Hormono- réfractaires	Prostate biopsy + TURP	5		2	3	
	Metastase osseuse	3		1	2	
	Metastase tissulaire	1				1

Tableau 06 : l'expression des protéines Bcl-2 dans les différents stades de cancer de prostate (Colombel M; 1993).

Un autre membre de la famille Bcl-2 est également impliqué dans la progression du cancer de la prostate vers le stade hormono-réfractaire. Il s'agit de la protéine anti-apoptotique BclxL. L'étude de 139 carcinomes prostatiques a permis de mettre en évidence que l'expression de Bcl-xL est plus importante dans les carcinomes de haut grade et associée avec les cancers hormono-réfractaires (**Castilla C; 2006**).

Une étude menée par Jane-Dar Lee et son équipe, montre une expression diminuée de caspase-8 et caspase-3 clivé dans le groupe des cellule cancéreuse par rapport au cellule issue des tissu avec une hyperplasie bénigne. Ce qui suggère que la voie extrinsèque (les caspase 8 et 3 plus précisément) peut être un cible potentiel pour des nouveaux traitements (**Jane-Dar Lee et al ; 2009**)

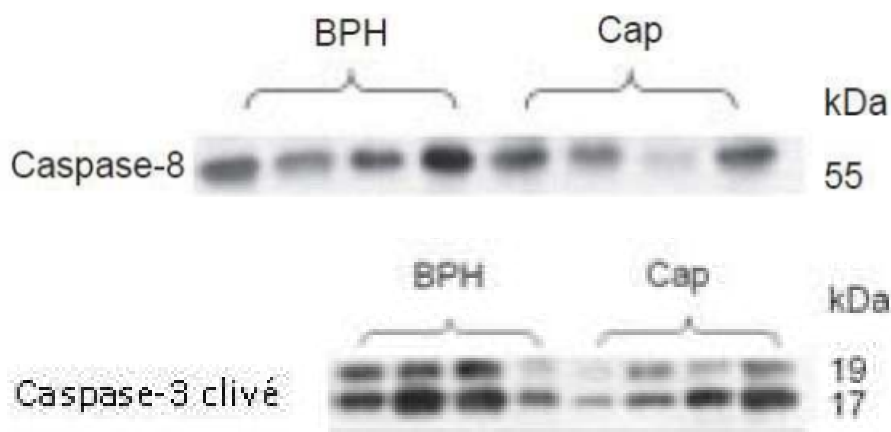


Figure 23 : Westernblot comparatif des protéines caspase-8, caspase-3, dans des tissus Hyperplasiques et tissus Cancéreux (**Jane-Dar Lee et al ; 2009**)

La surexpression des IAP a été détectée aussi dans des cancers prostatiques humains ou même chez la souris, cette surexpression était évidente même dans des carcinomes prostatiques *in situ*, ce qui suggère que la dérégulation d'expression des IAP est un événement précoce dans le cancer prostatique. L'étude montre aussi que l'expression des IAP ne corrèle pas avec le grade de Gleason ou les niveaux de PSA (**Maryla Krajewska et al ; 2003**)

CONCLUSION

En conclusion, l'apoptose est un phénomène complexe qui se déroule par plusieurs mécanismes et qui fait interférer plusieurs molécules. Un défaut d'expression de ces molécules que ce soit en terme de quantité (surexpression des molécules anti-apoptotiques ou sous-expression des molécules pro-apoptotiques) ou bien en terme de qualité (l'expression d'une molécule altérée peut conférer un gain de même qu'une perte de fonctions), peut avoir des conséquences néfastes sur le déroulement naturel de ce phénomène. Dans les cancers, ces altérations causent une diminution du taux de l'apoptose, voire l'absence totale de ce phénomène, ce qui va conférer aux cellules normalement éliminées, un avantage prolifératif illimité. Plusieurs travaux visent non seulement de comprendre le déroulement de ce phénomène, mais aussi à pouvoir le contrôler, ce qui peut être d'un grand avantage thérapeutique.

Dans le cancer de la prostate, le récepteur androgénique RA stimule la croissance des cellules malignes de façon autocrine par des facteurs de croissance et de survie. La réduction du taux d'androgènes circulants inhibe la prolifération tumorale et induit l'apoptose des cellules tumorales. Le traitement hormonal conduit au développement d'un état réfractaire à l'action suppressive de l'hormonothérapie appelé hormono réfractaire ou hormono résistant. Néanmoins, le RA continue à être exprimé dans la majorité des cancers de la prostate hormono-résistant suggérant qu'il reste fonctionnel pour la croissance et la survie des cellules tumorales. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'hormonorésistance.

La connaissance des mécanismes qui régulent l'hormono résistance amène à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques :

- **Allen R.T., Hunter W.J., 3rd & Agrawal D.K.** Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1997;37:215-28.
- **Barnhart BC, Lee JC, Alappat EC, Peter ME.** The death effector domain protein family. *Oncogene* 2003;22:8634–44.
- **Basu A., DuBois G., Haldar S.** Posttranslational modifications of Bcl2 family members--a potential therapeutic target for human malignancy. *Front. Biosci.* 2006; 11:1508-1521.
- **Berges R. R., Vukanovic, J., Epstein J. I., CarMichel M., Cisek L., Johnson D. E., Veltri R. W., Walsh P.C., and Isaacs J. T.** Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res*. 1995; 1: 473-480.
- **Borner C.** The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* . 2003; 39: 615-647.
- **Carter BZ, Kornblau SM, Tsao T, Wang RY, Schober WD, Milella M, Sung HG, Reed JC, Andreeff M.** Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis. *Blood*. 2003;102:4179–86.
- **Castilla C, Congregado B, Chinchon D, Torrubia FJ, Japon MA, Saez C .** Bcl-xL is over expressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. *Endocrinology*. 2006; 147(10): 4960-4967
- **Coffey RN, Watson RW, O'Neill AJ, McEleny K, Fitzpatrick JM .** Androgen-mediated resistance to apoptosis. *Prostate*. 2002; 53(4): 300-309 .
- **Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, Olsson CA, Korsmeyer S, Buttyan R .** Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone- refractory human prostate cancers. *Am J Pathol*. 1993; 143(2): 390-400.
- **Cory S., Adams J. M.** The Bcl2 family. regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*. 2002 ; 2:647-656.

- **Denmeade S. R., Lin X. S., and Isaacs J. T.** Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 28, 251-265. di Sant'Agnese P. A., and Cockett A. T. Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer* . 1996;78: 357-361.
- **Duan H., Dixit V. M.** RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature*. 1997;385:86-89.
- **Egle A., Harris AW., Bouillet P., Cory S.** Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:6164–9.
- **Eto M., Bennouna J., Hunter OC., Hershberger PA., Kanto T., Johnson CS., Lotze MT., Amoscato AA** . C16 ceramide accumulates following androgen ablation in LNCaP prostate cancer cells. *Prostate*. 2003; 57(1): 66-79.
- **Ferreira CG., van der Valk P., Span SW., Ludwig I., Smit EF., Kruyt FA., Pinedo HM., van Tinteren H., Giaccone G.** Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2468–74.
- **Fulda S., Kufer MU., Meyer E., van Valen F., Dockhorn-Dworniczak B., Debatin KM.** Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene*. 2001;20:5865–77.
- **Gleason D. F., and Mellinger G. T.** Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*. 1974; 111: 58-64
- **Golubkov V.S., Chekanov A. V., Savinov A. Y., Rozanov D. V., Golubkova N. V0, Strongin A. Y.** Membrane type-1 matrix metalloproteinase confers aneuploidy and tumorigenicity on mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2006; 66:10460-10465.
- **Green D., Kroemer G.** The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. *Trends Cell Biol*. 1998; 8: 267-271.
- **Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR and Ferguson TA.** Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 1995 ; 270 : 1189-92.
- **Hajnoczky G., Davies E., Madesh M.** Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 304: 445-454.

- **Hahn W. C., Counter C. M., Lundberg A. S., Beijersbergen R. L., Brooks M. W., Weinberg R. A.** Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999; 400:464-468.
- **Houghton J., Morozov A., Smirnova I., Wang TC.** Stem cells and cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2007; 17:191-203.
- **Huang D. C., Adams J. M., Cory S.** The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J.* 1998;17:1029-1039.
- **Kerr JF, Harmon BV:** Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In *Apoptosis: the molecular basis of cell death* . Edited by: Tomei LD, Cope FO. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1991:5-29.
- **Kim HS., Lee JW., Soung YH., Park WS., Kim SY., Lee JH., Park JY., Cho YG., Kim CJ., Jeong SW., Nam SW., Kim SH.** Inactivating mutations of caspase-8 gene in colorectal carcinomas. *Gastroenterology*. 2003;125:708–15.
- **Kitada S., Pedersen IM., Schimmer AD., Reed JC.** Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene*. 2002;21: 3459–74.
- **Kyprianou N., King, E. D., Bradbury D., and Rhee J. G.** bcl-2 over-expression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 1997; 70, 341-348.
- **Larsen C. J.** The BCL2 gene, prototype of a gene family that controls programmed cell death (apoptosis). *Ann. Genet.* 1994; 37:121-134.
- **Lavrik I.N., Golks A. & Krammer P.H.** Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 2005;115:2665-72.
- **Londoño-Vallejo J. A.** Telomere instability and cancer. *Biochimie*. In Press; 2007.
- **Li LY., Luo X., Wang X.** Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. 2001; *Nature* 412: 95-99.
- **Lüthi A. U., Martin S. J.** The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 2007; 14:641-650.

- **Mangelsdorf DJ, Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans RM .** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995; 83(6): 835-839.
- **McCullough KD., Martindale JL., Klotz LO., Aw TY., Holbrook NJ.** Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl-2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 1249-1259.
- **McDonnell TJ., Korsmeyer SJ.** Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*. 1991;349:254–6.
- **McKenna NJ., Lanz RB., O'Malley BW .** Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*. 1999; 20(3): 321-344.
- **McNeal J. E., Redwine E. A., Freiha F. S., and Stamey T. A.** Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J SurgPathol*. 1988; 12: 897-906.
- **Mestre-Escorihuela C., Rubio-Moscardo F., Richter JA., Siebert R., Climent J., Fresquet V., Beltran E., Agirre X., Marugan I., Marin M., Rosenwald A., Sugimoto K-J .**Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood*. 2007;109:271– 80.
- Metzstein M. M., Stanfield G. M., and Horvitz H. R.** Genetics of programmed cell death in *C.Elegans* - past, present and future. *Trends Genet*. 1998; 14 : 410-416.
- **Miller MA., Karacay B., Zhu X., O'Dorisio MS., Sandler AD.** Caspase 8L, a novel inhibitory isoform of caspase 8, is associated with undifferentiated neuroblastoma. *Apoptosis*. 2006;11:15–24.
- **Muntoni A., Reddel R. R.** The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum. Mol. Genet*. 2005; 2:R191-196.
- **Murillo H., Huang H., Schmidt LJ., Smith DI., Tindall DJ .** Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology*. 2001; 142(11): 4795-4805.

- **Oyadomari S., Araki E., Mori M.** Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis*. 2002; 7: 335-345.
- **Pepper C., Lin TT., Pratt G., Hewamana S., Brennan P., Hiller L., Hills R., Ward R., Starczynski J., Austen B., Hooper L., Stankovic T.** Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood*. 2008;112:3807–17.
- **Pitti RM., Marsters SA., Lawrence DA., Roy M., Kischkel FC., Dowd P., Huang A., Donahue CJ., Sherwood SW., Baldwin DT., Godowski PJ., Wood WI.** Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. 1998;396:699–703.
- **Pont A., Williams PL., Loose DS., Feldman D., Reitz RE., Bochra C., Stevens DA.** Ketoconazole blocks adrenal steroid synthesis. *Ann Intern Med*. 1982; 97(3): 370-372
- **Poujol N., Sultan C .** Action moléculaire des androgènes et relation structure-fonction du récepteur des androgènes. *Médecine/Sciences*. 2000; 16: 793-802.
- **Puthalakath H., Strasser A.** Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* ; 2002; 9:505-512.
- **Raffo AJ., Perlman H., Chen MW., Day ML., Streitman JS., Buttyan R .** Over expression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res*. 1995; 55(19): 4438-4445.
- **Rando T. A.** The immortal strand hypothesis: segregation and reconstruction. *Cell*. 2007;129:1239-1243.
- **Reuter VE .** Pathological changes in benign and malignant prostatic tissue following androgen deprivation therapy. *Urology*. 1997; 49(3A Suppl): 16-22
- **Rokhlin OW., Taghiyev AF., Guseva NV., Glover RA., Chumakov PM., Kravchenko JE., Cohen MB .** Androgen regulates apoptosis induced by TNFR family ligands via multiple signaling pathways in LNCaP. *Oncogene*. 2005; 24(45): 6773-6784
- **Ruscetti F W., Akel S., Bartelmez S. H.** Autocrine transforming growth factor-beta

- regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene*. 2005; 24:5751-5763.
- **Saeed B., Zhang H., Ng SC** . Apoptotic program is initiated but not completed in LNCaP cells in response to growth in charcoal-stripped media. *Prostate*. 1997; 31(3): 145-152 .
 - **Samejima K., Tone S., Earnshaw WC**. CAD/ DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem* . 2001;276: 45427-45432.
 - **Sanford EJ., Drago JR., Rohner TJ. Jr., Santen R., Lipton A** . Aminoglutethimide medical adrenalectomy for advanced prostatic carcinoma. *J Urol*. 1976; 115(2): 170-174
 - **Shabisgh A., Tanji N., D'Agati V., Burchardt M., Rubin M., Goluboff ET., Heitjan D., Kiss A., Buttyan R** . Early effects of castration on the vascular system of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology*. 1999; 140(4): 1920-1926
 - **Seitz S., Wassmuth P., Fischer J., Nothnagel A., Jandrig B., Schlag PM., Scherneck S**. Mutation analysis and mRNA expression of trail-receptors in human breast cancer. *Int J Cancer*. 2002;102:117–28.
 - **Shchors K., Evan G**. Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res*. 2007;67:7059-7061.
 - **Sheikh MS., Huang Y., Fernandez-Salas EA., El-Deiry WS., Friess H., Amundson S., Yin J., Meltzer SJ., Holbrook NJ., Fornace AJ. Jr.** The antiapoptotic decoy receptor TRID/TRAIL-R3 is a p53-regulated DNA damage-inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract. *Oncogene*. 1999;18:4153–9.
 - **Slee E. A., Harte M. T., Kluck R. M., Wolf B. B., Casiano C. A., Newmeyer D. D., Wang H. G., Reed J. C., Nicholson D. W., Alnemri E. S., Green D. R., and Martin S. J.** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6,-7, - 8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*. 1999; 144, 281-292.
 - **Smitherman AB., Gregory CW., Mohler JL** . Apoptosis levels increase after castration in the CWR22 human prostate cancer xenograft. *Prostate*. 2003; 57(1): 24-31

- **Susin SA., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M., Kroemer G.** Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med.* 1996;184: 1331-1341.
- **Tamm I., Richter S., Oltersdorf D., Creutzig U., Harbott J., Scholz F., Karawajew L., Ludwig WD., Wuchter C.** High expression levels of xlinked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3737–44.
- **Thome M., Schneider P., Hofmann K., Fickenscher H., Meinel E., Neipel F., Mattmann C., Burns K., Bodmer JL., Schröter M., Scaffidi C., Krammer PH., Peter ME., Tschopp J.** Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature.* 1997; 386: 517-521.
- **Tomei LD, Cope FO.** apoptosis: an historical perspective. In *Apoptosis: the molecular basis of cell death.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1991:5-29.
- **Tu H., Jacobs S. C., Borkowski A., and Kyprianou N.** Incidence of apoptosis and cell proliferation in prostate cancer: relationship with TGF-beta1 and bcl-2 expression. *Int J Cancer.* 1996; 69, 357-363.
- **Van Noesel MM., Van Bezouw S., Voute PA., Herman JG., Pieters R., Versteeg R.** Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;38:226–33
- **Van Loo G., Schotte P., van Gurp M., Demol H., Hoorelbeke B., Gevaert K., Rodriguez I., Ruiz-Carrillo A., Vandekerckhove J., Declercq W., Beyaert R., Vandenaabeele P.** Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.* 2001;8: 1136-1142.
- **Varfolomeev E., Wayson SM., Dixit VM., Fairbrother WJ., Vucic D.** The inhibitor of apoptosis protein fusion c-IAP2. MALT1 stimulates NF-kappaB activation independently of TRAF1 AND TRAF2. *J Biol Chem.* 2006;281:29022–9.
- **Velculescu VE., Madden SL., Zhang L., Lash AE., Yu J., Rago C., Lal A., Wang CJ., Beaudry GA., Ciriello KM., Cook BP., Dufault MR .** Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet.* 1999;23:387–8.

- **Watanabe T., Hirota Y., Arakawa Y., Fujisawa H., Tachibana O., Hasegawa M., Yamashita J., Hayashi Y.** Frequent LOH at chromosome 12q22–23 and Apaf-1 inactivation in glioblastoma. *Brain Pathol.* 2003;13:431–9.
- **Westin P., Stattin P., Damber JE., Bergh A .** Castration therapy rapidly induces apoptosis in a minority and decreases cell proliferation in a majority of human prostatic tumors. *Am J Pathol.* 1995; 146(6): 1368-1375.
- **Wyllie A. H., Kerr, J. F., and Currie A. R.** Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68: 251-306.
- **Zinkel S, Ong C, Ferguson DO, Iwasaki H, Akashi K, Bronson RT, Kutok JL, Alt FW, Korsmeyer SJ.** Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev.* 2003; 17:229–39.
- **Zinkel S., Gross A., Yang E.** Bcl2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.* 2006; 13:1351-1359.
- **Zou H., Henzel W. J., Liu X. S., Lutschg A., and Wang X. D.** Apaf-1, a human protein homologous to *C. Elegans* Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3; *Cell.* 1997; 90: 405-413.