



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
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

جامعة الأخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Toxicologie et Santé*

Intitulé :

Etude bibliographique sur les extraits des plantes médicinales et leurs effets pro- apoptotique

Présenté et soutenu par :

Le : 05 /06/2016

ABDELALI Faiza

KHELIFI TOUHAMI Randa

LEMOUDA Khaoula

Jury d'évaluation :

Président du jury : LALAOUI Koraichi (Prof- UFM Constantine).

Rapporteur : IHOUAL Safia (MAA- UFM Constantine).

Examineurs : Boubekri Nassima (MCB- UFM Constantine).

HABBACHI Wafa (MCB- U BM Annaba).

*Année universitaire
2015 - 2016*

Dédicace

Je tiens à la fin de ce travail à remercier Allah le tout puissant de m'avoir donné la foi et de permis d'en arriver là.

Je dédie ce modeste travail à :

A mon père et ma mère,

Qui m'ont comblé de leur soutien et m'ont voué un amour inconditionnel, puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et long vie.

A mon frère et mes sœurs

Mohamed lamine ce lui qui je le respect beaucoup dans notre petite famille.

Rima qui n'est pas cessé de m'encouragé et aider à achever ce travail

Zahra ma petite sœur que j'adore

Merci pour votre amour et vos encouragements, je vous souhaite une vie plein de bonheur et de succès.

A la mémoire de mes grands -pères et mes grands -mères,

J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

A mes chers oncles, tantes, leurs époux et leurs épouses, a mes chers cousins et cousines

Vous avez de près ou de loin contribué à ce travail, affectueuse reconnaissance.

A mes amis d'enfance

Ahlem, Choubayla, Nihade.

A mes amis de la fac

(Randa, Khaoula, Soumia, Meriem ...)

A toute la famille abdelali



Abdelali faiza

DEDICACE

Je tiens à la fin de ce travail à remercier Allah le tout puissant de m'avoir donné la foi et de permis d'en arriver là.

Je dédie ce modeste travail à ...

A ma tendre Mère Houria :tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager .Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A Mon très cher père Hocine : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon très cher frère : Seddik .

A tous les membres de ma famille :ibtissem , zoubida, imene, sara, yasmine, amir, rahil, meriem, amiline .

A mes très chères amis :Soumia , Imene , Khaoula , faiza .

A mon fiancé Rached .

A tous les membres de ma promotion.

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

A tous qui me sens chers et que j'ai amis de citer .

Randa

DEDICACES

Au nom d'Allah, Le Clément, Le Miséricordieux

*« Gloire à Toi ! Nous n'avons de savoir que ce que tu nous as appris. Certes c'est Toi
L'Omniscient, le Sage » : Sourate 2, Verset 32 (Saint Coran).*

*Louange et Gloire à Dieu, le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce
Modeste travail.*

A ma mère ferdi Farida :

*Je voudrais à travers ce modeste travail, te rendre un hommage mérité et te dire
combien je suis fierte de l'éducation que tu m'as donnée.*

A mon père nour eddine :

*Mon premier professeur et éducateur qui m'a tant soutenu, encouragé, enseigné et protégé
depuis ma naissance jusqu'à ce jour.*

Ames chers frères :

Khaled et sa femme Sofia

Mohamed lamine

Mohamed rida

Mohamed elhadi

Mohamed errached

Mohamed elkhatem

A ma chère sœur Malek belkis

A mes chères camarades de trinôme : Randa et Faiza

KHAOULA

Remerciements

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements, notre vive reconnaissance et notre sincère gratitude à **Mme IHOUAL SAFIA** ., maitre assistant classe A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Constantine1, pour avoir accepté de nous encadrer malgré ses multiples occupations, nous le remercions pour ses conseils, sa patience, et sa grande disponibilité*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mr LALAOUI KORAICHI** ., Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Constantine1, pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier **Mme BOUBEKRI NASSIMA** ., maitre de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Constantine1, pour avoir accepté de juger ce modeste travail.*

*Nous remercions également **Mlle HABBACHI Wafa** ., maitre de conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université badji mokhtare annaba, de nous fait l'honneur d'accepter d'examiner notre mémoire .*

Enfin, nous remercions vivement toute la promotion de master2 «toxicologie et sante», année 2015-2016. Pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures et tableaux

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE 1 :L'APOPTOSE..... | 3 |
| 1. Définition..... | 3 |
| 2. Différents types de mort cellulaire : nécrose et apoptose..... | 3 |
| 2.1. Nécrose..... | 4 |
| 2.2 .Apoptose | 4 |
| 3. Description de l'apoptose | 6 |
| 3.1. Caractéristiques morphologiques..... | 6 |
| 3.2. Caractéristiques biochimiques..... | 7 |
| 4. Importance du processus apoptotique..... | 9 |
| 4.1. Rôle physiologique..... | 9 |
| 4.2. Apoptose et pathologies | 10 |
| 5. les phases de l'apoptose..... | 11 |
| 5.1. La phase d'initiation..... | 11 |
| 5.2. La phase de régulation..... | 12 |
| 5.3. La phase d'exécution..... | 12 |
| 6. Les caspases..... | 12 |
| 6.1-Définition..... | 12 |
| 6.2. Classification..... | 13 |
| 6.2.1. Caspases initiatrices / caspases effectrices..... | 13 |
| 6.3. Structure des caspases..... | 14 |

| | |
|--|----|
| 6.4. Activation des caspases..... | 15 |
| 6.5. La régulation des caspases..... | 17 |
| 7. Les mécanismes généraux de l'apoptose..... | 18 |
| 7.1-La voie extrinsèque..... | 19 |
| 7.2. .la voie intrinseque : voie mitochondriale | 21 |
| 7.2 .1. La mitochondrie..... | 21 |
| 7.2 .1.1. Le rôle physiologique de la mitochondrie | 21 |
| 7.2.1.2. Le rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire..... | 22 |
| 7.2.1.3.Protéines de la famille Bcl-2..... | 22 |
| 7.2.1.4. Le pore de perméabilité transitoire (PPT)..... | 24 |
| 7.2.1.5. La formation de canaux ioniques non spécifiques..... | 24 |
| 7.2.1.6. Molécules d'origine mitochondriale..... | 25 |
| 7.2.2. Rôle de p53 dans la voie intrinsèque..... | 27 |
| 8. La famille BCL-2..... | 28 |
| 8.1. Role de la famille Bcl-2..... | 28 |
| 8.2-Structure de la famille Bcl-2..... | 28 |
| 8.3- Spécificité de la famille Bcl-2 | 29 |
| 8.4-Activation de la famille BCL-2 | 30 |
| 8.5-Régulation de la famille BCL-2 | 30 |
| 9. Protéines régulatrices de l'apoptose | 31 |
| 9.1. La protéine inductrice de l'apoptose (AIF)..... | 32 |
| 9.2. Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) | 32 |
| 9.3. FLIP..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 10. Apoptose induite par les drogues..... | 33 |
| 11. Les gènes impliqués dans l'apoptose | 33 |

CHAPITRE 2 : DETECTION D' APOPTOSE.

| | |
|--|----|
| I. Introduction | 36 |
| 1. Détection de la caspase 3 par western blot | 36 |
| 1.1. Principe | 36 |
| 1.2. Procédure générale | 36 |
| 1.2.1:détection de clivage de caspase et clivage de substrat par western blot..... | 36 |
| 1.2.2. Mesure des activités de caspase en utilisant des substrats synthétiques..... | 37 |
| 1.2.3.mesure de l'activation de caspase par immunocoloration ou avec substrats fluorescents dans les tissus et cellules..... | 37 |
| 1.3. Résultats | 39 |
| 1.4. Discussion | 39 |
| 2. détection par la méthode tunel | 40 |
| 2.1. Le principe..... | 40 |
| 2.2. Procédure générale..... | 40 |
| 2.3. Résultat | 41 |
| 2.4. Discussion | 41 |
| 3. détection par test apostain | 41 |
| 3.1. Le principe..... | 42 |
| 3.2. Procédure générale | 42 |
| 3.3. Résultat | 42 |
| 3.4. Discussion | 42 |

| | |
|--|----|
| 4. Le Test MTT..... | 43 |
| 4.1. Principe..... | 43 |
| 4.2. Procédure Générale..... | 44 |
| 4.3. Resultats | 44 |
| 4.4. Disscution | 45 |
| 5. Test de Bleu de Trypan..... | 45 |
| 5.1. Nature du reactif | 45 |
| 5.2. Principe | 46 |
| 5.3. Procédure générale | 46 |
| 5.4. Resultats | 46 |
| 5.5. Disscution | 47 |
| CHAPITRE 3 :L'ACTIVITE PRO-APOPTOTIQUE DES EXTRAITS DES PLANTES MEDICINALES. | |
| I.Introduction | 48 |
| 1. Phyllanthus urinaria..... | 48 |
| 1.1. Classification scientifique | 49 |
| 1.2. Matériaux et méthodes.. | 49 |
| 1.2.1. Préparation de l'extrait de P.urinaria..... | 49 |
| 1.2.2. Les changements morphologiques | 49 |
| 1.3.Résultats | 49 |
| 1.3.1. La Viabilité des différentes cellules cancéreuses après traitement avec P..... | 49 |
| 1.3.2. Induction de l'Apoptose dans les cellules cancéreuses par le traitement P .d'urinaria..... | 50 |
| 1.3.3. Aucun effet cytotoxique de l'extrait P. d'urinaria sur les cellules normales..... | 50 |
| 1.4. Discussion..... | 51 |

| | |
|---|----|
| 1.5. Conclusion..... | 52 |
| 2. Le curcuma | 52 |
| 2.1. Classification scientifique..... | 53 |
| 2.2. La curcumine induit l'apoptose des cellules de leucémie monocyttaire THP1 (cellule humaine) via l'activation de JNK..... | 53 |
| 2.2.1. Methodes | 54 |
| 2.2.2. La cytométrie de flux..... | 54 |
| 2.2.3. L'activité du caspase..... | 54 |
| 2.2.4. Essai de WST-1..... | 55 |
| 2.3. Resultats | 55 |
| 2.3.1. La curcumine induit l'apoptose des cellules THP-1..... | 55 |
| 2.3.2. L'apoptose des cellules THP-1 par la curcumine est médié par l'activation des voies JNK / ERK / Jun..... | 56 |
| 2.4. Discussion | 57 |
| 2.5. Conclusion..... | 57 |
| 3. Alpinia galanga..... | 58 |
| 3.1. Classification scientifique..... | 58 |
| 3.2. acétate d'l's-l'-acétoxychavicol..... | 59 |
| 3.2.1.Extraction..... | 59 |
| 3.2.2. Structure chimique de l'acétate d'acétoxychavicol | 59 |
| 3.2.3. Activité de l'extrait méthanolique du rhizome d'A. galanga sur l'apoptose..... | 60 |
| Conclusion : | 61 |

Liste des abréviations

A

ADN : acide desoxyribonucléique.

ADP : Adénosine Di-Phosphate.

AFC: 7- amino-4- trifluorométhyl coumarine.

AIF: Apoptosis Inducing Factor.

AMC: 7- amino-4- méthylcoumarine.

ANT: l'adénine nucléotide translocase.

APAF-1: Apoptosis Protein Activating Factor

ARN: Acide ribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

B

BAD: BCL-2 Antagonist of cell Death.

BAK: BCL-2-Antagonist/Killer.

BAX: BCL-2-Associated X Protein.

BCL-2: B-Cell Lymphoma Protein 2

Bcl-xL: longer alternatively spliced form of Bcl-x.

Bcl-xS: shorter alternatively spliced form of Bcl-x .

BCLW: BCL-2 like 2 Protein.

BH: Bcl-2 Homology.

Bid: BH3 interacting death domain agonist.

BIM: BCL-2-interacting mediator of cell death.

BIK: BCL2 Interacting Killer.

BIR: Baculovirus IAP Repeat.

BMF: a BH3 only protein.

BOD: BCL-2 homologue of Ovary.

C

CAD: Caspase-Activated DNase.

CAD/ICAD: Caspase Activated DNase / Inhibitor of Caspase Activated DNase

CaCl₂ : Chlorure de calcium

CARD : Caspase Recruitment Domain.

caspases : cysteinyl aspartate-specific proteases

Ced: Coenorhabditis elegans death

c-FLIP: cellular FLICE (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme)-inhibitory.

cIAP: cellular-IAP.

CrmA: cytokine response modifier gene.

CytC : Cytochrome c.

D

DAB: 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride.

DD: Death Domain.

DED: Death Effector Domain », domaine effecteur de mort.

DEVD: Aspartate-Glutamate-Valine-Aspartate.

DFF: DNA Fragmentation Factor.

Diablo: direct IAP binding protein with low pI.

DISC: Death-Inducing Signalling Complex.

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNase : Désoxyribonucléase.

D.O : Densité optique à la longueur d'onde Å.

DR4: Death Receptor 4.

DR5: Death Receptor 5.

DTT: dithiothretol.

E

EBV : Epstein-Barr virus, virus Epstein Barr

EDTA : Ethylenediaminetetraaceticacid », Acide éthylène diamine tétra –acétique.

Endo G:Endonucléase G.

ERO : espèces réactives de l'oxygène.

F

FADD: FasAssociatedDeath Domain protein.

FasL: FasLigand.

FITC: fluorescein isothiocyanate.

FLIP: FLICEInhibitoryProtein .

FITC: FluorescéineIsoThioCynate

H

HEPES : Acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique].

HIV: Human Immunodeficiency Virus, VIH.

H1-60: Human promyelocytic leukemia cells.

HRP: horse radish peroxydase.

HSV: Herpes Simplex Virus.

HtrA2: High Temperature Requirement protein A2.

I

IAP : Inhibiteurs des protéines apoptotiques.

ICAD: Inhibitor of Caspase-Activated DNase.

ICE : Enzyme de conversion de l'interleukine 1 bêta.

IETD: isoleucine-glutamate-thréonine-aspartate.

I-kBkinase: Inhibitor of NF-kappaB Kinase.

IL: interleukine.

ISEL: in situ end labeling.

J

JAK: Janus Kinase.

JAK-STAT: Janus kinase-signal transducer and activator of transcription.

JNK : Kinase de la partie N-terminal de la protéine c-jun.

K

kDa : kilo Dalton.

L

LMA: Leucémiemyéloïde aiguë

M

MCL1: Myeloid-Cell Leukaemia sequence 1.

MCF-7: human breast cancer cell

MDM2: Murine Double Minute 2

MTT: 3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide.

N

NaCl: Chlorine de sodium

NFκB: Nuclear Factor of chaink of B cells.

NGF : Facteur de croissance neuronale

NOXA: BH3-only member of the Bcl-2 family.

O

Omi:HtrA2.

P

PARP: poly (ADP-ribose) Polymerase-1.

p19ARF:p19 alternative reading frame protein.

Pb : Paires de base.

PBS : Phosphate Buffer Saline », tampon phosphate salin.

PI : Iodure de propidillm.

pNa : *p*-nitroanilide.

PPT : pore de perméabilité transitoire.

PUMA: P53-Upregulated Modulator of Apoptosis

R

RAIDD: RIPK1 Domain containing Adapter with DD.

ROS: ReactiveOxygenSpecies.

S

SDS: Sodium-Dodecyl-Sulfatel.

SDS-PAGE: Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

SMAC: Second mitochondria-derivedactivator of caspase.

SMAC/ DIABLO: Second Mitochondria-derivedActivator of Caspases/Direct IAP-BindingproteinwithLOW Pi.

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.

T

TdT : terminal deoxynucleotidyltransferase.

THP-1: cell line human leukemic monocyte

TNF : Tumor Necrosis Factor.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

TNFR1: Tumor Necrosis Factor Receptor 1.

TRAF-2: TNF receptor associated factor-2

TRAIL: TNF related apoptosis-inducing ligand.

TRAILR : Récepteur de TRAIL

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling.

U

UMA: p53 upregulated modulator of apoptosis.

UV : ultra violet.

V

VDAC : Voltage Dependent Anion Channel.

VHC : Virus de l'Hépatite C.

X

XIAP: X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein.

Y

YVADO ou WEHD : Tyrosine-Valine-Alanine-Aspartate.

Liste des figures et tableaux

Figure 1-caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose.

Figure 2-apoptose d'une cellule épithéliale pulmonaire.

Figure 3-cellule de glande mammaire en apoptose.

Figure 4-fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose.

Figure 5-mort par apoptose des cellules de la commissure des doigts durant le développement embryonnaire.

Figure 6-intervention de l'apoptose dans le développement du système nerveux.

Figure 7-Classification des caspases chez l'humain. CARD et DED L: sous-unité longue (p20). S: sous-unité courte (p10).

Figure 8-Structur et activation des caspases

Figure 9-cascade d'activation de l'apoptose extrinsèque.

Figure 10- classification des protéines de la famille BCL-2

Figure 11- Représentation schématique de l'ouverture des pores de transition de perméabilité ppt.

Figure 12- l'assemblage de l'apoptosome .

Figure 13- Membres de la famille BCL-2.

Figure 14-Régulation des protéines BH3.

Figure 15-apoptose chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et homologie avec les mammifères.

Figure 16- la détection de caspase 3 par western blot.

Figure 17- les cellules de lymphome humain détectées par la méthode tunel suivie d'une fluorescence.les cellules en apoptose (vert), les cellules en nécrose (rouge).

Figure 18-principe du test MTT.

Figure 19- quantification de la viabilité cellulaire par le test MTT dans une plaque à 96 puits..

Figure 20-structure chimique de bleu de trypan .

Figure 21-comptage des cellules après coloration.

Figure 22- phyllanthus urinaria.

Figure 23- L'effet de l'urinaria de P. sur la viabilité de diverses cellules cancéreuses.

Figure 24- Aucun effet cytotoxique d'extrait d'urinaria de P. sur HUVECs et cellules WRL68.

Figure 25- Illustrations de Curcuma Longa, la plante d'où est extrait le curcuma, de sa racine et de l'épice.

Figure 26-Alpinia galanga.

Figure 27-Rhizome frais d'A. galanga.

Figure 28- Structure de L'acétate d' 1 'S-1 '-acétoxychavicol.

Tableau 1 : comparaison des caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose.

Introduction

L'apoptose est un processus physiologique, normal, de mort cellulaire programmée, décrit pour la première fois en 1972 par Kerr, Willie et Currie (1). Elle permet le développement normal d'un organisme, l'homéostasie cellulaire, la défense contre des agents pathogènes...etc, Son dérèglement peut devenir pathologique : cancers (prolifération cellulaire, système immunitaire inefficace...), maladies auto-immunes (défaillance du système immunitaire), Infections virales (persistance des cellules infectées).

Elle est caractérisée par une atrophie du corps cellulaire, la condensation de la chromatine et du cytoplasme, le bourgeonnement des membranes, puis la fragmentation en corps apoptotiques avec dégradation de l'ADN aboutissant à une phagocytose du corps apoptotique.

Il existe deux voies apoptotiques chez les mammifères :

-Voie extrinsèque(ou des récepteurs de mort) : la liaison d'un ligand au récepteur de mort correspond à un signal de mort, qui va activer une cascade. Exemples : Fas et son ligand Fas-L, TNF et son récepteur TNF-R.

-Voie intrinsèque(ou mitochondrie-dépendante) : elle met en jeu la libération de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie. De nombreuses protéines de la famille de Bcl-2, descaspases.

La régulation de l'apoptose se fait par des protéines codées par le gène Bcl-2 qui ont le pouvoir d'inhiber les caspases ou de bloquer les signaux cellulaires des récepteurs membranaires. On retrouve largement une suractivité de ces gènes dans les cellules cancéreuses, ce qui leur permet d'inhiber ce mécanisme antiprolifératif (2).

L'implication de l'apoptose dans de nombreux processus physiologique et pathologique, S'est accompagnée d'un développement technologique considérable, nombreuses sont les méthodes qui permettent la détection de l'apoptose Comme la méthode tunel (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) qui détecte les fragments d'ADN, Cette méthode n'est toute fois pas toujours spécifique et elle gagne à être vérifiée à l'aide d'autres marqueurs comme l'apoptain. Il existe aussi une variété de tests de viabilité cellulaire dont les principaux sont le test d'exclusion au bleu trypan, et le test MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ,La détection de caspase-3 par le western blot, permet

l'analyse de protéines spécifiques après séparation par électrophorèse sur gel en polyacrylamide-SDS et transfert sur membrane.

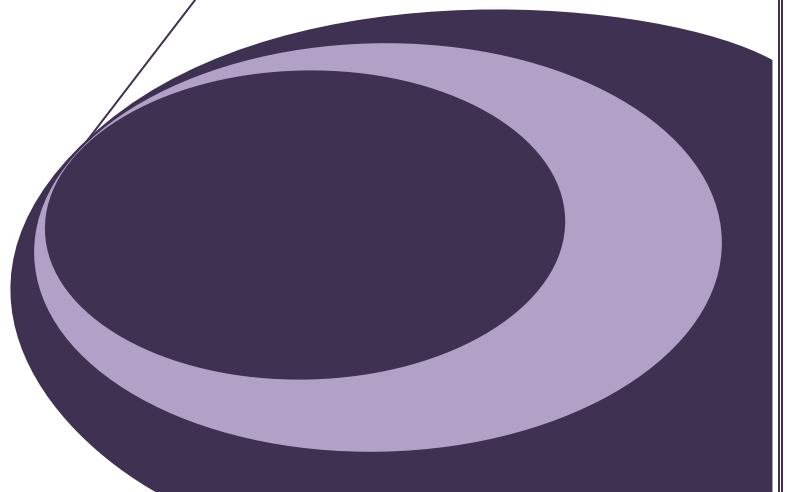
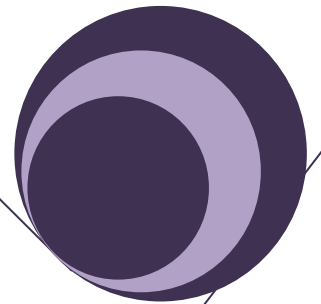
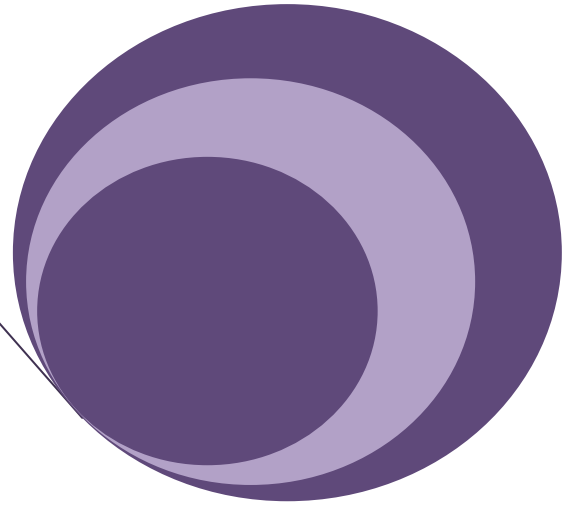
L'échec ou la suppression de l'apoptose est susceptible d'entraîner le développement de cellules immortelles et ensuite le développement du cancer. Par conséquent, il est utile de trouver des agents puissants capables d'induire l'apoptose efficacement dans les cellules cancéreuses (3). comme les extraits des plantes médicinales. Donc nous avons fait une étude bibliographique dans notre travail est démontré que les extraits des plantes suivantes : *Phyllanthus urinaria*, *Curcuma longa*, *Alpinia Galanga*, à effets pro-apoptotique.

L'extrait aqueux de *Phyllanthus urinaria* pourrait induire la mort de diverses cellules cancéreuses (tel que les cellules de leucémie et les cellules myélogènes chroniques de leucémie) mais pas les cellules normales.

La curcumine une molécule extraite de la racine de *Curcuma longa*, Cette molécule, tout d'abord reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires, principalement via l'inhibition de la voie NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) est également capable d'induire la mort des cellules cancéreuses, principalement par apoptose.

L'acétate d'acétoxychavicol isolé d'un extrait méthanolique des graines et des rhizomes d'*Alpinia Galanga*, peut activer l'apoptose par ses propriétés antitumorales intéressantes sur divers cellules cancéreuses (Les cellules de tumeur ascitique d'Ehrlich, les cellules leucémiques promyélocyaires NB4).

CHAPITRE N : 1
L'APOPTOSE



L'APOPTOSE

1. Définition :

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisée pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige le programme de sa propre mort.

L'apoptose joue un rôle essentiel dans le développement normal de l'organisme et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire chez l'adulte, de façon opposée à la mitose. La mort cellulaire « normale » a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens, puis dans plusieurs tissus en développement tant chez les invertébrés que chez les vertébrés (4-5).

En 1972, Kerr *et al.* ont décrit une mort cellulaire du même type dans divers tissus et types cellulaires : ces cellules présentaient des caractéristiques morphologiques communes, mais cependant distinctes de celles observées dans les cellules en nécrose (1). Ils ont suggéré que ces caractéristiques morphologiques communes pouvaient être le résultat d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire, qu'ils ont appelé « apoptose ». Ce terme vient du grec et fait allusion à la chute des feuilles en automne. L'apoptose est un phénomène conservé à travers les espèces, elle est retrouvée chez tous les organismes multicellulaires. (6-7).

L'apoptose est un phénomène hautement régulé au cours duquel les enzymes cataboliques dégradent des molécules essentielles à la vie cellulaire, aboutissant aux caractéristiques biochimiques et métaboliques typiques de la mort cellulaire programmée. L'expression de nombreux gènes apoptotiques va induire la destruction d'une cellule en ne manquant pas de signaler son suicide aux cellules voisines ; l'intégrité tissulaire des cellules est ainsi préservée. L'apoptose s'inscrit ainsi dans la vie de la cellule au même titre que la différenciation ou la division cellulaire (9).

2. Différents types de mort cellulaire : nécrose et apoptose

Il existe deux types de mort cellulaire :

- la nécrose ou mort accidentelle de la cellule.
- l'apoptose ou mort contrôlée par la cellule.

2.1. Nécrose :

La nécrose, quant à elle, est une mort cellulaire dite «accidentelle», qui survient lors d'un dommage tissulaire (hypoxie, infection, traumatismes, etc.). Cette mort touche un ensemble de cellules d'un tissu, contrairement à l'apoptose qui, la plupart du temps, n'affecte que des cellules individuelles au sein d'un tissu **(8-9)**.

Un phénomène passif et «désordonné »est observé ; il en résulte un clivage de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) de manière aléatoire par des endonucléases **(9)** et une incapacité de la cellule à maintenir son homéostasie. Il se produit alors une entrée massive d'eau et d'électrolytes dans la cellule **(10)**.

Cette dernière, mais aussi les organites intracellulaires tels que les mitochondries, le contenu intracellulaire dans le milieu environnant. Cette libération des organites et de leur contenu se propage dans le milieu extra-cellulaire, ce qui entraîne un processus nécrotique chez les cellules environnantes et provoque la réaction inflammatoire.

2.2 .Apoptose :

Il s'agit d'une forme active d'autodestruction qui correspond à une réaction de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques. Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé, qui consiste en l'activation d'enzymes et l'expression de nombreux gènes pro ou antiapoptotiques qui vont induire la destruction d'une cellule tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante. Elle est également indispensable au remodelage, au maintien de l'homéostasie tissulaire **(11)** et à la régulation des réponses immunitaires (ex: l'auto-sélection positive des lymphocytes). Elle permet, en effet, de sélectionner et d'éliminer les cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme, les cellules surnuméraires et les cellules dysfonctionnelles **(12)**.

Une cellule qui entre en apoptose subit des changements morphologiques caractéristiques. Elle se rétrécit légèrement et démontre subséquemment une chromatine dense, le noyau se fragmente, le cytoplasme bourgeonne et, finalement, la cellule se subdivise en petits morceaux que l'on appelle des corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques seront alors phagocytés, évitant ainsi que le contenu cellulaire ne soit déversé dans l'environnement **(13)**. De ce fait, l'apoptose est un processus n'induisant pas d'inflammation.

L'apoptose est en quelque sorte l'étape finale dans le renouvellement des populations de cellules. Dans la majorité des cas, une cellule naît d'une division cellulaire, se différencie et finalement meurt par apoptose (14).

Tableau 01: comparaison des caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose (15).

| Apoptose | Nécrose |
|--|--|
| Une cellule ou un petit groupe de cellules | Souvent des cellules contiguës |
| Rétrécissement des cellules | Gonflement des cellules |
| Condensation de la chromatine et fragmentation du noyau dans les corps apoptotiques. | lyse du noyau, condensation De la chromatine |
| Membrane cellulaire intacte | Membrane cellulaire rompue |
| Cytoplasme retenu dans les corps apoptotiques | Cytoplasme libéré |
| Pas de réaction inflammatoire | Inflammation souvent présent |
| Processus contrôlé | Processus incontrôlé |
| Dépendant de l'énergie | Indépendant de l'énergie |

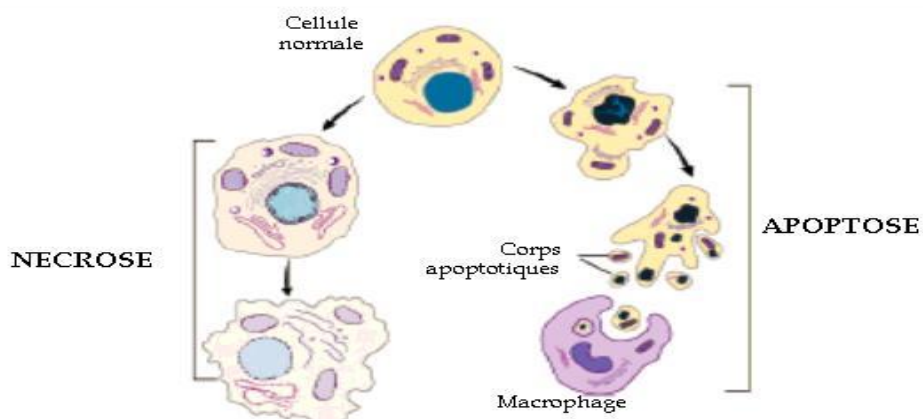


Figure 01 : caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de La nécrose (16).

3. Description de l'apoptose :

3.1. Caractéristiques morphologiques :

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des altérations morphologiques. Ces changements morphologiques sont spécifiques à l'apoptose et permettent d'identifier ce type de mort cellulaire.

Un des premiers changements observables est **la réduction du volume cellulaire** : la cellule se déshydrate et la perte de l'eau intracellulaire conduit à la condensation du cytoplasme qui résulte en une modification de la forme et de la taille cellulaire. Au cours de cette étape, la cellule perd le contact avec ses voisines. Malgré la rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts et gardent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose (17).

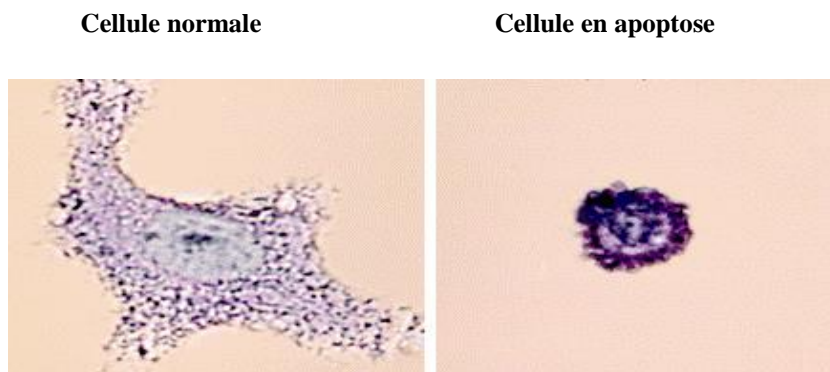


Figure 02 : Apoptose d'une cellule épithéliale pulmonaire (18).

•**Le noyau**, quant à lui, se rétrécit, la chromatine se condense, se fragmente, forme des amas puis des croissants accolés à l'enveloppe nucléaire. Ce phénomène est habituellement accompagné d'une fragmentation irréversible de l'ADN nucléaire.

La fragmentation de l'ADN par des endonucléases prend la forme d'un clivage de l'ADN en larges fragments de 300 000 et/ou de 50 000 paires de bases. Cette première fragmentation est typiquement suivie d'un clivage internucléosomal très spécifique du processus apoptotique, qui aboutit à l'apparition de monomères ou d'oligomères de 180-200 paires de bases (19).

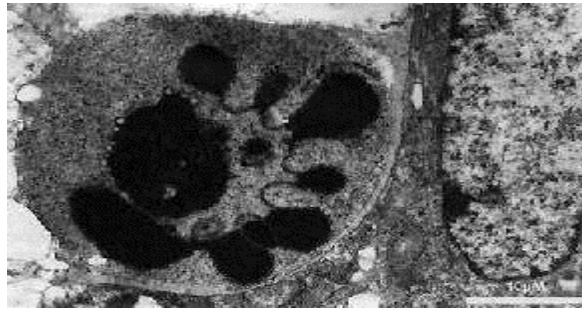


Figure 03: Cellule de glande mammaire en apoptose (17).

La condensation de l'ADN est spécifique de l'apoptose. Après cette phase de condensation, la cellule présente à sa surface des vésicules renfermant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques, entourés de membrane plasmique. Ces vésicules vont se détacher de la cellule pour former les corps apoptotiques, qui sont libérés dans le milieu. Les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés *in vivo*, par les cellules voisines ou les macrophages, sans provoquer de processus inflammatoire dans les tissus (17).

• **Le changement de polarité membranaire**, est une des caractéristiques morphologiques de l'apoptose. C'est-à-dire la translocation des résidus phosphatidyl-sérines du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche phospholipidique (20).

L'exposition de ces résidus sur le feuillet externe est essentielle pour l'élimination des corps apoptotiques *in vivo*. Ils contribuent efficacement à la reconnaissance et à la phagocytose des corps apoptotiques, issus du bourgeonnement cellulaire, par les macrophages (phagocytes primaires) ou par les cellules environnantes (phagocytes secondaires). Cette phagocytose évite ainsi tout déversement du contenu cellulaire dans le milieu environnant et par conséquent évite la réaction inflammatoire. *In vitro*, en l'absence de phagocytose, les corps apoptotiques finissent par éclater : parle alors d'apoptose secondaire (ou encore de nécrose secondaire).

3.2. Caractéristiques biochimiques :

Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés d'altérations biochimiques spécifiques. Parmi celles-ci, la plus remarquable est la **fragmentation de l'ADN**, qui survient lors de la condensation de la chromatine.

Cette fragmentation peut être mise en évidence en analysant, par électrophorèse sur Gel d'agarose, l'ADN isolé de cellules en apoptose. Les résultats d'électrophorèse obtenus

montrent plusieurs bandes, de taille équivalente à des multiples de 180 paires de bases, qui forment une « échelle d'ADN ». Ce profil n'est pas retrouvé lors de la nécrose où la dégradation de l'ADN est moins importante et induit des fragments de tailles hétérogènes. Les fragments d'ADN réguliers, générés au cours de l'apoptose, résultent de l'activation d'une endonucléase qui coupe l'ADN entre les nucléosomes. Plusieurs études ont démontré que l'endonucléase CAD (Caspase Activated DNase) est responsable de ce clivage internucléosomal (21-22).

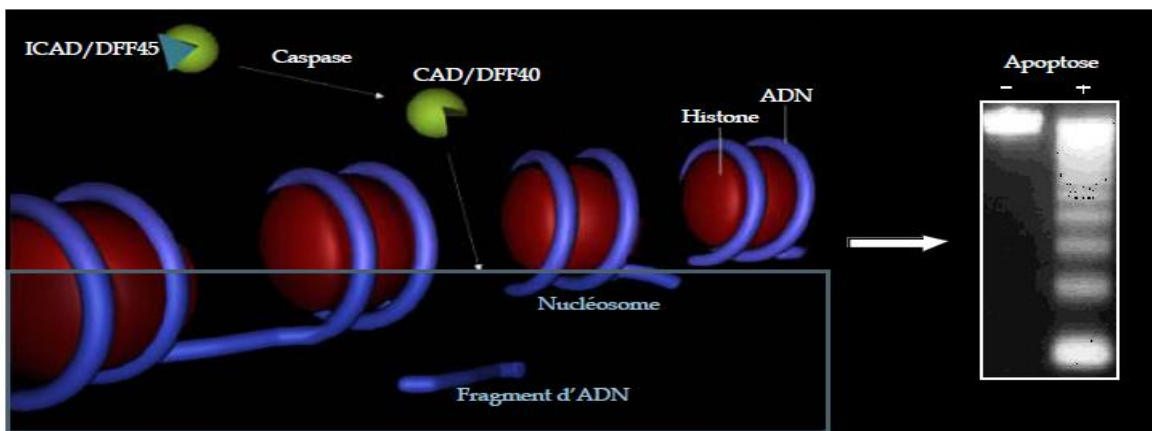


Figure 04 : Fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose

L'endonucléase CAD clive l'ADN entre les nucléosomes (à gauche) et génère des fragments réguliers qui forment une échelle d'ADN sur le gel d'agarose après électrophorèse (à droite).

Ces endonucléases sont souvent localisées dans le cytoplasme sous forme latente inactive et sont spécifiquement activées par la caspase 3 active. En effet, dans les cellules prolifératives, CAD est complexé par son inhibiteur ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase). En revanche, dans les cellules apoptotiques, du fait d'une forte activation de la caspase 3 (suite à plusieurs types de stress cellulaire), ICAD est clivé pour libérer CAD (23)

qui va migrer vers le noyau pour dégrader l'ADN chromosomique causant une condensation de la chromatine. Une autre nucléase responsable de la dégradation de l'ADN lors de l'apoptose, la DNase II (Désoxyribonucléase), a été récemment identifiée. La DNase II est une enzyme lysosomale présente dans les macrophages (24).

D'un point de vue biochimique, l'apoptose est aussi caractérisée par **la perte de l'asymétrie membranaire**. Elle consiste en le passage des phosphatidyl-sérines de la bicouche lipidique, normalement face vers l'intérieur, vers la couche externe de la membrane plasmique (25). Ceci permet d'exposer la phosphatidyl-sérine comme ligand de reconnaissance pour les phagocytes qui vont éliminer les cellules apoptotiques. (26).

4. Importance du processus apoptotique :

L'apoptose est une des fonctions normales de l'organisme qui a pour but d'éliminer les développements inutiles et/ou potentiellement dangereux. Elle joue un rôle physiologique, mais elle est aussi impliquée dans des situations pathologiques (11).

4.1. Rôle physiologique :

L'apoptose est essentielle au développement de l'organisme. Elle permet l'élimination de structures inutiles ou mal formées. Elle participe notamment à **la morphogénèse des doigts** : les cellules de l'espace interdigital des doigts d'un embryon disparaissent par apoptose (27). De même, au cours du développement des amphibiens, l'augmentation des quantités d'hormones thyroïdiennes circulantes induit l'apoptose des cellules de la queue et fait disparaître cet organe (28).

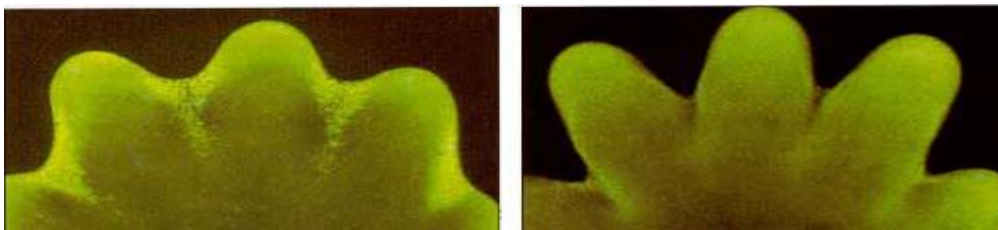


Figure 05 : Mort par apoptose des cellules de la commissure des doigts durant le développement embryonnaire (27).

L'apoptose participe également à la construction de nos deux organes de régulation les plus complexes, **le cerveau** et **le système immunitaire**. Où elle assure qu'un nombre correct de cellules souches se différencie.

Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès, 20 à 80% de ces cellules vont ensuite mourir par apoptose afin de créer un équilibre entre ces neurones et

les cibles qu'ils innervent. En effet, les cellules nerveuses embryonnaires ont besoin pour survivre du facteur de survie NGF (nerve growth factor), produit par les cellules cibles des neurones (29). Seuls vont survivre les neurones qui se connecteront correctement à leur cible. Les autres cellules, incapables de recevoir ce signal, vont mourir par apoptose en raison de leur mise en place incorrecte.

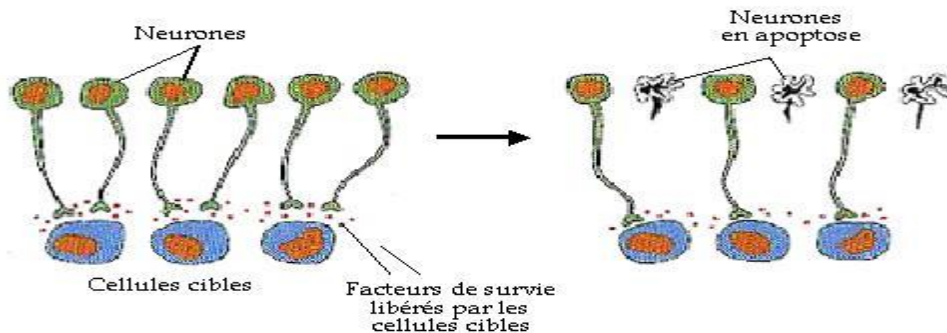


Figure 06 : Intervention de l'apoptose dans le développement du système nerveux (29).

La mort cellulaire est aussi essentielle à la régulation de la réponse immunitaire. En effet, elle permet l'adaptation du système immunitaire au "Soi" en sélectionnant, à partir de l'immense diversité initiale de lymphocytes, les 1 à 5 % qui ont démontré leur capacité à défendre l'organisme sans pour autant l'agresser. Ils seront par la suite capables de combattre un micro-organisme qui nous aura envahis. Les cellules immunitaires prolifèrent suite à la présence d'un agent étranger. Une fois celui-ci éliminé, de nombreuses cellules sont détruite pour ralentir ainsi la réponse immunitaire qui pourrait causer de graves dommages à l'organisme (30-31).

4.2. Apoptose et pathologies :

Les dérèglements des mécanismes contrôlant l'apoptose peuvent être responsables du déclenchement et de la progression de nombreuses pathologies. Ces dernières peuvent être caractérisées soit par un **déficit** d'apoptose (cancer, infections virales...), soit par un **excès** d'apoptose (maladies neurodégénératives, infarctus du myocarde...).

Le **déficit** de l'apoptose est souvent associé au développement de maladies autoimmunes et lymphoprolifératives (32-33), mais aussi aux phénomènes de carcinogénèse (34). Au cours des infections virales, les virus mettent en place des systèmes d'inhibition d'apoptose afin

d'envahir l'hôte, comme notamment le virus de l'hépatite C (VHC) et l'Herpès simplex virus-1 (HSV-1) (35). En empêchant la mort cellulaire, les virus permettent non seulement la survie de la cellule qu'ils infectent, mais aussi leur propre survie, ce qui favorise l'apparition de cancers comme c'est le cas pour le virus Epstein Barr (EBV).

Une augmentation anormale du nombre de certaines cellules, due au déficit de l'apoptose, est aussi observée dans les cancers. Le blocage anormal de l'apoptose est impliqué dans le développement des métastases, permettant à des cellules cancéreuses de migrer dans l'organisme sans s'autodétruire et de survivre dans un organe qui n'est pas le leur (36-11).

L'excès d'apoptose intervient dans le développement de nombreuses pathologies: anomalies congénitales du développement, certaines maladies neurodégénératives chroniques comme l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer (37), la maladie de Parkinson et les rétinopathies, dégénératives. Cet excès est observé dans les accidents vasculaires cérébraux, les ischémies reperfusion, les hépatites fulminantes ou alcooliques, les lésions causées par des méningites (36). Le déclenchement anormal ou excessif de l'apoptose intervient aussi lors de certaines infections virales, comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (38-39) et le virus de la grippe (40).

Il existerait aussi un lien entre la sénescence et le processus apoptotique. Le vieillissement se caractérise en effet par une altération progressive des capacités fonctionnelles de notre corps et par l'apparition de trois catégories de maladies graves : les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et les cancers, toutes liées comme nous l'avons vu à un excès ou un déficit d'apoptose (41).

5. les phases de l'apoptose :

L'apoptose peut classiquement être divisée en trois phases : une phase d'induction ou d'initiation, une phase d'exécution et une phase de dégradation. La phase d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra- ou extracellulaire) est transmis aux caspases initiateuses par des molécules adaptatrices. Ces caspases interviennent dans l'exécution de l'apoptose et conduisent à la dégradation de la cellule (42).

5.1. La phase d'initiation :

Réversible, au cours de laquelle les modifications morphologiques ne sont pas encore visibles ; cette phase se caractérise par des modifications biochimiques. Ces dernières dépendent de la nature des stimuli qui peuvent être physiques (pression, micro-ondes, rayonnement X ou UV...), chimiques (H₂O₂, étoposide, cisplatine, camptothécine, staurosporine...) ou encore biologiques (ligands de récepteurs membranaires impliqués dans la mort cellulaire...) (43).

Des régulateurs de l'expression génique (le facteur de transcription NF-κB : Nuclear Factor-Kappa B), de la prolifération cellulaire, ainsi que des récepteurs membranaires de mort ou des molécules impliquées dans le maintien de l'intégrité du génome (suppresseur de tumeur p53), vont jouer également un rôle important dans cette phase d'initiation.

la phase d'initiation possède deux voies de transduction du signal apoptotique, appelées voie extrinsèque et voie intrinsèque (43).

5.2. La phase de régulation :

La phase de régulation (ou de décision) est commune à toutes les voies de transduction du processus apoptotique. Après intégration du signal initiateur, en fonction de son métabolisme interne et de son état de développement, la cellule prend la décision d'entrer ou non en apoptose. Le contrôle est effectué, le plus souvent, par la mitochondrie et un ensemble de protéines pro- et anti-apoptotiques (Bax et Bcl-2).

Cette phase basée sur une décision entièrement mitochondriale et contrôlée par les membres de la famille Bcl-2 pour la voie intrinsèque et qui peut être également, dans certain cas, une décision mitochondriale pour la voie extrinsèque (44).

5.3. La phase d'exécution :

La phase d'exécution (ou de dégradation), irréversible, se distingue par l'activation d'hydrolases cataboliques comme les nucléases et les caspases. Ces enzymes sont activées et contrôlées par les mitochondries ainsi que par les molécules pro- et anti-apoptotiques mitochondriales. Les enzymes désassemblent de façon contrôlée et ordonnée les structures sub-cellulaires ; ces dernières entraînent les changements biochimiques et morphologiques caractéristiques de l'apoptose, aboutissant alors à une destruction cellulaire (44).

6. les caspases :

6.1 .Définition :

Les caspases composent la famille des « cysteinyl aspartate-specific proteases ». Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose et leur activation est caractéristique de l'apoptose.

Elles existent sous forme de zymogènes et, classiquement, elles doivent être clivées au niveau de résidus aspartate pour générer une enzyme active.

A ce jour 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères. Chez l'homme, les caspases -1, -4 et -5 (-11 et -12 chez la souris) sont impliquées dans la régulation du processus inflammatoire.

-Les caspases -2, -8, -9 et -10 sont dites initiatrices de l'apoptose car, en amont, elles produisent une cascade d'événements aboutissant, en aval, à l'activation des trois caspases effectrices de l'apoptose, les caspases -3, -6 et 7.

-Toutes les caspases partagent des homologies structurelles. Elles sont synthétisées sous forme de pro-caspases (zymogènes) immatures (45).

6.2. Classification :

6.2.1. Caspases initiatrices / caspases effectrices :

Les caspases ont été classées d'après la spécificité de leur substrat ou la taille de leur pro-domaine (46).

Selon la taille de leur pro-domaine, deux classes de caspases se distinguent :

□ les caspases à pro-domaine long : les caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12 -13

Les caspases possédant un pro-domaine long sont les caspases dites initiatrices (ou régulatrices).

Les caspases initiatrices se situent en amont de la cascade de signalisation. Elles ne participent pas directement à l'apparition des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose, mais elles auront pour fonction d'activer les caspases effectrices.

selon la voie apoptotique empruntée, les caspases initiatrices se lient, par leur prodomaine, à différentes protéines adaptatrices. Les caspases initiatrices et les protéines adaptatrices se lient par leurs domaines analogues ; on distingue deux sortes de motifs : les domaines DED/DED (Death Effector Domain), domaine effecteur de mort et les domaines CARD/CARD (Caspase Recruitment Domain)

- Les caspases-8 et -10 intervenant au cours de la voie extrinsèque possèdent des domaines DED et se fixent à la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain protein) par son DED, avant activation.

-Les caspases-1, -2, -4 et -9 possèdent des domaines CARD qui permettent, avant activation, leur recrutement au niveau de complexes protéiques tels que RAIDD (RIPK1 Domain containing Adapter with Death Domain) pour la caspase-2, par exemple, et APAF-1 (Apoptosis Protein Activating Factor) pour la caspase-9.

-□les caspases à pro-domaine court : les caspases-3, -6, -7 et -14.

Les caspases qui possèdent un pro-domaine court se situent en aval des caspases initiatrices. Ce sont les caspases effectrices (ou exécutrices). Leur activation par les caspases initiatrices aboutit à un fonctionnement dit en cascade et à un phénomène irréversible. L'activation des caspases effectrices conduit au clivage de nombreuses protéines cellulaires, aboutissant aux étapes terminales et ultimes de l'apoptose. Les caspases -3, -6 et -7 sont les caspases directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose. D'autres caspases, comme les caspases-1, -4, -5, -11, -12, sont impliquées dans les processus inflammatoires, principalement dans le clivage protéolytique des cytokines proinflammatoires comme l'IL1 et l'IL8 (interleukine) (47).

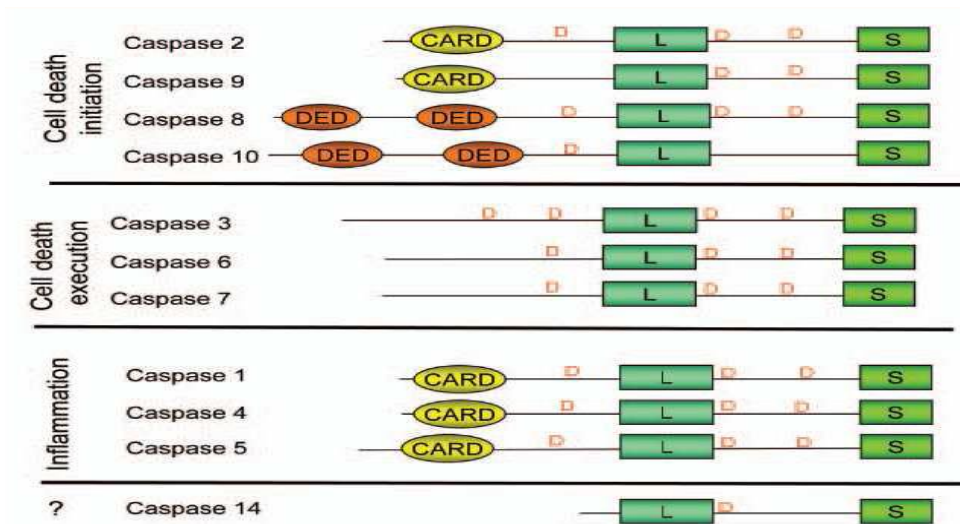


Figure 07 : Classification des caspases chez l'humain. CARD et DED L: sous-unité longue (p20). S: sous-unité courte (p10) (45).

6.3. Structure des caspases:

les caspases sont synthétisées sous une forme inactive appelée zymogène (proenzyme de 30 à 50 KDa) (kilo Dalton). Elles ont une structure très conservée, constituée de trois parties :

□ □le pro-domaine N-terminal (23 à 219 acides aminés) qui semble jouer un rôle dans les interactions « protéines-protéines » et dans la régulation de l'activation de ces enzymes (48).

- □ la grande sous-unité p20 (17-21 KDa) qui porte le centre catalytique ;
- □ la petite sous-unité p10 (10-14 KDa) qui peut être séparée de la grande par des domaines « spacers » éliminés lors de la maturation.

-Le pro-domaine aminoterminal est suivi par une sous-unité longue d'environ 20 kDa (p20) qui comporte une séquence QACXG au sein de laquelle se situe la cystéine essentielle à l'activité de l'enzyme.

-Une sous-unité courte carboxyterminale d'environ 10 kDa (p10) complète la structure de ces protéines. Les caspases initiateuses de l'apoptose possèdent un long prodomaine qui possèdent des motifs d'interaction protéine-protéine appelés « Death Effector domain » (DED) et « Caspase Activation and Recruitment Domain » (CARD). Les caspases effectrices de l'apoptose se caractérisent par leur pro-domaine court (45).

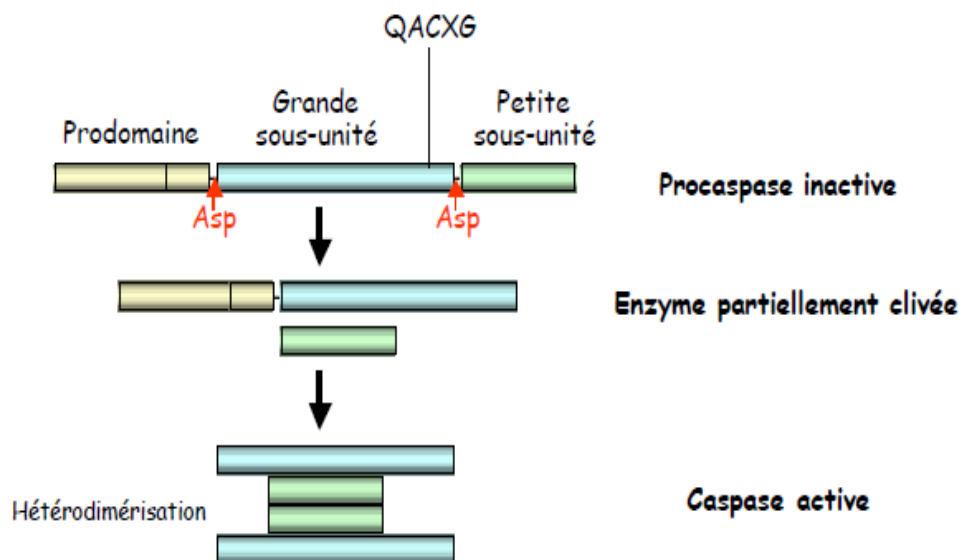


Figure 08 : Structur et activation des caspases (48).

6.4. Activation des caspases :

On distingue deux grandes catégories de caspases fonctionnant en cascade :

Les zymogènes dont le pro-domaine est de grande taille sont monomériques et leur oligomérisation s'effectue par l'intermédiaire d'une molécule adaptatrice interagissant avec leur pro-domaine. Cela suffit à déclencher leur activation. Le clivage du prodomaine intervient secondairement et amplifie l'activité de l'enzyme.

La seconde catégorie de caspases est constituée de pro-caspases à domaine court. Elles sont dimériques et leur activation est due à leur clivage par les caspases à pro-domaine long (d'où le qualificatif d'initiatrices qui leur a été attribué).

-La caspase mature qui résulte de ce clivage est composée d'un tétramère actif, p20p10₂. Ce sont ces caspases (caspases-3, -6 et -7) qui sont responsables de la protéolyse de la majorité des protéines intracellulaires dégradées au cours de l'apoptose, d'où leur nom de caspases effectrices **(49)**.

Une centaine de protéines cibles des caspases ont été identifiées à ce jour. Elles appartiennent à six grandes catégories fonctionnelles :

- 1) Protéines directement impliquées dans la régulation de l'apoptose.
- 2) Protéines médiatrices et régulatrices de la transduction du signal apoptotique.
- 3) Protéines de structure.
- 4) Protéines de réparation de l'ADN (acide desoxyribonucléique).
- 5) Protéines régulatrices du cycle cellulaire.
- 6) Protéines impliquées dans certaines pathologies humaines.

Il est à noter que, dans le cas des substrats de classes 2, 5 ou 6, la spécificité du clivage est souvent restreinte à un type de cellules ou à un stimulus particulier. Par contre, la protéolyse de la plupart des protéines pro-apoptotiques telles que les caspases, des protéines structurelles telles que les kératines ou les lamines, et des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité de l'ADN telles que ICAD/DFF45 (Inhibitor of Caspase-Activated DNase), (DNA Fragmentation Factor) ou poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) est une caractéristique générale de l'apoptose **(50)**. En ce qui concerne les caspases initiatrices on peut retenir l'effet protéolytique de la caspase-9 sur les autres caspases. Une étude récente montre que, *in vitro*, la dimérisation de la caspase-9 entraîne une rapide activation des caspases effectrices - 3, 6 et -7 mais également des caspases initiatrices -2, -8 et -10 **(51)**, une autre activité remarquable concerne la caspase-8 (ainsi que la caspase-10 *in vitro*) qui génère le clivage de Bid, (BH3 interacting death domain agonist) une protéine à BH3 (Bcl-2 Homology) isolé pro-apoptotique, dont la trans-localisation mitochondriale du fragment tBid génère la libération du cytochrome c nécessaire à l'activation des caspases post-mitochondriales **(52)**.

Les caspases effectrices -3, -6 et -7 partagent de fortes similitudes quant à la spécificité pour leur substrat. La caspase-6 est elle-même un substrat de la caspase-3. Elle possède une spécificité pour la lamine A **(53)** et une forte affinité pour la cytokératine 18 **(54)**.

Les caspase-3 et -7 sont très proches à la fois dans leur structure et leur spécificité (reconnaissance du même motif DEVD) (Asparate-Glutamate-Valine-Aspartate). Peu d'études permettent de différencier leur rôle respectif dans l'apoptose. Récemment, il a été confirmé que la caspase-3 contrôle la fragmentation de l'ADN et les modifications morphologiques du noyau tandis que la caspase-7 jouerait un rôle important dans la perte de la viabilité cellulaire (55). peut-être par la dégradation de plusieurs sous-unités du protéasome (56).

Il a également été démontré une haute affinité de la caspase-7 avec la (PARP-1) (57).

En présence de caspase-3, l'absence des caspases -6 et/ou -7 a peu d'effets sur la protéolyse des protéines impliquées dans la dégradation de l'ADN (53).

Aussi, la caspase-3 est-elle reconnue comme jouant un rôle majeur dans la protéolyse de la plupart des protéines essentielles à la survie de la cellule. La fragmentation de l'ADN attribuée en grande partie à la nucléase CAD (« caspase-activated DNase ») (DFF40 chez l'homme) libérée de son inhibiteur ICAD/DFF45 après clivage de celui-ci est essentiellement due à la caspase-3 (58). De plus, l'observation de cellules MCF-7 déficientes en caspase-3, soumises à divers traitements pro-apoptotiques, ne permet pas de visualiser la fragmentation de l'ADN et la morphologie nucléaire typiques de la cellule apoptotique (59). Cependant, l'absence de caspase-3 peut-être compensée en partie par l'activité des caspases -6 et -7 (60). Plus généralement, en cas de déficience de la caspase-3 mais aussi d'autres caspases essentielles dans la transduction du signal comme la caspase-9, des voies alternatives utilisant les ressources en caspases de la cellule peuvent se substituer au schéma classique (50). Il existe également des voies moléculaires indépendantes des caspases. On peut cependant noter que la déficience simultanée en caspase-3 et -7 dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) inhibe l'apoptose par blocage des événements mitochondriaux. (55).

6.5. La régulation des caspases :

Le premier niveau de régulation des caspases est représenté par les mécanismes spécifiques et complexes de leur activation : disponibilité des facteurs (Apaf-1, cytochrome c), activation des protéines situées en amont dans la signalisation apoptotique (récepteurs).

Les caspases sont aussi régulées par des inhibiteurs spécifiques, qui ont été découverts chez les virus. En effet, l'apoptose représente un des moyens de défense des cellules contre les virus par

élimination des cellules infectées. Certains virus ont donc développé des systèmes de résistance qui agissent sur les caspases et inhibent l'apoptose comme CrmA ou p35. La protéine CrmA (cytokine response modifier gene) du virus de la vaccine interagit avec les caspases-1 et -8 et prévient leur clivage (61). En revanche, p35, exprimée par le baculovirus, inhibe les caspases déjà actives : après clivage par ces caspases, p35 forme un complexe avec celles-ci, ce qui les inactive (62). Des homologues d'autres inhibiteurs de caspases, FLIP (FLICE Inhibitory Protein) et les IAPs (Inhibitors of Apoptosis), mis en évidence chez les virus, ont été retrouvés chez l'homme. La protéine FLIP est un homologue inactif de la procaspase-8. De ce fait, elle va entrer en compétition avec celle-ci et bloquer soit le recrutement de la procaspase-8 au niveau du complexe du récepteur de mort, soit l'activation de la caspase-8 en inhibant son clivage (63). La famille des IAPs a été découverte initialement chez le baculovirus. Tous les membres de cette famille (XIAP, (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein), cIAP1 (cellular-IAP ARD : « Caspase Recruitment Domain), cIAP2, Survivin, Livin, Ts-IAP, NAIP) portent une ou plusieurs copies du motif BIR (Baculovirus IAP Repeat) nécessaires pour lier et inactiver les caspases (64). Ils inhibent à la fois l'activité des caspases initiateuses et celle des caspases effectrices. De plus, certaines de ces protéines favorisent la fixation de l'ubiquitine ce qui induit leur dégradation ainsi que celle des caspases auxquelles elles sont liées (65). Ces inhibiteurs sont eux-mêmes contrôlés par les protéines SMAC/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with Low Pi) et OMI/HTRA2. Celles-ci sont libérées de la mitochondrie dans le cytoplasme, lors de l'apoptose, se lient aux IAP et les inhibent (66). Les chercheurs ont également développé des inhibiteurs peptidiques pour les caspases (67). Ces inhibiteurs sont basés sur la spécificité du térapeptide du site de reconnaissance du substrat de chaque caspase (68). L'introduction au niveau de l'extrémité C-terminale de ce térapeptide d'un groupement aldéhyde ou d'un groupement méthylcétone permet la synthèse d'un inhibiteur respectivement réversible ou irréversible (69). Ces inhibiteurs sont largement utilisés pour démontrer l'implication des caspases et de l'apoptose dans certains processus.

7. les mécanismes généraux de l'apoptose :

Il existe aujourd'hui plusieurs voies de signalisation aboutissant à l'apoptose. Les chercheurs ont classé ces voies signalétiques en trois principales voies. La première, est appelée voie intrinsèque. Elle met en jeu la mitochondrie et occupe une place centrale dans les mécanismes moléculaires de l'apoptose. La deuxième voie, connue aussi sous le nom de voie

des récepteurs de mort, est une voie extrinsèque initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires.

Ces deux voies de signalisation aboutissent à l'activation des caspases, famille de protéases ayant un rôle clef dans l'apoptose et, par conséquent, elles sont qualifiées de voies signalétiques dépendantes des caspases. Outre la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, le réticulum endoplasmique apparaît comme un compartiment cellulaire déclencheur de l'apoptose en cas de stress rigoureux (70).

7.1-La voie extrinsèque :

La voie extrinsèque est activée par une classe de récepteurs de la membrane plasmique appartenant à la super-famille des TNFR (tumor necrosis factor receptor).

La composition de ces récepteurs appelés récepteurs de mort (death receptors) Ces molécules se caractérisent par un nombre variable de domaines riches en cystéine CRDs, (cysteine rich domains) qui favorisent la liaison entre le ligand et le domaine trans-membranaire du récepteur. Ces récepteurs possèdent dans leur portion intracytoplasmique une région conservée, le domaine de mort DD, (death domain).Les ligands de ces récepteurs sont également des molécules trans-membranaires. L'interaction du ligand et de son récepteur nécessite la trimérisation de chacun d'entre-eux et un domaine extracellulaire fonctionnel distinct PLAD, (pre ligand-binding assembly domain).Le DD dépourvu de toute activité enzymatique permet le recrutement de protéines cytosoliques présentant un domaine homologue tel que FADD (Fas-associated death domain) qui comporte un motif aminoterminal appelé domaine « effector » de mort DED, Le DED interagit avec un motif homologue situé dans le prodomaine des caspases -8 ou -10. Cet assemblage est appelé DISC (death inducing signaling complex).

Le fonctionnement du DISC a été décrit pour la première fois lors de l'étude de la voie de signalisation FasL-Fas.(Fas Ligand), L'activation des caspases effectrices par Fas est différente selon les cellules. Dans les les cellules de type I (ex : thymocytes) la caspase- 8 peut activer directement caspase-3. Dans les cellules de type II (ex : hépatocytes) cette activation dépend du clivage de la protéine à domaine BH3 isolé Bid par la caspase-8. Le fragment c-terminal libéré, tBid, migre au niveau de la mitochondrie et provoque l'activation de Bax/Bak (BCL-2-Associated X Protein),(BCL-2-Antagonist/Killer) conduisant à la libération des molécules solubles proapoptotiques en particulier le cyt c qui va contribuer à la

formation de l'apoptosome et à l'activation de la cascade des caspases post-mitochondriales. Il existe également un DISC comportant une interaction DED-caspase-10. Dans ce cas, *in vitro*, caspase-10 se comporte de façon similaire à caspase-8 mais *in vivo*, il semble que caspase-10 ne puisse pas se substituer à caspase-8 pour induire l'apoptose.

La signalisation induite par TRAIL (TNF related apoptosis-inducing ligand) est similaire à celle décrite précédemment pour les cellules de type II. De plus, la libération mitochondriale de Smac/Diablo est indispensable pour bloquer l'effet inhibiteur de XIAP (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein).

La voie de signalisation pro-apoptotique induite par TNF est plus complexe. Il a été récemment démontré que l'induction de l'apoptose par TNF-R1 se déroule en deux étapes. La première implique la formation d'un premier complexe qui rapidement déclenche l'activation de NF-kappa B (Nuclear Factor of chain κ of B cells) ou JNK (Kinase de la partie N-terminal de la protéine c-jun). La deuxième étape consiste en une modification de ce complexe I suivie de sa dissociation du TNF-R1 pour former un deuxième complexe via la fixation du DD avec FADD. Ce complexe II conduit à l'apoptose sauf si le complexe I active NF-kappa B et ainsi produit une surexpression de l'inhibiteur FLIPL (71).

La protéine régulatrice la plus importante de la voie des récepteurs de mort est FLIP qui existe sous deux isoformes, l'une longue cFLIPL (cellular FLICE (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme)-inhibitory) et l'une courte cFLIPS. Ces isoformes contiennent des motifs DED et peuvent être recrutées au niveau du DISC.

Selon les cas elles vont entrer en compétition ou collaborer avec caspase-8. L'effet inhibiteur de FLIP est particulièrement important dans l'apoptose induite par TRAIL ou TNF. La protéine anti-apoptotique Bcl-xL (BCL-2 related Protein, Long Isoform) peut également inhiber la voie extrinsèque en supprimant la formation du DISC et l'activation de caspase-8. De plus, Bcl-xL provoquerait une sur-régulation de FLIP (72).

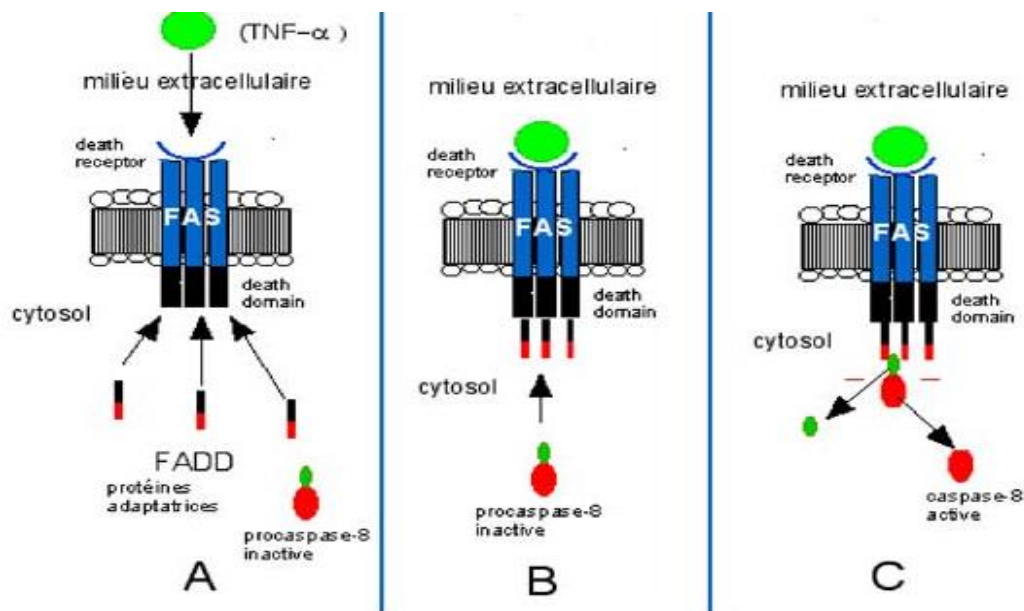


Figure 09 : A-C : cascade d'activation de l'apoptose extrinsèque (73).

Avant que le FASL ne se lie au FAS les 3 éléments identiques de celui-ci sont relativement éparpillés dans la membrane : c'est lors de la formation du complexe FAS/FASL (B) que la trimérisation

S'effectue suivie d'un appel de protéines adaptatrices pour former le FADD : ce dernier attire une procaspase 8 qui est active et libérée dans le cytosol (c)(73).

7.2. La voie intrinsèque : voie mitochondriale :

7.2.1. La mitochondrie :

7.2.1.1. Le rôle physiologique de la mitochondrie :

La mitochondrie est un organe cellulaire majeur constitué d'une membrane externe, d'un espace intermembranaire, d'une membrane interne et d'une matrice. La mitochondrie joue un rôle primordial dans la physiologie de la cellule en générant l'énergie nécessaire à toutes les réactions biochimiques de la cellule. Cette énergie dérive de la production d'ATP par phosphorylation oxydative au sein de la chaîne respiratoire. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne de la mitochondrie génère un gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire et crée ainsi un $\Delta\psi_m$ (potentiel transmembranaire mitochondrial). Le retour des protons dans la matrice ne

peut se produire qu'au niveau de passages spécifiques constitués par l'ATP synthétase. L'ATP formé est ensuite transporté par l'adénine nucléotide translocase (ANT) dans l'espace intermembranaire en échange d'une molécule d'ADP. Puis l'ATP passe dans le cytosol au travers de canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC) (74).

7.2.1.2. Le rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire :

Mis à part son rôle dans la production d'ATP, la mitochondrie joue un rôle important dans la régulation des mécanismes moléculaires de l'apoptose. En effet, de nombreux changements biochimiques surviennent au niveau des mitochondries suite aux stimuli engendrant un stress ou un dommage cellulaire, que ce soit à la suite d'un choc thermique ou osmotique, des radiations ionisantes, ou d'un sevrage en cytokines (75). Parmi ces changements, on cite la perméabilisation de la membrane mitochondriale, accompagnée dans la plupart des cas d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial (ψ_m) et de l'ouverture des mégapores mitochondriaux (76).

Cette altération est considérée comme le point de non-retour du processus apoptotique. La perturbation du potentiel membranaire mitochondrial a pour principales conséquences l'altération de la production d'ATP et le relargage de plusieurs substances de l'espace intermembranaire vers le cytosol (77).

7.2.1.3. Protéines de la famille Bcl-2 :

Cette famille de protéines, composée d'une vingtaine de membres chez les mammifères, peut être divisée en trois groupes. Leur point commun est la présence, au sein de leur structure, d'au moins un domaine BH (« Bcl-2 homology ») dont il existe quatre types (BH1 à BH4). Le premier groupe est constitué des protéines de survie (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 et A1/Bfl1) qui toutes contiennent trois à quatre domaines BH, le domaine BH4 étant une région hydrophobe carboxyterminale permettant leur ancrage dans la membrane d'organites intracellulaires comme la mitochondrie, le réticulum endoplasmique (RE) et le noyau. Le second groupe est composé des protéines pro-apoptotiques Bax, Bak et Bok qui contiennent deux à trois domaines BH.

Le troisième groupe comprend au moins huit protéines ne contenant qu'un seul domaine d'homologie, le domaine BH3 d'où leur nom de protéines à BH3 isolé ou « BH3-only protein, BOP ».

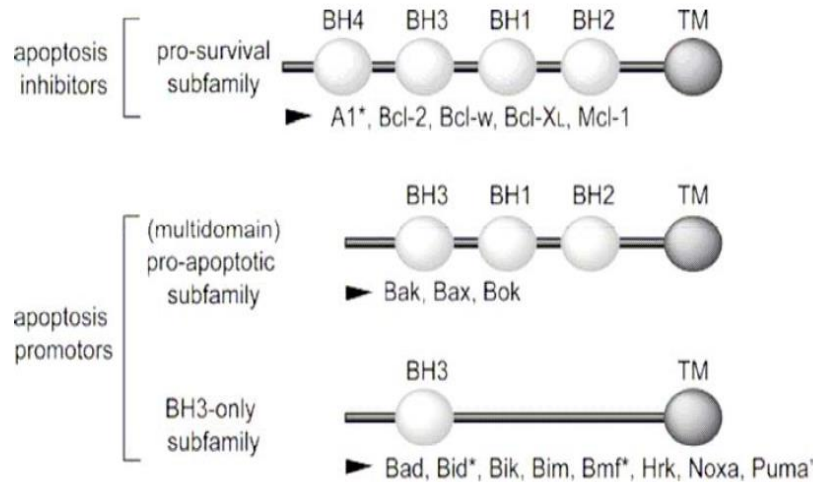


Figure (10): classification des proteines de la famille BCL -2 (78).

L'induction de l'apoptose *via* les protéines de la famille Bcl-2 débute par l'activation des protéines à BH3 isolé (78). Dans des conditions normales, les protéines à BH3 isolé sont soit faiblement exprimées dans le cytoplasme soit y demeurent inactives. Une protéine à BH3 isolé répond à un type de stimulus précis et va être activée soit par modification post-traductionnelle (Bad, Bid, Bim, Bmf) soit par induction transcriptionnelle (Noxa, Puma, Hrk). Cette activation est suivie par une translocation au niveau de la mitochondrie. A ce niveau, les interactions avec les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques à domaines multiples de la famille Bcl- 2 produisent soit une neutralisation des protéines de survie (c'est le cas de Bad ou Bik) soit une activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (tBid) (79). A l'état normal, les protéines Bax et Bak existent sous forme monomères, la première dans le cytoplasme sous une forme stable et soluble interagissant avec des protéines antiapoptotiques (Ku70, humanin, 14-3-3θ) (80). La deuxième dans la membrane mitochondriale externe où elle serait sequestrée par Bcl-xL et Mcl-1 (79).

L'activation de Bax, en particulier par tBid qui possède une action directe sur (80),résulte en son insertion dans la membrane mitochondriale externe. Celle de Bak se produit grâce à la neutralisation de Mcl-1 et Bcl-xL par respectivement Noxa et Bad (79). Il s'ensuit une oligomérisation des deux protéines Bax et Bak. Les multimères forment des pores à la surface externe de la mitochondrie (81).

7.2.1.4. Le pore de perméabilité transitoire (PPT) :

L'ouverture de ce pore serait associée à la diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial (82). résultant en une entrée massive d'eau et d'ions, provoquant un gonflement suivi d'une rupture de la membrane externe mitochondriale et de la libération des protéines apoptogènes. L'ouverture et la fermeture de ce pore seraient, entre-autres, régulées par les membres de la famille Bcl-2 (83).

7.2.1.5. La formation de canaux ioniques non spécifiques :

Plusieurs hypothèses retenues à l'heure actuelle suggèrent que ces protéines subissent des réarrangements structuraux au niveau de la membrane mitochondriale pour former des hétéro- ou des homodimères capables de former des pores membranaires, soit seuls, après oligomérisation, soit en association avec d'autres protéines telles que la porine mitochondriale (Connue également sous le nom de canal anionique voltage-dépendant VDAC) ou l'adénine nucléotide translocase (ANI). En effet, au cours de l'apoptose, suite au clivage de Bid, sa forme tronquée (tBid) est connue pour interagir avec Bax et le libère de son interaction avec Bcl-2 ou Bcl-xL. Ceci induit un changement de conformation de Bax, sa translocation et son oligomérisation dans la membrane externe de la mitochondrie. tBid peut également transloquer à la mitochondrie et activer Bak, induisant son oligomérisation dans la membrane mitochondriale. Bax et Bak forment alors des canaux hétérotétramériques à travers lesquels le cytochrome c peut être relargué dans le cytosol. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, tels que Bcl-2 et BclxL, inhibent le changement de conformation et l'oligomérisation de Bax et de Bak. Les membres pro-apoptotiques à unique domaine BH3 tels que Bad, Bim, Bmf et Noxa interagissent avec Bcl-2 et Bcl-xL, inhibant leur fonction protectrice et pouvant même les convertir en membres pro-apoptotiques (83). Donc La perméabilisation de la membrane mitochondriale pourrait résulter de l'ouverture du ppt, un complexe multi-protéique situé aux points de contact entre la membrane externe et interne de la mitochondrie. Il s'agit d'un complexe formé de la porine mitochondriale (VDAC, canal anionique voltage dépendant) localisée à la membrane externe, du translocateur de l'adénine (ANT) localisée à la membrane interne et de la cyclophiline D se trouvant dans la matrice. VDAC et ANT peuvent former des pores non-spécifiques et s'ouvriraient suite à l'action d'effecteurs pro-apoptotiques (tels que le Ca²⁺, les radicaux libres (ROS) ou Bax). Cette ouverture provoquerait la dissipation du (ψ_m) et une perméabilité de la membrane interne aux molécules inférieures à 1500 daltons (84).Figure (11).

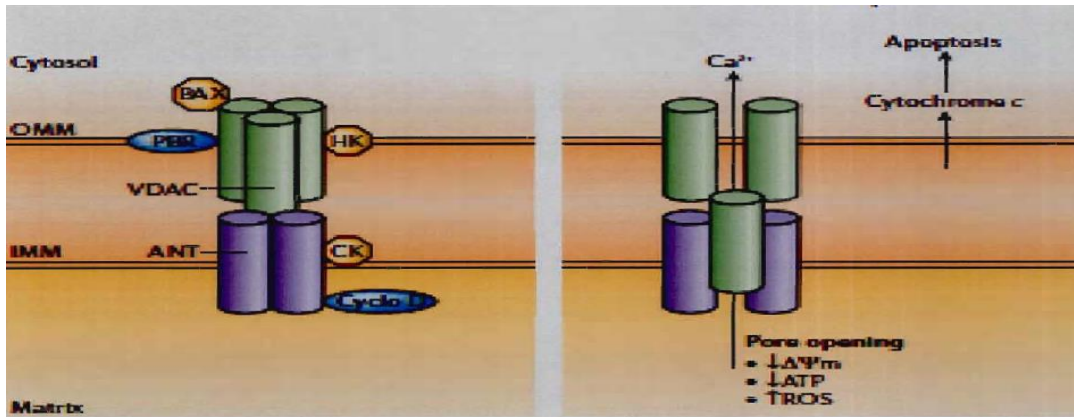


Figure (11) : Représentation schématique de l'ouverture des pores de transition de perméabilité ppt (84).

7.2.1.6. Molécules d'origine mitochondriale :

Parmi les molécules libérées, la plupart sont impliquées dans l'activation des caspases post-mitochondriales. La première à avoir été identifiée est le cytochrome c (cyt c).

•Le cytochrome c :

Le cyt c est une hémoprotéine liée à la cardiolipine (CL) qui intervient dans le transport des électrons de la chaîne respiratoire entre les complexes III et IV mais aussi dans l'inhibition de la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Lors de l'apoptose, la peroxydation de la CL conduisant à une perte d'affinité avec le cyt c expliquerait la libération massive et rapide du cyt c (85).

Libéré dans le cytosol, le cyt c interagit, en présence d'ATP (et plus efficacement encore en présence de deoxyATP), avec Apaf-1 (« apoptosis proteaseactivating factor-1 ») une protéine comportant un domaine CARD, modifiant sa conformation et favorisant son oligomérisation. Le domaine CARD de chaque molécule d'Apaf-1 réagit avec le domaine CARD de la pro-caspase 9 pour former un complexe nommé apoptosome Figure (12). Au sein duquel la caspase-9 est activée. L'activation du caspase-9 conduit à l'activation en cascade des caspases-3 et -7 (86).

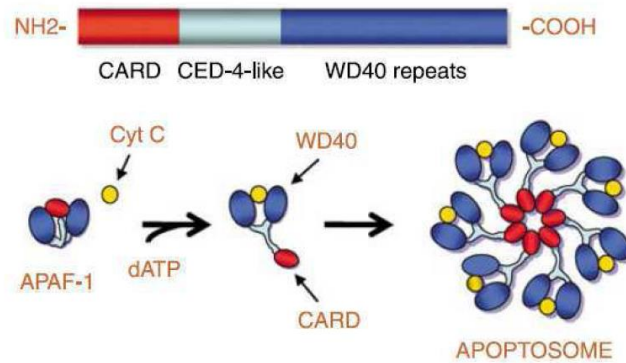


Figure (12): l'assemblage de l'apoptosome (74).

• **Smac/DIABLO :**

Smac/DIABLO est une protéine mitochondriale libérée lors de l'apoptose. La libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome ne sont pas les seuls mécanismes aboutissant à la cascade des caspases. Cette protéine, synthétisée sous la forme d'un précurseur de 29 Kda, transloque dans la mitochondrie par son domaine Nterminal qui possède un signal de localisation mitochondriale. Il est ensuite clivé pour donner naissance à une protéine mature de 23 Kda. En réponse à différents stimuli apoptotiques, la protéine Smac/DIABLO mature est relarguée dans le cytosol où elle agit comme un inhibiteur des IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins). Les IAPs cellulaires ont pour rôle de bloquer l'activation des pro-caspases et d'inhiber l'activité des caspases matures. Sous forme de dimères, Smac se lie aux IAPs, empêchant leur liaison aux caspases et ainsi leur inactivation (87).

• **Omi/HtrA2 :**

Omi/HtrA2 a été identifié comme un nouvel inhibiteur des IAPs. Cette protéine est un précurseur de 49 Kda. elle migre vers la mitochondrie où son signal de localisation mitochondriale est clivé pour donner naissance à une protéine mature de 37 Kda. HtrA2 fait partie de la famille des protéases, Cette protéine est confinée dans l'espace intermembranaire mitochondrial et suite à l'action de facteurs comme la staurosporine, TRAIL (TNF-related apoptosisinducing ligand) ou les ultra-violets, elle est relarguée dans le cytoplasme, où elle se lie aux IAPs comme Smac/DIABLO facilitant l'activation des (87).

•L'AIF :

L'AIF a été identifié en 1996 par l'équipe de Susin. La protéine AIF est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 67 Kda constitué de trois domaines protéiques : la région N terminale qui contient un domaine de localisation mitochondriale, une séquence centrale et un domaine C-terminal homologue des NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) oxydoréductases bactériennes, portant deux domaines de localisation nucléaire, Une fois le précurseur introduit dans la mitochondrie, il est clivé et libère son domaine N-terminal donnant naissance à la protéine mature : une flavoprotéine de 57 Kda. Cette flavoprotéine à une fonction duale de NAD(P)H oxydase et monodéhydroascorbate réductase mitochondriales, et de facteur apoptogène. Son activité oxydoréductase n'est pas essentielle à sa fonction apoptotique (88).Après un stimulus apoptotique, l'AIF est libéré par la mitochondrie, transloque dans le noyau des cellules en apoptose et induit une condensation de la chromatine et un clivage de l'ADN en fragments de hauts poids moléculaires (50 Kpb) (87).

• Endo G :

Endo G est une endonucléase mitochondriale codée par le génome nucléaire et son rôle principal est d'être impliqué dans la réplication du génome mitochondrial. Durant l'apoptose de cellules de mammifères, elle est relarguée par la mitochondrie puis transloque dans le noyau. Elle digère l'ADN nucléaire en absence d'activation par les caspases. (89). ont démontré que l'Endo G est responsable, d'une part du clivage internucléosomal aboutissant à la formation des « ladders » dans des noyaux isolés, et d'autre part de l'obtention de fragments d'acides nucléiques de hauts poids moléculaires. Dans le noyau, elle pourrait agir de concert avec la DNase I ou avec l'héxonucléase. Ainsi l'action combinée de l'Endo G et de l'AIF, tous deux relargués par la mitochondrie, est un mécanisme totalement indépendant des caspases (90).

• Les caspases-2, -3, -8 et -9 :

Les caspases-2, -3, -8 et -9 sont aussi reconnues comme étant des protéines apoptogènes relarguées par la mitochondrie durant le processus apoptotique (90).

7.2.2. Rôle de p53 dans la voie intrinsèque :

p53 joue un rôle majeur dans l'apoptose induite suite à aux dommages irréparables de l'ADN produits par les agents cytotoxiques. p53 subit des modifications post-transcriptionnelles en réponse à la voie de signalisation des oncogènes ou en réponse au stress génotoxique. Ceci permet une stabilisation de la protéine qui s'accumule dans le noyau et régule l'expression de gènes cibles. De nombreux gènes sont régulés par p53 en particulier ceux encodant pour certaines protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax, Bid, Noxa et PUMA. Parallèlement, la protéine p53 a été trouvée dans le cytoplasme où elle peut activer Bax (91).p53 joue également un rôle inducteur pour Apaf-1 et un rôle répresseur pour Bcl-2 (92).

8. La famille BCL-2 :

La protéine BCL-2 (B-Cell Lymphoma Protein 2) a d'abord été identifiée comme proto-oncogène dans les lymphomes B folliculaires, où une translocation chromosomique conduit à une expression constitutive de ce gène. Puis, il a été montré que cet oncogène était responsable d'une inhibition de l'apoptose plutôt que d'une activation de la prolifération cellulaire (93).

8.1. Role de la famille Bcl-2 :

La famille Bcl-2 est un ensemble de protéines qui jouent un rôle important dans l'apoptose. Elles sont nombreuses et sont localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale, du réticulum endoplasmique ou de la membrane nucléaire grâce à leur séquence transmembranaire carboxyterminale (94).

8.2-Structure de la famille Bcl-2 :

Les protéines de la famille BCL-2 contiennent de 1 à 4 régions distinctes d'homologie, qui sont connues sous le nom de domaine BH (Bcl-2 Homology) (95). La famille BCL- 2 peut être divisée en deux groupes, selon leurs fonctions :

Les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 possèdent chacun 2 ou 4 domaines BH distincts. Les membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 peuvent être subdivisés au moins en 2 groupes : les *BAX/BAK-like* contenant 2 ou 3 domaines BH et les *BH3-only* protéines. L'une de ces protéines BH3-only, BIM (BCL-2-interacting mediator of cell death), possède plusieurs formes issues d'épissage alternatif de l'ARNm BIM, mais conservant entre elles le domaine BH3.

Trois formes majeures BIMEL (Extra-Long), BIML (Long) et BIMS (Short) sont les plus étudiées (96). Récemment, des formes additionnelles ont été décrites et sont estimées à plus de 18 variants d'épissage (97).

- un groupe anti-apoptotique (pro-survie) qui contient BCL-2, BCLXL, BCLW (BCL-2 like 2 Protein), A1, MCL1 (myeloid-cell leukaemia sequence 1) et BOD (BCL-2 homologue of ovary), chacun possédant les 4 domaines BH, sauf MCL1 (qui a seulement 2 domaines BH).
- un groupe pro-apoptotique pouvant être subdivisé au moins en deux groupes, selon leurs structures et leurs fonctions : BAX, BOK, BCLXS (BCL-2 related Protein, Short Isoform) et BAK (qui contiennent chacun 2 ou 3 domaines BH distincts) et les protéines *BH3-only* : BAD (BCL-2 Antagonist of cell Death),BIK (BCL2 Interacting Killer), BID, HRK, BIM, NOXA (BH3-only member of the Bcl-2 family), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) et BMF (a BH3 only protein), qui n'ont en commun qu'un domaine, qui est le domaine BH3.

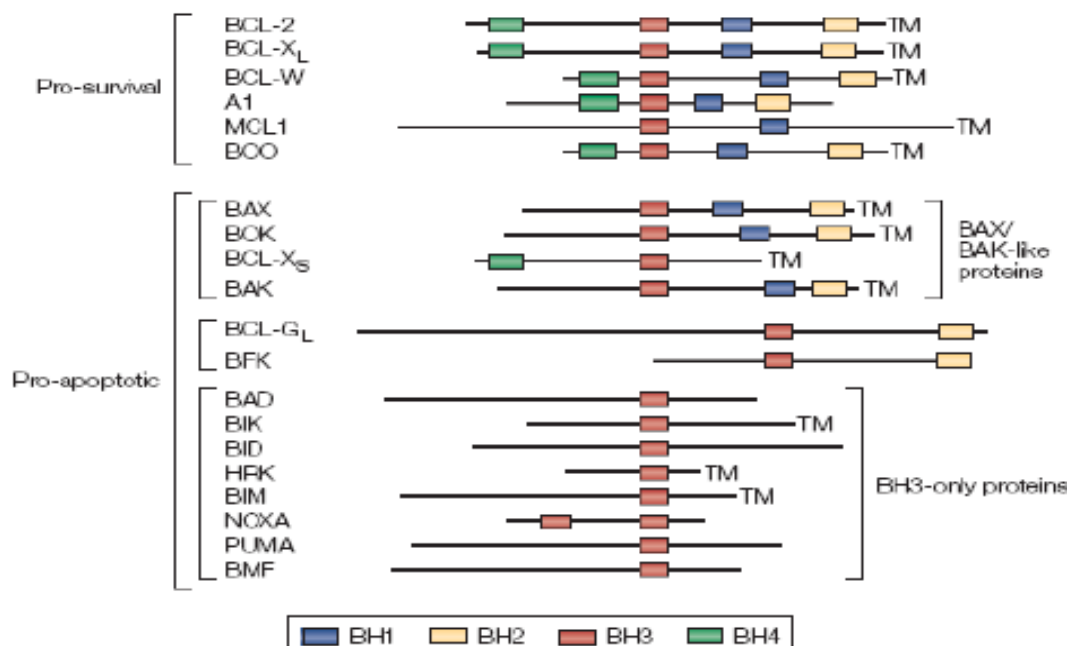


Figure (13): Membres de la famille BCL-2 (98).

8.3- Spécificité de la famille Bcl-2 :

Le rapport entre le niveau des protéines pro et anti-apoptotiques semble déterminer la sensibilité de la cellule à l'apoptose (99). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL

exercent leur effet antiapoptotique en partie par leur liaison à la protéine proapoptotique Bax au niveau de leurs domaines BH1, BH2 et BH3. Une telle interaction prévient la libération du cytochrome C, essentiel pour la formation de l'apoptosome et pour l'activation des caspases. D'autre part, l'emplacement sur la membrane externe du RE ou de la mitochondrie de certains membres de la famille Bcl-2, entre autre Bax et Bim, Puma et Noxa, leur permet de jouer un rôle de canaux ioniques régulant le flux calcique (100). Pour certains membres de la famille Bcl-2, notamment Bad et Bim, la phosphorylation est un facteur déterminant dans la régulation de leur activité proapoptotique.

8.4-Activation de la famille BCL-2 :

Les protéines *BH3-only* sont pro-apoptotiques et fonctionnent comme détecteurs des signaux pro-apoptotiques qui peuvent émaner de processus cellulaires variés. Il semble que dans les cellules de mammifères, les protéines *BH3-only* sont maintenues inactives par des mécanismes transcriptionnels et traductionnels empêchant ainsi une mort inappropriée (101). Leur activation peut se faire soit par induction transcriptionnelle, soit par modification post-traductionnelle, tandis que l'inactivation se fait soit par séquestration dans le cytosquelette ou encore par protéolyse. Les protéines anti-apoptotiques pourront aussi être régulées par ces mécanismes pour promouvoir la survie ou la mort cellulaire : BCL_{XL} peut être induit d'une manière transcriptionnelle par les facteurs de croissance via la voie JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription) (102) ; alors que MCL-1 est dégradé par la voie ubiquitine-protéasome en réponse à la privation de cytokines (103).

8.5-Régulation de la famille BCL-2 :

Pour éviter une induction de l'apoptose dans les cellules normales, les protéines de la famille BH3, exprimées constitutivement, sont maintenues dans une forme inactive par divers mécanismes. Par exemple, BIM et BMF sont séquestrés au niveau du cytosquelette par interaction avec la dynéine et suite à un signal de mort, ils sont libérés dans le cytoplasme (104). BAD, quant à lui, est phosphorylé et va être fixé par la protéine 14-3-3 qui empêche son action. Un troisième mécanisme de régulation est l'expression d'un précurseur inactif qui nécessite pour son activation un clivage protéolytique. C'est le cas de BID, dont le clivage libère la forme active tBID. Certaines protéines de la famille BCL-2 sont aussi régulées transcriptionnellement. L'expression de BAX, NOXA et PUMA peut être induit par p53

(105). De même, HRK/DP5 est contrôlé transcriptionnellement suite à une absence de facteurs de croissance (106).

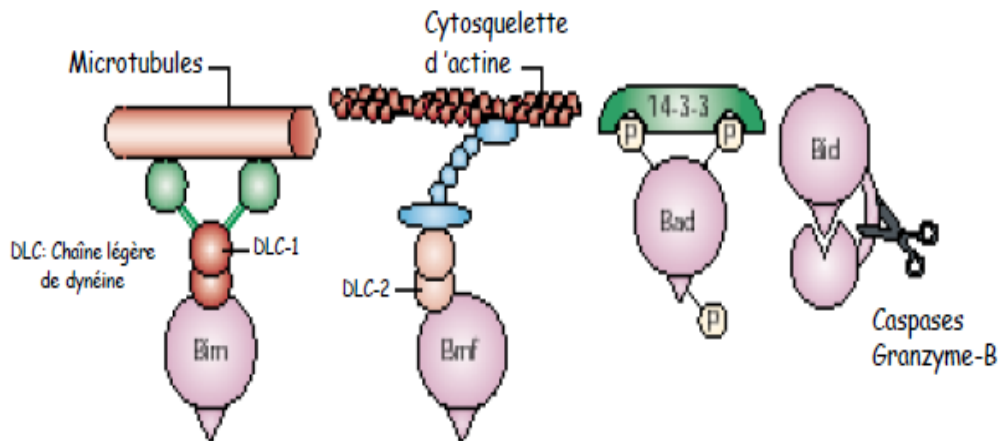


Figure (14) : Régulation des protéines BH3 (107).

BIM interagit avec la chaîne légère de la dynéine DLC1 et est séquestré au niveau des microtubules tandis que BMF est lié au cytosquelette d'actine par interaction avec DLC2. BAD est séquestré suite à sa phosphorylation, par 14-3-3 et son activation nécessite sa

déphosphorylation. BID est inactif jusqu'à son clivage protéolytique par les caspases ou par Granzyme-B (107).

9. Protéines régulatrices de l'apoptose :

Plusieurs autres protéines et facteurs participent à la régulation de l'apoptose et, par conséquent, elles peuvent être à l'origine des maladies liées à une déficience de l'apoptose. La protéine AIF (Facteur inducteur de l'apoptose), la protéine c-Flip (Cellular FLICE (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme)-inhibitory), les protéines inhibitrices de l'apoptose IAPs (Inhibiteurs des protéines apoptotiques), la protéine Smac/Diablo (Facteur de liaison directe aux protéines IAP à faible p_i) et les protéines IAPs, sont des facteurs impliqués dans la régulation des différents stades de l'apoptose (108).

9.1. La protéine inductrice de l'apoptose (AIF) :

La protéine AIF joue un rôle décisif dans les processus d'apoptose indépendante des caspases et elle est remarquablement impliquée dans la mort apoptotique embryonnaire. C'est une flavoprotéine de 57 kDa (kilo Dalton) qui possède à la fois des séquences de localisation mitochondrial (MLS) et nucléaire (MLS). Dans les conditions physiologiques normales, AIF est localisée au niveau de l'espace intermembranaire des mitochondries. Sa libération dans le cytoplasme et sa migration dans le noyau suite aux stimuli apoptotiques sont connues responsables de la condensation de la chromatine et la dégradation de l'ADN à grande échelle. Il a été également démontré qu'AIF joue son rôle pro-apoptotique en causant la libération des protéines apoptogéniques localisées au niveau de la mitochondrie (109).

9.2. Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) :

Cinq homologues de la famille des IAPs ont été identifiés: cIAP1 (Cellular-IAP) / HIAP-2/hMIHB, NAIP, cIAP2/hiap-1/hMIHC, XIAP/hILP et la survivine (110). Ces inhibiteurs interviennent à différents niveaux dans la cascade apoptotique en bloquant aussi bien la maturation des caspases initiateuses que celle des caspases effectrices. Ainsi, XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 inhibent-elles les caspases 3, 7 et 9 mais pas les caspases 1, 6 et 8 (111). La structure des IAPs, à l'exception de la survivine, est caractérisée par la présence de 3 domaines BIRs (pour baculovirus IAP repeats) dans leur partie aminotermine et d'un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de zinc dans leur partie carboxyterminale. La survivine, par contre, ne contient que les domaines BIRs. Différentes études ont montré que seul BIR2 était requis pour inhiber les caspases 3 et 7 et que le domaine RING n'était pas nécessaire (112). De plus, il semble que cIAP-1 et cIAP-2 puissent se lier aux facteurs associés au TNF-RI (Tumor Necrosis Factor Receptor 1), entre autres TRAF-1 et 2 (TNF receptor associated factor-2), grâce à leur motif BIR (113).

9.3. FLIP :

L'étape de formation du DISe peut être régulée par la protéine Flip (FLICE Inhibitory Protein) qui possède deux domaines effecteurs de mort (DED) mais aucun site catalytique actif. Son rôle consiste à inhiber l'activation de la caspase 8 par compétition. En effet, grâce à ses domaines de mort (DED), Flip peut se fixer aux prodomaines des pro-caspases 8,

empêchant ainsi leur recrutement aux récepteurs de mort tels que Fas (Fas Ligand) ou TNF-R1 (114).

10. Apoptose induite par les drogues :

Les drogues anticancéreuses ciblent essentiellement les cellules en induisant l'apoptose. La résistance à l'apoptose est responsable de la diminution de la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents de stress (115). Les cibles cellulaires des différents agents cytotoxiques sont diverses et variées. En effet, les agents anticancéreux sont classés en : agents d'endommagement de l'ADN (cyclophosphamide, cisplatine, doxorubicine), des anti-métabolites (méthotrexate, 5-fluorouracile), des inhibiteurs mitotiques (vincristine), des analogues nucléotidiques (6-mercaptopurine), ou des inhibiteurs des topoisomérases (étoposide) (116).

p53 est un élément clé dans la réponse aux stress cellulaires tels que ceux induits par la chimiothérapie ou l'irradiation. En effet, ces types de stress agissent en stabilisant et activant p53, soit d'une manière directe par inactivation de MDM2 (Murine Double Minute 2), une protéine qui lie et séquestre p53 dans le cytoplasme. Soit d'une manière indirecte en activant p19ARF (p19 alternative reading frame protein) qui va se fixer sur MDM2 pour l'inactiver (117).

De plus, plusieurs types de modifications posttraductionnelles peuvent induire l'activité transcriptionnelle de p53, en réponse à ces stress cellulaires. p53 active peut alors induire l'expression de protéines impliquées dans la voie mitochondriale – telles que BAX, NOXA, PUMA et p53AIP1 - et dans la voie de récepteurs de mort – telles que CD95, TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5), (Death Receptor 4,5) (118).

NFκB peut être aussi activé par des agents chimio-thérapeutiques. Ces drogues inhibent les protéines IκB (par phosphorylation ou ubiquitylation, suivie de dégradation), pour libérer les protéines NFκB, lesquels transloquent vers le noyau pour activer l'expression des récepteurs de mort et de leurs ligands tels que CD95 et CD95-L (119), TNF-α (Tumor Necrosis Factor alpha) et les récepteurs TRAIL, DR4 et DR5 (120).

11. Les gènes impliqués dans l'apoptose :

Les caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose résultent de l'activation de mécanismes cellulaires complexes. Les différents gènes contrôlant ces

mécanismes ont d'abord été identifiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), dont une partie des cellules est éliminée par apoptose durant le développement.

L'analyse génétique de ces cellules a permis de mettre en évidence trois gènes clés impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée : *ced-3*, *ced-4* et *ced-9*, *ced* pour *C. elegans death* (121). Les produits des gènes *ced-3* et *ced-4* sont requis pour le déroulement de l'apoptose, la protéine CED-3 étant une protéase et la protéine CED-4 une molécule pro-apoptotique pouvant se lier à CED-3.

Par contre, la protéine codée par *ced-9* a une fonction antagoniste à CED-3 et CED-4 et inhibe l'apoptose. Des homologues de ces gènes, ayant des rôles similaires dans la régulation de l'apoptose, ont été découverts chez les mammifères. Ainsi, l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 β (ICE) des mammifères présente des homologies avec CED-3 et sa sur-expression est capable d'induire l'apoptose dans les cellules de mammifères (122). Bien qu'elle ne semble pas jouer de rôle primordial dans l'apoptose et qu'elle soit plutôt impliquée dans le déroulement du processus inflammatoire, la protéine ICE a permis d'identifier une famille de protéases à cystéine, les caspases, qui sont responsables de l'exécution du processus apoptotique chez les mammifères.

De même, les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2, homologues de CED-9, sont des régulateurs de l'apoptose, ainsi que la protéine adaptatrice Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1), homologue de CED-4, qui intervient dans l'activation des caspases (123).

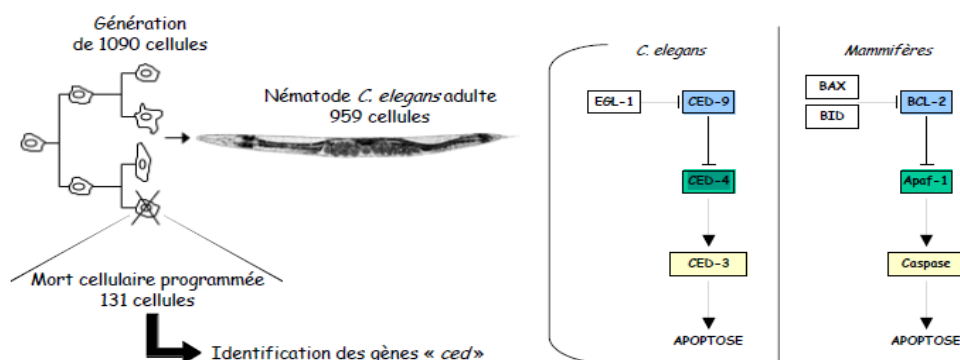
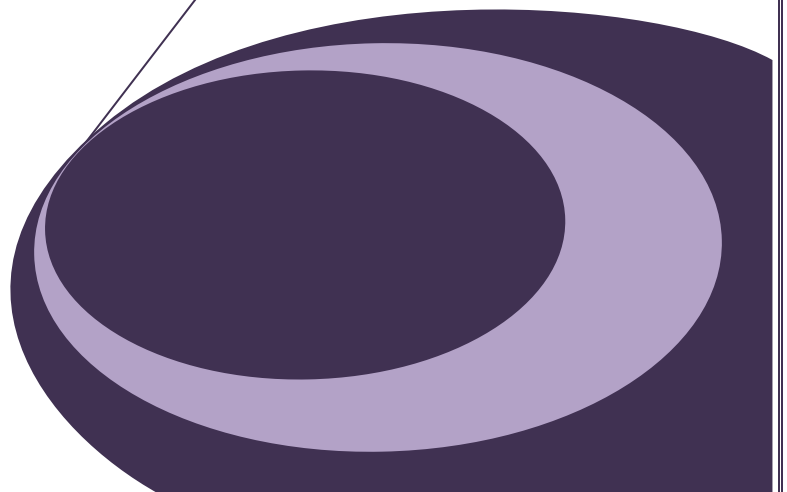
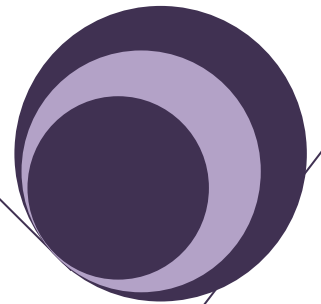
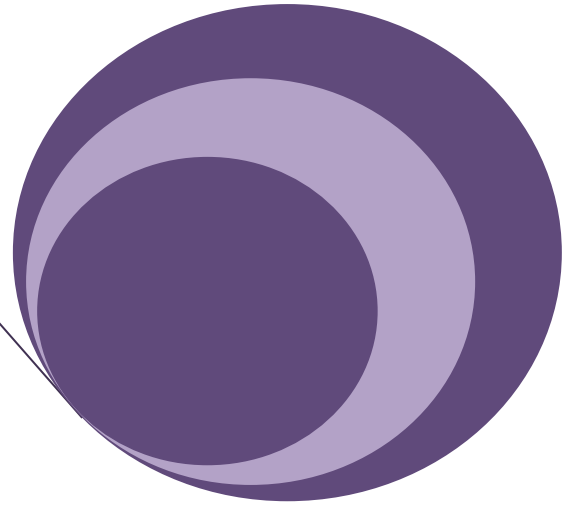


Figure 15 : Apoptose chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et homologie avec les mammifères (124).

Au cours du développement de *C. elegans*, 1090 cellules sont générées. Parmi ces cellules, 131 vont être éliminées par mort cellulaire programmée. Le ver « adulte » sera alors constitué de 959 cellules. La sélection par mutagenèse chimique de larves présentant des défauts d'élimination des cellules pendant le développement a permis l'identification des gènes *ced* (*C. elegans death*). Des homologues de ces gènes ont également été découverts chez les mammifères (124).

CHAPITRE N : 2
Détection d'apoptose



I. INTRODUCTION :

L'apoptose peut être mesurée par de nombreuses méthodes, cytométrie de flux, migration en gel d'agarose (échelle d'ADN), immunohistochimie, Western Blot, dosage d'activités enzymatiques (caspases). Quelques techniques sont couramment employées (125).

1. Détection de la caspase 3 par western blot:

1.1. Principe :

L'activation des caspases est sans doute le cachet biochimique de l'apoptose. Il y a plusieurs manières de détecter l'activation de caspase. Caspases sont une famille des protéases de cystéine qui clivent leurs substrats à partir des résidus d'aspartate. Existants comme zymogènes (également appelés les procaspases) dans les cellules non stimulées, les caspases sont activés par le clivage du zymogène pour former les grandes et petites sous-unités, qui forment à leur tour un complexe de hétérotétramère.

Ainsi, l'activation des caspases peut être déterminée par Western blot en utilisant des anticorps anti-caspase et d'examiner si le zymogène est converti en forme active clivée. En conclusion, le statut d'activation de caspase peut également être déterminé par l'examen de clivage des substrats endogènes, tels que la polymérase (d'ADP-ribose) (PARP) (126).

1.2. Procédures générales :

1.2.1 : détection de clivage de caspase et clivage de substrat par western blot :

Des cellules subissant l'apoptose sont cultivées et lavées dans PBS (Phosphate Buffer Saline).froid. Le cytosol peut être préparé par un certain nombre de méthodes différentes. Cependant, pour détecter le clivage de substrat de caspase, la façon la plus efficace est de lyser la cellule dans une solution contenant l'urée de 4 M, le glycérol de 10%, le sulfate dodécylque de sodium de 2%(SDS),(Sodium-Dodecyl-Sulfate), 0.003% bromophénol et 5% 2-ME (ajoutés immédiatement avant analyse) (127).

Les protéines sont séparées par une électrophorèse standard de gel de polyacrylamide de (SDS-PAGE) sulfate dodécylque de sodium suivi par Western blot avec des anticorps spécifiques contre la grande ou la petite sous-unité de la caspase d'intérêt, (Les caspases

généralement examinés sont caspases-3, -7, -8, et -9). En alternance, on utilise des anticorps contre les substrats de caspases tels que la PARP, (qui est clivé à partir de 116 kDa à 85 kDa pendant l'apoptose). (128).

1.2.2. Mesure des activités de caspase en utilisant des substrats synthétiques :

Le site de reconnaissance de caspase est composé d'une séquence de térapeptide qui diffère d'un type de caspase à l'autre.

Par exemple, les caspases -3 -6 et -7 sera principalement reconnaître le motif de Asp- Glu- Val- Asp ou DEVD, alors que caspases -8, -9 et -10 reconnaîtront la séquence d'Ile- Glu -Thr- Asp ou IETD. Caspases -1, -4 et -5 reconnaîtra la séquence térapeptide de WEHD ou YVAD (Tyrosine-Valine-Alanine-Aspartate).

Ces térapeptides peuvent être synthétisés et conjugués par un nombre d'opérations, chaque térapeptide est clivé par le caspase correspondant. L'activité des caspases mesurée est proportionnelle à la quantité de térapeptides réalisée à la fin de l'opération.

Les groupes d'opérations les plus couramment utilisés comprennent le (p -nitroanilide) PNA, détection colorimétriques par l'absorbance à 405-410 nm), le (7- amino-4- méthylcoumarine) AMC, détection fluorimétrique par excitation /émission de longueur d'onde de 380 et 460 nm, respectivement) et de (7- amino-4- trifluorométhyl coumarine) AFC, détection fluorimétrique à 405 et 500 nm, respectivement, ou détection colorimétrique à 380 nm).

pour Mesurer l'activité de caspase, les cellules sont tout d'abord lysées dans un tampon de dosage de caspase (20 mM de PIPES, 100 mM de NaCl, 10 mM (dithiothreitol) DTT, 1 mM d'EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), Acide éthylène diamine tétra-acétique), 0,1 % de CHAPS, 10 % de saccharose, pH 7,2) (128).

Environ 20 à 50 µg de protéines sont utilisées dans chaque essai, mélangé avec 20 à 50 µM de substrats de caspase dans un volume d'environ 200 µl. La réaction est surveillée par détection fluorimétrique ou colorimétrique à des longueurs d'onde spécifiques. Les valeurs reflètent l'activité de la caspase relative, qui peut être converti en activité spécifique avec les normes appropriées.

1.2.3. Mesure de l'activation de caspase par immunoloration ou avec substrats fluorescents dans les tissus et cellules :

Pour détecter l'activation de caspase dans un emplacement anatomique spécifique, on peut effectuer immunohistochimie ou immunofluorescence sur des coupes de paraffine fixés au formol avec des anticorps spécifiquement contre les caspases activées, qui ciblent généralement les sous-unités, mais pas le zymogène.

Les anticorps dirigés contre les caspases activées, -3 -7 et -9 sont maintenant disponibles dans le commerce .La procédure ne diffère pas de l'immunocoloration générale .L'anticorps primaire est le caspase anti- activation et de l'anticorps secondaire peut être soit conjugué à la (horse radish peroxydase) (HRP) ou un fluorophore soit pour la détection histochimique ou la détection par fluorescence. Il est possible de colorer doublement la section avec un anticorps spécifique de la cellule pour déterminer le type de cellules en cours de l'apoptose et donc contenir les caspases activées **(129)**.

Un bon exemple d'une telle application peut être trouvé dans réf **(129)**. Pour détecter l'activation des caspases dans les cellules cultivées , autre que Western blot , on peut aussi profiter récemment de plusieurs mises au point des substrats fluorescents cellulaires perméables Un tel substrat avec le nom de commerce de PhiPhiLux (Oncogene Research Products , CA) est un peptide de 18 acides aminés , avec les motifs de reconnaissance de caspase dans le centre , et deux fluorophores fixés de manière covalente à proximité du terminus Les deux fluorophores étanches l'autre dans la molécule native en raison des interactions intramoléculaires jusqu'à ce que hydrolyse de caspase coupe la liaison peptidique.

Ainsi, les substrats fluorescents en réponse à l'activation de caspase **(130)**.

Parce que ces produits sont des cellules perméables, ils peuvent marquer les cellules subissant l'apoptose, qui peuvent être rapidement identifiés et quantifiés par microscopie à fluorescence ou cytométrie d'écoulement. Il est possible de colorer doublement la cellule pour obtenir des informations supplémentaires sur la nature des cellules positives.

-l'activation de la caspase est principalement déterminée par le clivage du zymogène et par la mesure des activités protéolytiques, En combinant les méthodes d'identification appropriées **(126)**.

-on peut non seulement détecter l'activation de caspase qualitativement et quantitativement, mais aussi de manière spécifique des tissus ou des cellules **(126)**.

- Cependant, il est important de noter que les substrats synthétiques utilisés pour mesurer les différentes activités de caspases ne sont pas absolument spécifique pour un type particulier de caspase **(126)**.

- Ainsi DEVD - AFC peut détecter les activités de caspase serait mieux décrit comme activités DEVDase , qui pourraient inclure ceux des caspases -3 , -7 ou -6 (126).

1.3. Résultats :

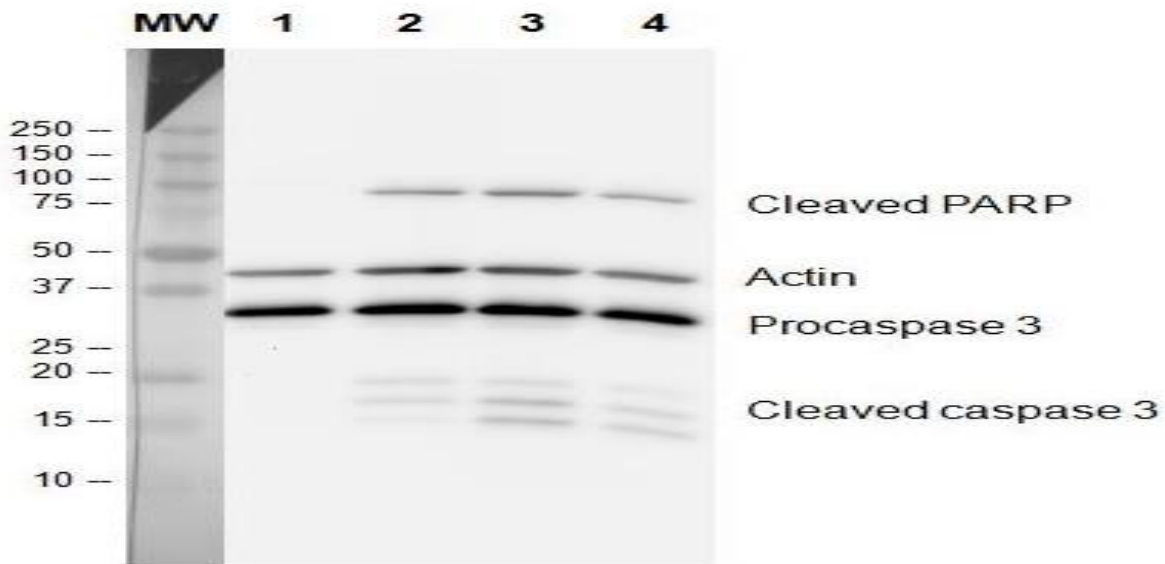


figure 16 : la detection de caspase 3 par western blot (131).

1.4.discussion :

-Un substrat chimio-luminescent tel que le ECL réagit avec un anticorps secondaire couplé à la HRP et produit un signal visible sur film.

-Les substrats chromogènes (4-chloronaphthol ou DAB) fonctionnent également avec la HRP ou l'AP et produisent un produit coloré qui se dépose sur la membrane à proximité de l'anticorps.

-Les anticorps secondaires couplés à des fluorophores (aussi appelés fluorochromes) sont utilisés avec des systèmes de détection spéciaux.

-Pré-incuber l'anticorps primaire avec le peptide immunogénique permet de bloquer les sites de reconnaissance à l'anticorps.

-Les bandes spécifiques n'apparaîtront pas sur le blot car l'anticorps pré-incubé avec le peptide ne peut se fixer à la protéine présente sur la membrane.

-Utile pour déterminer si les bandes observées correspondent à des isoformes ou à des fragments clivés de la protéine d'intérêt, ou bien à des protéines non-spécifiques.

- Les conditions de migration, de transfert, d'immunoblotting et de révélation sont également identiques (132).

2. détection par la méthode tunel :

2.1. Le principe :

Sur la base de répartition de l'ADN dans les cellules apoptotiques, deux techniques histo-chimiques pour la détection de l'apoptose ont été développées. Les méthodes sont couramment utilisées pour examiner l'apoptose *in vivo* ou dans une section de tissu.

-La première méthode, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL), cette méthode utilise l'enzyme TdT pour incorporer dUTP biotinylé sur l'extrémité 3' OH de l'ADN fragmenté.

-La deuxième méthode, *in situ* end labeling (ISEL) ; marquage d'extrémité. Utilise l'enzyme ADN polymérase I pour insérer l'extrémité 3' OH de l'ADN fragmentée avec dUTP biotinylé.

Pour les deux méthodes constituées dUTP biotinylé, peut être révélée par microscopie à fluorescence.

Après réaction avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) conjugué à l'avidine, Alternativement, il peut être détecté avec l'horsradich peroxydase conjuguée à l'avidine (HRP) et le substrat de HRP 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) (133).

2.2. Procédure générale:

- Des sections de tissus ou cellules sont d'abord fixées avec du formol à 10% ou 4% de paraformaldehyde dans le PBS suivie d'une digestion partielle avec la protéinase K Cette étape utilisée pour réduire la réticulation des protéines d'ADN induite par la fixation et d'augmenter l'accessibilité de l'ADN à TdT et dUTP-biotine.

-La peroxydase endogène est inactivée par incubation des tissus de 3% de peroxyde d'hydrogène.

- Les sections de tissu sont ensuite mises en incubation avec un mélange de l'enzyme TdT et dUTP-biotine pendant 1 h à 37 ° C pour marquer les extrémités 3 'OH de l'ADN fragmenté.

-Après le lavage, l'avidine conjuguée à FITC peut être appliqué directement à la détection.

Alternativement, l'avidine conjuguée à HRP peut être ajouté, suivi par le substrat HRP, DAB (133).

2.3. Résultat :

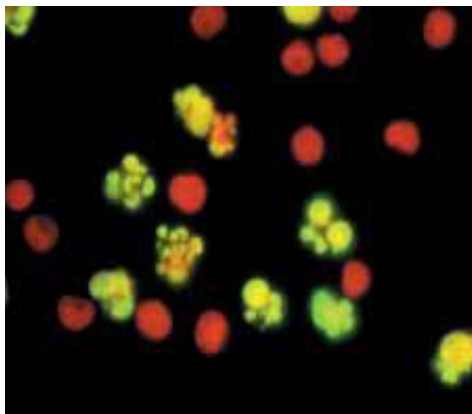


Figure 17 : les cellules de lymphome humain détectées par la méthode tunel suivie d'une fluorescence.les cellules en apoptopse (vert), les cellules en nécrose (rouge) (134)

2.4. Discussion :

-La procédure générale pour ISEL est similaire à celui de l'essai TUNEL. au lieu de TdT, l'ADN polymérase I est utilisé pour incorporer dUTP-biotine.

-Pour un contrôle technique, des coupes de tissus doivent être traitées sans l'exposition à l'enzyme (témoin sans TDT).

-Ces méthodes détectent la fragmentation d'ADN sans différencier le mode de mort cellulaire Une coloration positive a été montrée dans les cellules apoptotique ou nécrotique

-La coloration de la nécrose est généralement plus diffuse que dans celle-ci, qui présente souvent un motif de coloration nucléaire (133).

3. détection par le test apostain :

3.1. Le principe :

Ce test met en évidence les noyaux apoptotiques dont l'ADN fragmenté est plus sensible à la dénaturation à chaud en présence de formamide. L'ADN fragmenté dénaturé est détecté à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement l'ADN simple brin (135).

3.2. Procédure générale :

- Après 48 heures de culture, les cellules sont fixées pendant 30 minutes dans une solution de méthanol froid (80%, v/v).
- lavées et reprises dans 250 μ L de formamide pendant 10 minutes à 75°C puis 5 minutes à TA. (Température ambiante)
- Les sites non spécifiques sont bloqués pendant 15 minutes à TA à l'aide d'une solution de PBS contenant 1% de lait (p/v).
- Les échantillons sont ensuite incubés, 45 minutes à TA, avec un anticorps monoclonal anti-ADN simple brin dilué au 1/10e dans une solution de PBS supplémentée de 5% de SVF (sérum de veau fœtal).
- Puis, les cellules sont incubées, 30 minutes à TA, en présence d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome dilué au 1/200e dans du PBS contenant 1% de lait.
- Un double marquage au DAPI (1 μ g/mL) a été effectué pour chaque échantillon.
- Les cellules sont alors cytocentrifugées sur lames. Les préparations sont montées au Mowiol et observées au microscope à épifluorescence (135).

3.3. Résultat :

Sur chacune des lames, dix champs sont choisis au hasard (objectif $\times 20$). Le nombre total de cellules est compte ainsi que le nombre de cellules présentant des corps apoptotiques. De ces données est déduit un pourcentage de cellules apoptotiques (136).

3.4. Discussion :

- Le chauffage (75°C) des cellules en présence de formamide induit une dénaturation sélective de la chromatine condensé des cellules apoptotique et non de l'ADN condensé des cellules normales (137)

- les noyaux des cellules apoptotique sont détectées par l'anticorps monoclonal qui se lie spécifiquement à la déoxycytidine, et nécessite pour se liées des fragments d'ADN simple brin d'au moins 25-30 bases (137).
- le test apostain détecte la condensation de la chromatine, considérée pathognomonique de l'apoptose (138).
- Ce test est plus sensible que la methode TUNEL pour distinguer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques (136).

4. Le Test MTT :

4.1. Principe:

Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Ceci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette.

La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule). Il suffit donc après l'incubation des cellules avec du MTT pendant un certain temps à 37 °C (environ trois heures) de dissoudre les cellules, leurs mitochondries et donc les précipités de Formazan violets dans du DMSO 100 % (Diméthylsulfoxyde). Un simple dosage de la densité optique à 550 nm par spectroscopie permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement (139).

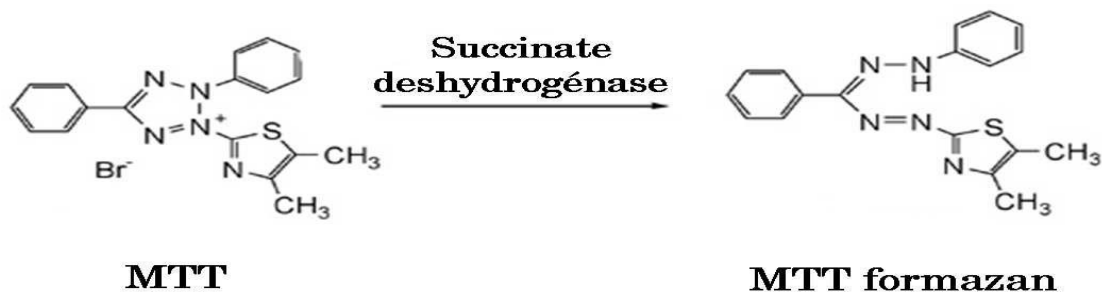


Figure 18: Principe du test MTT (140).

4.2. Procédure Général :

Préparation de la gamme-étalon :

- ensemencer le matin des quantités connues de cellules en triplicate
- attendre au moins 3h qu'elles adhèrent au plastique

Préparation de la solution stock de MTT :

- peser la poudre selon la quantité nécessaire
- resuspendre dans du PBS1x (tampon phosphate salin) à la concentration de 50mg/ml. Filtrer avec un filtre 0,22 μ m.

Incubation de la solution stock de MTT :

- Ajouter 200 μ l de solution de MTT à 50mg/ml par puits d'une plaque P6 (Vol = 2ml, concentration finale en MTT: 5mg/ml).
- Incuber 3H, à 37°C

Dissolution des cristaux et lecture de la DO :

- Laver les puits une fois au PBS 1X.
- Solubiliser les cristaux de MTT dans 200 μ l de DMSO par puits de P6. Bien mélanger pour que les cristaux se dissolvent.
- Transférer 200 μ l dans une plaque 96 puits, pour lecture colorimétrique.
- Lire la DO (Densité optique à la longueur d'onde λ) au lecteur de plaque à $\lambda = 570$ nm (fonction F5 ; $\lambda = 540$ nm) et à 650 nm (fonction F8). Pour les analyses, déduire la DO à 650nm correspondant au bruit de fond (141).

4.3. Résultats :

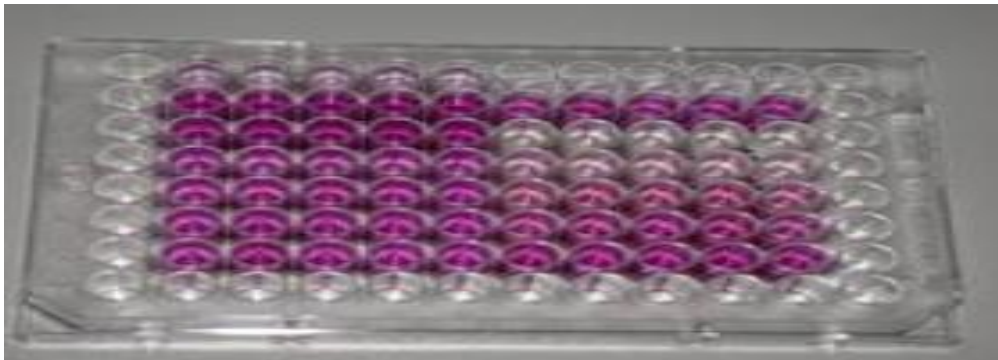


Figure 19 : quantification de la viabilité cellulaire par le test MTT dans une plaque à 96 puits (142).

-La quantité de formazan formée, déterminée par absorbance à 550 nm, est proportionnelle au nombre de cellules vivantes, elle-même proportionnelle à l'activité de la succinate déshydrogénase.

-la cellule est vivante mais ses fonctions cellulaires sont elles intactes

$$\% \text{ viabilité cellulaire} = \frac{\text{l'absorbance des cellules traitées}}{\text{l'absorbance des cellules non traitées}} \times 100$$

4.4. Discussion :

Au contact des cellules viables, le réactif MTT de couleur jaune est réduit par des déshydrogénases en cristaux de formazan MTT insolubles dans l'eau. Ces cristaux dont la formation est proportionnelle au nombre de cellules viable, peuvent être facilement solubilisés par du DMSO ou de l'isopropanol (143-144-145).

L'activité mitochondriale est un marqueur de cytotoxicité aigue qui montre des signes de lésions cellulaires beaucoup plus précoces (146).

5. Test de Bleu de Trypan :

5.1. Nature du reactif :

Le Trypan bleu (ou Trypan blue, ou bleu trypane) est un excellent colorant microscopique. Son C.I.est 23850.

Son nom scientifique n'est pas des plus faciles à mémoriser : 2,7-NAPHTALENEDISULFONIC ACID,3,3'-((3,3'-DIMETHYL(1,1'-BIPHENYL)4,4'-DIYL)BIS(AZO), BIS (5-AMINO 4-HYDROXY-) TETRASODIUM (147)

Formule brute : C₃₄H₂₄N₆Na₄O₁₄S

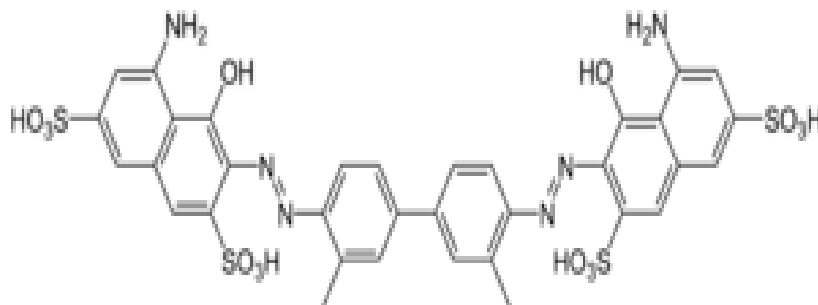


Figure 20 : Structure chimique de bleu de trypan (148).

5.2. Principe :

Le bleu de trypan est connu pour être un colorant vital qui colorie les tissus ou les cellules mortes en bleu.

Il permet de faire une estimation de la proportion des cellules viables dans une population donnée.

Son mécanisme : le bleu de trypan a tendance à entrer dans toutes les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, la molécule entraîne un mécanisme d'exclusion, qui va éjecter cette dernière dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi une cellule vivante expulsera le bleu de trypan et restera blanche au microscope, et une cellule morte ne pourra pas l'expulser.

5.3. Procédure générale :

Le bleu de trypan a une grande affinité pour les protéines du sérum, donc pour ne pas « fausser » le comptage, la suspension cellulaire doit être préparée logiquement dans du PBS.

- Aspiration du milieu des cellules.
- Rinçage deux fois au PBS.
- Ajout d'un volume défini de trypsine.
- On peut préparer une suspension cellulaire « finale » avec :
 - 0,5 ml de bleu de trypan.
 - 0,3 ml de PBS.
 - 0,2 ml de suspension cellulaire « de départ ».

Donc on a une dilution de 5.

Ou plus simple et cela fonctionne sans problème, on peut aussi prendre 100µl de bleu de trypan + 100µl de suspension cellulaire (dilution de 2).

- Attendre 1-2 minutes.
- On compte le total des cellules : celles ayant été colorées par le bleu de trypan : cellules mortes.

Celles n'ayant pas été colorées par le bleu de trypan : cellules vivantes incolore (**149**).

5.4. Résultats :

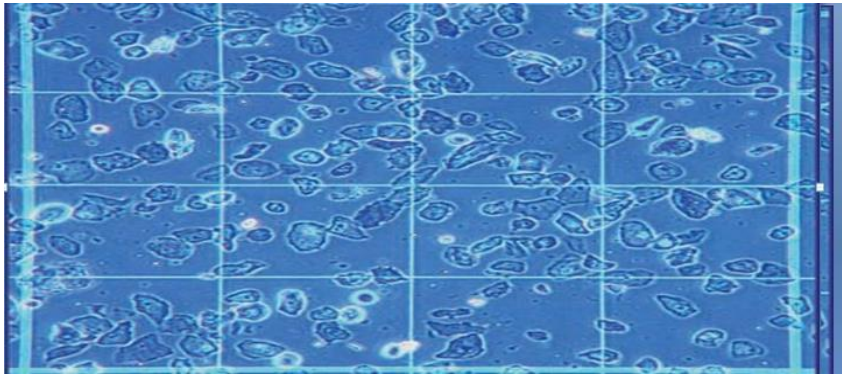


Figure 21 : Comptage des cellules après coloration (150).

Ajouter les cellules mortes + les cellules vivantes, on obtient alors le nombre total de cellules. Et là on pourra calculer le pourcentage de cellules viables.

De plus pour avoir le nombre total de cellules au départ, il faudra tenir compte de la dilution et du volume total de trypsine utilisé (149).

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{Nombre total des cellules incolores}}{\text{Nombre total des cellules}(\text{incolores} + \text{bleues})} \times 100$$

5.5. Discussion :

Les cellules vivantes, dont la membrane est intacte, sont imperméables aux colorants vitaux comme le bleu trypan, alors que les cellules mortes, qui ont perdu leur intégrité membranaire cytoplasmique, se colorent en bleu (151).

Chez une cellule vivante, le bleu trypan rentré est de suite relargué, contrairement aux cellules mortes. Ainsi les cellules mortes sont colorées bleu alors que les cellules vivantes ne le sont pas (apparaissent brillantes).

À ne pas confondre avec le mode d'action de l'iodure de propidium qui ne rentre uniquement dans les cellules mortes, du fait que leurs membranes soient altérées.

Cependant, cette molécule étant toxique, elle finit par tuer les cellules qui deviennent alors toutes bleues (148).



CHAPITRE N : 3

***L'ACTIVITE PRO-APOPTOTIQUE
DES EXTRAITS DES PLANTES
MEDICINALES***

I. INTRODUCTION :

L'échec ou la suppression de l'apoptose est susceptible d'entraîner le développement de cellules immortelles et ensuite le développement du cancer (3). Par conséquent, il est utile de trouver des agents puissants capables d'induire l'apoptose efficacement dans les cellules cancéreuses et l'utiliser comme médicaments thérapeutiques anticancéreux.

Les produits naturels ont été largement utilisés dans la médecine traditionnelle et populaire à des fins thérapeutiques. Anti-cancéreux (3).

1. phyllanthus urinaria :

Urinaria de Phyllanthus (**P. urinaria**), une des usines de fines herbes appartenant au genre Phyllanthus (Euphorbiaceae), est largement distribué en Chine, en Inde méridionale et en Amérique méridionale. Il a été longtemps employé dans la médecine folklorique pour le traitement de plusieurs maladies telles que l'hépatite B, néphrolithiasis et dans les désordres douloureux (152). L'effet anticancéreux du genre Phyllanthus a été seulement rapporté en quelque article.



Figure 22 : phyllanthus urinaria (153).

1.1. Classification scientifique :(153).

Royaume : Plantae
(non classé) : Angiospermes
(non classé) : Eudicots
(non classé): Rosids

CHAPITRE 3 : L'ACTIVITE PRO-APOPTOTIQUE DES EXTRAITS DES PLANTES MEDICINALES

Famille : Phyllanthaceae
Ordre : Malpighiales
Tribu : Phyllantheae
Subtribu : Flueggeinae
Genre: *Phyllanthus*
Espèces : *P. urinaria*

1.2. Matériaux et méthodes :

1.2.1. Préparation de l'extrait de *P.urinaria* ;

La plante entière a été hachée et mélangée avec de l'eau bouillante dans la proportion de 1:20 (p / v) pendant 4 heures et répétée une deuxième fois par addition de la même quantité d'eau à nouveau. Ensuite l'extrait brut a été filtré et lyophilisé jusqu'à l'obtention d'une poudre sèche. L'extrait de *P. urinaria* utilisé dans les expériences a été préparé par la dissolution de la poudre sèche extraite 100 mg de l'originale plante entière dans 1 ml d'eau stérile, filtrée et utilisée comme stock solution (154).

1.2.2. Les changements morphologiques :

Après l'observation des cellules traitées par l'extrait sous un microscope de contraste ils sont remarqués des changements morphologiques liés à l'apoptose tels que le bourgeonnement de la membrane et la formation des corps apoptotiques. (154).

1.3.Résultats :

1.3.1. La Viabilité des différentes cellules cancéreuses après traitement avec *P. urinaria* :

Pour caractériser le potentiel anticancéreux de l'extrait de *P. urinaria*, ils ont analysé son effet sur la viabilité des diverses cellules cancéreuses dérivées de différentes origines comprenant la leucémie et des tumeurs solides. La viabilité de ces différentes cellules cancéreuses était sensiblement diminuée par traitement de *P. urinaria* dépendante la dose suivant les indications de fig. (154).

CHAPITRE 3 : L'ACTIVITE PRO-APOPTOTIQUE DES EXTRAITS DES PLANTES MEDICINALES

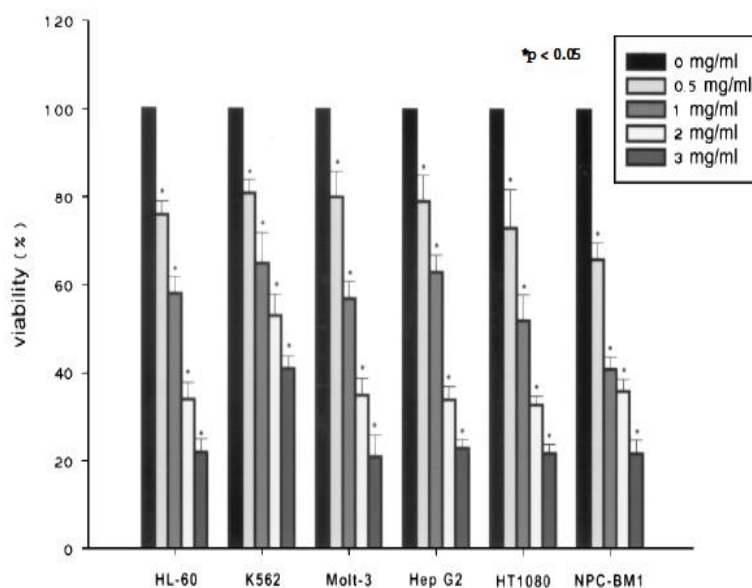


Figure 23 :L'effet de l'urinaria de P. sur la viabilité de diverses cellules cancéreuses (154).

1.3.2. Induction de l'Apoptose dans les cellules cancéreuses par le traitement P .d'urinaria:

Pour étudier la réduction de viabilité des cellules cancéreuses par traitement **P. d'urinaria**, nous avons observé les changements morphologiques des cellules cancéreuses. tels que la condensation de cellules, le bourgeonnement de la membrane ; formation des corps apoptotiques,et La fragmentation d'ADN ; ont été confirmés dans toutes les cellules cancéreuses sous le microscope contraste de phase. Ces résultats ont indiqué que la mort de diverses cellules cancéreuses après traitement **P. d'urinaria** a été atténuée par le processus d'apoptose (155).

1.3.3. Aucun effet cytotoxique de l'extrait P. d'urinaria sur les cellules normales :

Pour confirmer que l'effet cytotoxique de **P. d'urinaria** est spécifique pour des cellules cancéreuses, nous avons étudié la cytotoxicité de **P. d'urinaria** sur les cellules normales, y compris les cellules endothéliales humaines et les cellules de foie.

La dose la plus élevée de **P. d'urinaria** (3 mg/ml) a été employée pour traiter les cellules normales pendant 24 heures et aucun effet cytotoxique a été notée, suivant les indications de figure 24. Aucun des changements morphologiques de l'apoptose comme vu dans les cellules cancéreuses après le traitement par l'extrait de **P. d'urinaria** en cellules normales, même après 72 heures. Il a été démontré que l'effet cytotoxique de **P. d'urinaria** était plus spécifique aux cellules cancéreuses (154).

CHAPITRE 3 : L'ACTIVITE PRO-APOPTOTIQUE DES EXTRAITS DES PLANTES MEDICINALES

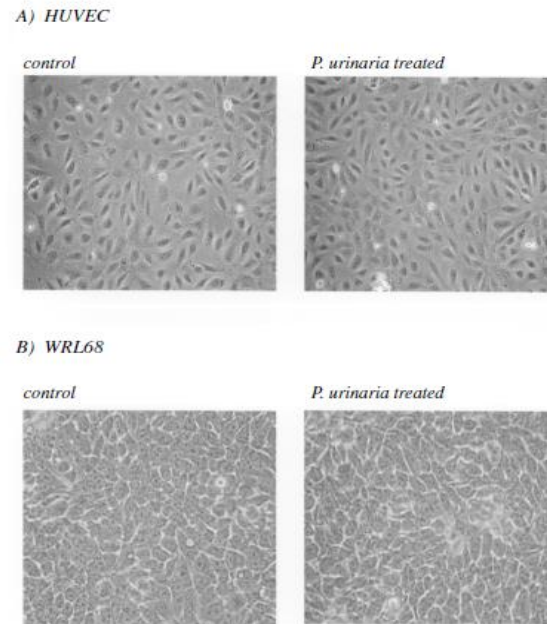


Figure 24 : Aucun effet cytotoxique d'extrait d'urinaria de P. sur HUVECs et cellules WRL68 (155).

1.4. Discussion :

L'induction de l'apoptose en cellules cancéreuses a été démontrée pour être une stratégie efficace pour la thérapie de cancer (156). Une série de stimulus sont connus pour être capables de déclencher l'apoptose en cellules cancéreuses, y compris l'irradiation (157), choc de la chaleur (158), oxyde nitrique (159-160) et quelques autres produits chimiques (161).

Cependant, la plupart de ces stimulus font face souvent au problème de la spécificité pauvre, puisque des cellules normales sont également endommagées. Par conséquent, elle a rendu un tel traitement moins approprié pour l'usage clinique. Le centre de la recherche sur le cancer doit trouver un médicament potentiel avec une spécificité élevée qui induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses. P. d'urinaria a été employé pendant longtemps sans n'importe quel effet secondaire clinique (162). Récemment, l'effet anticancéreux de P. d'urinaria a été démontré en identifiant une molécule anticancéreuse (162). Une étude précédente a constaté que l'extrait aqueux de P. d'urinaria était également efficace à la régulation du taux des R-Bcl-2 et à l'induction de l'apoptose dans les cellules du carcinome pulmonaire (163). L'activité apoptotique de l'extrait aqueux de P. d'urinaria peut être due à un effet synergique entre plusieurs composants actifs.

Dans la présente étude, nous avons essayé d'avoir une image complète de l'effet P. d'urinaria sur les cellules cancéreuses dérivées de différentes origines. Nous avons conclu

que l'extrait **P. d'urinaria** pourrait induire l'apoptose rapidement dans les cellules de la leucémie dans quelques heures, excepté les cellules K562.

ces cellules (k562) sont connues pour leur haute résistance à des traitements chimiothérapeutiques ; l'apoptose est probablement atténuée par l'oncogène Bcr-Abl de kinase de tyrosine et l'activité de PKC α (164). Cependant, avec une plus longue exposition à l'extrait **P. d'urinaria**, l'apoptose a pu également être induite en k562.

1.5. Conclusion :

Dans cette étude, nous avons démontré l'effet anticancéreux de l'extrait aqueux de **P. d'urinaria** pour réduire la viabilité de cellules cancéreuses par l'intermédiaire d'un mécanisme apoptotique. En outre, **P. d'urinaria** n'a exercé aucun effet cytotoxique sur les cellules normales même à une concentration plus élevée ou pour une plus longue exposition. Cependant, le fait que **P. d'urinaria** a été employé pendant longtemps sans aucun effet secondaire clinique rapporté, les résultats de la présente étude n'ont aucune évidence pour soutenir l'application potentielle de **P. d'urinaria** comme médicament anticancéreux sûr (154).

2. Le curcuma :

Le curcuma, *Curcuma domestica* Val. ou *Curcuma longa* L., est une plante vivace appartenant à la même famille que le gingembre, les *Zingiberaceae*. Il est cultivé sous les tropiques, mais l'essentiel de la production se fait en Inde et en Asie du Sud-est. Le rhizome est la partie utilisée de la plante. Le rhizome réduit en poudre est utilisé en tant qu'épice alimentaire pour renforcer la saveur des aliments et les conserver, et comme colorant. Cependant, on l'utilise aussi depuis des siècles en médecine traditionnelle indienne et chinoise. La poudre a une saveur poivrée et amère.

Le **Curcuma** est utilisé en Orient d'abord en tant qu'épice, il entre notamment dans la composition du curry. Il est utilisé aussi en médecine ayurvédique, pour traiter l'asthme, les allergies, les désordres hépatiques comme la jaunisse, l'anorexie, les rhumatismes, le rhume, la sinusite. En médecine traditionnelle chinoise, il est utilisé pour traiter les douleurs abdominales. Il est également reconnu pour ses propriétés anti inflammatoires. Ainsi, des siècles d'utilisation en tant qu'aliment et de remède traditionnel ont démontré son innocuité (165).



Figure 25 : Illustrations de *Curcuma Longa*, la plante d'où est extrait le curcuma, de sa racine et de l'épice (166).

2.1. Classification scientifique :(167).

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Ordre : Zingiberales

Famille : Zingiberaceae

Genre : *Curcuma*

Nom binominal : *Curcuma longa*

2.2. La curcumine induit l'apoptose des cellules de leucémie monocyttaire THP-1 (cellule humaine) via l'activation de JNK :

La leucémie myéloïde aiguë (LMA) est un cancer hématopoïétique caractérisée par un trouble de la différenciation de l'hématopoïèse; cette maladie se traduit par la croissance d'une population clonale de cellules néoplasique. Les cellules hématopoïétiques malignes conduisent à la perte des fonctions hématopoïétiques normales, ce qui entraîne la mort en quelques semaines à quelques mois (168).

CHAPITRE 3 : L'ACTIVITE PRO-APOPTOTIQUE DES EXTRAITS DES PLANTES MEDICINALES

La curcumine est traditionnellement utilisée comme composant pour traiter une variété de troubles dans la médecine ayurvédique indienne.

L'accumulation de preuves indique que la curcumine, curcuminoïde principale du **curcuma**, inhibe la prolifération et induit l'apoptose dans différents types de lignées cellulaires de tumeurs solides et la leucémie (**169-170**). La curcumine a été rapportée pour avoir des effets inhibiteurs sur MDR1 et l'expression du gène WT1 dans les cellules leucémiques de patients AML (**171-172**). La curcumine possède donc des effets chimiopréventifs et chimiothérapeutiques. Il a été démontré que la curcumine peut (i) induire l'apoptose de beaucoup de lignées cellulaires, à savoir les HL-60, les K562, les MCF-7 et les HeLa (**173**) et de cellules primaires (**174**).

2.2.1. Méthodes :

Dans la présente étude, nous avons étudié l'effet et le mode d'action de la curcumine sur la leucémie monocyttaire des cellules THP-1 : Nous avons d'abord examiné l'effet de différentes concentrations de curcumine sur la cellule THP-1, menant l'apoptose.

Ensuite, l'interférence de l'inhibiteur d'ERK et JNK qui ont été utilisés pour étudier le mécanisme probable de l'apoptose induite par la curcumine (**175**).

2.2.2. La cytométrie de flux :

Cellules THP-1, qui ont été traitées avec de la curcumine (30 μ M, 40 μ M, 50 μ M), ont été récoltées et fixées avec 70% d'éthanol à 4°C pendant une nuit : Après lavage PBS, les cellules ont été incubées avec de la RNAs A pendant 5 min. Après incubation avec de l'iodure de propidium (200 μ g/ml), les cellules ont subi une cytométrie en flux (Beckman, FC-500). Pour

une double coloration, les cellules THP-1 ont d'abord été traitées avec PhipPhiLux-G1D2/ substrat caspase-3 (OncoImmuno, Inc) à 37°C pendant 45 min. Après lavage, les cellules ont été colorées avec de propidium et analysées par cytométrie de flux.

2.2.3. L'activité du caspase :

Cellules THP-1 ont été traitées avec extrait de curcuma dissous dans DMSO à une concentration de (50 μ M) en présence d'U0126 (20 μ M) et SP600125 (30 μ M) pendant 10 heures. Les cellules ont été ensuite mises en incubation avec la Caspase-Glo 7/3 et

l'activité de la caspase-7/3 a été détectée et analysée au moyen d'un système de détection multi-GloMax®.

2.2.4. Essai de WST-1 :

Cellules THP-1 et cellules THP-1 traitées au PMA ont étéensemencées à la densité de 50 000 cellules/cm² dans des plaques à 96 puits. Les cellules ont été incubées avec du DMSO et 50 µM curcumine pendant 18 heures. Après lavage, les cellules ont été mises en incubation avec le réactif WST-1 à 37 ° C pendant 1 heure, conformément aux instructions du fabricant. La quantité de formazan a été déterminée avec un photomètre à 450 nm (176).

2.3. Résultats :

2.3.1. La curcumine induit l'apoptose des cellules THP-1 :

Pour étudier l'effet anti-cancer de la curcumine sur cellules THP-1, une lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine THP-1 de façon exponentielle en phase de croissance ont été incubées avec différentes concentrations (30µM, 40µM, et 50µM) de curcumine pour 24 heures. Le DMSO n'a aucun effet sur le cycle cellulaire dans les cellules THP-1. Les fractions de subG1 de cellule de curcumine pour traiter le THP-1 ont été significativement augmentés dans une concentration de manière dépendante. Les données suggèrent que la curcumine peut induire la mort cellulaire de cellules THP-1 . En outre, nous avons étudié l'évolution dans le temps de la mort cellulaire des cellules THP-1 traitées avec la curcumine.

Nous avons constaté que le DMSO n'a pas induit la mort de cellules THP-1. En revanche, la curcumine à 50µM a considérablement amélioré les fractions de subG1 et cette amélioration a culminé en 24 heures (175). Par ailleurs, nous avons analysé l'apoptose des cellules THP-1 traités par la curcumine en utilisant la caspase 7/3 activité et de l'iodure de propidium. Les données ont révélé que la curcumine induit la mort cellulaire THP-1 i par voie apoptotique . Pour étudier davantage si la curcumine active les voies intrinsèques et extrinsèques pendant l'apoptose, nous avons étudié le clivage de la caspase-8, caspase dans la voie extrinsèque, la caspase-9, caspase dans la voie intrinsèque, la caspase-3 et de PARP-1, des substrats de caspases. Les résultats montrent l'activation des caspases par la curcumine a commencé à 3 heures après le traitement, suivi de la dégradation de la PARP-1. Prise, en même temps, les

données indiquent que la concentration-dépendant la curcumine induit l'apoptose des cellules THP-1 à la fois extrinsèques et intrinsèques des voies apoptotiques.

2.3.2. L'apoptose des cellules THP-1 par la curcumine est médié par l'activation des voies JNK / ERK / Jun :

Nous sommes tournés pour examiner l'implication des voies de MAPK dans l'apoptose des cellules THP-1 à médiation de la curcumine. Nous avons constaté que la curcumine augmente le niveau de phosphorylation de JNK et ERK dans une plus grande mesure que p38 dans les cellules THP-1. En conséquence, la curcumine a augmenté la phosphorylation de c-Jun et JunB, les facteurs de transcription en aval de JNK et ERK dans les cellules THP-1.

Pour vérifier encore le rôle des voies JNK et ERK dans l'apoptose des cellules THP-1 induite par la curcumine, nous avons testé si les inhibiteurs de JNK (sp600125) et ERK (u0126) pourrait inverser l'apoptose dans cellules THP-1 à médiation de la curcumine comme en témoigne par l'activité des caspases-3/7.

Comme on s'y attendait, les deux inhibiteurs induit l'activité de caspase 7/3 et réduit la curcumine dans les cellules THP-1 de manière dépendante de la concentration. Toutefois, aucun effet additif ou synergique a été observé lorsque ces deux inhibiteurs

ont été combinés , ce qui implique que la JNK et ERK peuvent être redondantes dans ce système, Systématiquement, l'inhibition de l'ERK a réduit la phosphorylation de ERK, JunB et, dans une moindre mesure, À l'opposé, l'inhibition de JNK réduit la phosphorylation de JNK et c-Jun .

Par ailleurs, le pourcentage de la population sub-G1 dans les cellules THP-1 traitées avec le véhicule et la curcumine avec/sans les inhibiteurs d'ERK, JNK ou les deux, a été évalué en utilisant des analyses de teneur en ADN. Curcumine a augmenté de manière significative le pourcentage de la population sub-G1 (à savoir, des cellules apoptotiques) de cellules THP-1.

Cette population sub-G1 induit par la curcumine a été réduite par l'inhibiteur d'ERK et JNK. Une réduction plus marquée de la population sub-G1 n'a été observée dans les cellules THP-1 traitées avec des inhibiteurs combinatoires. Les données relatives à la réduction des cellules THP-1 de l'apoptose à médiation de la curcumine par les inhibiteurs de MAPK en utilisant des analyses de teneur en ADN est compatible avec ceux obtenus à partir des caspase 3/7 dosages.

CHAPITRE 3 : L'ACTIVITE PRO-APOPTOTIQUE DES EXTRAITS DES PLANTES MEDICINALES

Dans l'ensemble, les données suggèrent que la curcumine modulante l'apoptose dans les cellules THP-1 via l'activation des voies JNK/ ERK/ Jun. Les voies ERK et JNK peuvent être parallèles et redondantes induisant l'apoptose des cellules THP-1 par la curcumine.(176).

2.4. Discussion :

Dans ce travail, nous avons montré que la curcumine induit l'apoptose des cellules THP-1, une lignée humaine des cellules de leucémie monocyttaire. Cette mort cellulaire a été associée à des voies MAPK et du AP1. L'étude prouve le concept que la curcumine est thérapeutiquement efficace contre la leucémie monocyttaire aiguë humaine, un type clé de la leucémie myéloïde aiguë.

Plus récemment, JunB a été montré pour inhiber l'autophagie et induire l'apoptose (177-178). Constamment, AP-1 a été montré être impliqué dans l'apoptose des cellules HL-60 médiée par JNK (179-180-181-182). Dans cette étude, les résultats ont montré que c-Jun et JunB sont impliqués dans l'apoptose induite par la curcumine dans les cellules THP-1, ce qui suggère le rôle de suppresseur de tumeur de c-Jun et JunB en cellules THP-1.

Collectivement, cette étude a montré que la curcumine induit l'apoptose des cellules THP-1 via l'activation des voies ERK /JNK et ses médiateurs en aval,

c-Jun et JunB. Les données sont en bon accord avec les publications indiquant que les voies MAPK /AP1 régulent la mort cellulaire dans les cellules de leucémie HL60 myéloïdes aiguës. De plus, notre et d'autres données soutiennent l'idée que la

MAPK et la molécule aval, AP-1, sont les principaux médiateurs qui régulent la mort cellulaire des tumeurs AML.

2.5. Conclusion :

Cette étude démontre que la curcumine peut induire l'apoptose des cellules THP-1 à l'activation des voies JNK/ERK/AP1. En outre, nos données suggèrent sa nouvelle utilisation en tant qu'agent anti-tumoral dans la leucémie monocyttaire aiguë (175).

3. *Alpinia galanga* :

Alpinia galanga est une plante de la famille des Zingibéracées, répondant au nom français de grand galanga. Son rhizome est depuis longtemps utilisé en Asie du Sud-Est dans l'alimentation et la médecine traditionnelle (183). Le genre *Alpinia* est présent en Asie tropicale et sub-tropicale, en Australie et dans les Iles du Pacifique (183). Le nom vernaculaire **galanga** et ses dérivés proviennent probablement de la traduction arabe 'khanlanjan' du nom chinois 'liang-jiang', signifiant en anglais 'mild ginger' que l'on peut traduire en français par gingembre doux. Dans le langage indien, le nom sanskrit 'kulanja' a la même origine, tout comme ses dérivés : 'kulinjan (184).



Figure 26 : *Alpinia galanga* (183).

3.1. Classification scientifique : (185)

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| Embranchement : | Spermaphytes |
| Sous-embranchement : | Angiospermes |
| Classe : | Monocotylédones |
| Ordre : | Zingibérales |
| Famille : | Zingibéracées |
| Genre : | <i>Alpinia</i> |

CHAPITRE 3 : L'ACTIVITE PRO-APOPTOTIQUE DES EXTRAITS DES PLANTES MEDICINALES

Espèce : galanga

3.2. acetate d'l's-l'-acétoxychavicol:

C'est une molécule exclusivement isolée des graines et des rhizomes *d'A. galanga* (186).

3.2.1. Extraction :

- Extraction des graines :

L'acétate d'l 'S-1 ' -acétoxychavicol, ou acétate de **galanga** a été isolé des graines sèches d'A. galanga en 1976 (187). L'extrait méthanolique a été fractionné par l'hexane, puis l'éther et enfin l'eau. La molécule a été identifiée dans la fraction étherée, puis purifiée. Le rendement obtenu a été d'environ 0.1 % à partir des graines sèches (188).

- Extraction du rhizome :

Ensuite, l'acétate d'acétoxychavicol a été isolé à plusieurs reprises des rhizomes **d'A. galanga**

Par Ex :- le rhizome frais d'extrait méthanolique (189).

- le Rhizome frais d'Extrait hexanique (188).

- le Rhizome séché d'Extrait hexanique (188).



Figure 27 : Rhizome frais d'A. galanga (190).

3.2.2. Structure chimique de l'acétate d'acétoxychavicol :

L'acétate d'l 'S-1 ' -acétoxychavicol est un phénylpropanoïde de PM = 234g/mol. La structure a été déterminée grâce aux techniques de spectrométrie de masse (SM), de résonance magnétique nucléaire (RMN) et d'infra-rouge (IR) (191).

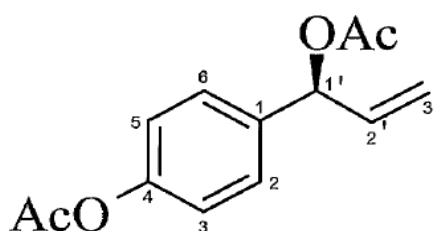


Figure 28 : Structure de L'acétate d'1'S-1'-acétoxychavicol(191).

3.2.3. Activité de l'extrait méthanolique du rhizome d'*A. galanga* sur l'apoptose :

Au cours des études réalisées sur des cellules tumorales afin d'évaluer l'efficacité de l'acétate d'acétoxychavicol dans le traitement curatif des tumeurs, les chercheurs ont évalué son implication dans le phénomène d'apoptose.

Les cellules de tumeur ascitique d'Ehrlich (192) traitées in vitro par l'acétate d'acétoxychavicol ont présenté des modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose : condensation et marginalisation de la chromatine nucléaire, fragmentation nucléaire. Une induction significative ($P < 0.005$) de l'activité protéase de la caspase 3, enzyme ayant un rôle dominant au cours du phénomène apoptotique, a été observée.

L'étude in vitro, effectuée sur les cellules leucémiques promyélocytaire NB4 (193) a montré que l'acétate d'acétoxychavicol conduit à un arrêt du cycle en phase G0-G1, puis à l'apoptose. En sa présence, l'activité des caspases 8, 9 et 3, va également être significativement augmentée (194).

L'apoptose induite par l'acétate d'acétoxychavicol serait associée à une augmentation du taux intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène. Ainsi au contact de cellules tumorales, la molécule se comporterait différemment de la prévention tumorale, puisque l'acétate d'acétoxychavicol conduisait plutôt à une diminution de la production des radicaux libres.

Ito et al (194) ont également montré l'arrêt en phase G0-G1 suivi de l'apoptose des cellules de myélome multiple humain. L'action de l'acétate d'acétoxychavicol sur l'activation des caspases a également été mise en évidence, de même que l'inhibition du facteur de transcription NF κ B (195).

Conclusion

De nombreuses données sont donc actuellement disponibles, montrant que l'apoptose est la mort cellulaire programmée, c'est la voie ultime pour les cellules lésées. Elle peut être déclenchée par :

- des voies extrinsèques à la cellule, par le biais du déclenchement de récepteurs à domaine de mort cellulaire.

- Ou par une voie intrinsèque à la cellule lors des dommages au niveau de l'ADN.

Dans un premier temps, nous avons observé et quantifié les cellules apoptotiques par les méthodes suivantes : méthode tunel et apostain qui détecte les fragments d'ADN, les tests de viabilité cellulaire qui sont le test MTT et bleu de trypan, ou la détection des molécules qui a un rôle principale dans l'apoptose comme le caspase 3.

Et a cause de cellules immortelles en état de maladie comme le cancer, on a induit l'apoptose par les extraits des plantes médicinales suivantes: *Phyllanthus urinaria*. *Curcuma longa*. *Alpinia Galanga*, et on a su que les extraits des plantes précédemment citées ont un pouvoir pro-apoptotique sur les cellules cancéreuses.

Référence

- (1)-Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. *BrJ Cancer*. (1972), Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. 26 : P.239-257.
- (2)-Goldam, Lee et Schafer, Andrew I. (2013), Cecil Medicine Cancérologie. s.l. : Elsevier Masson .
- (3)-Williams, G.T. (1991). Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65: p.1097–1098 .
- (4)-Weber R, J *Cell Biol*. (1964) ,Ultra structural changes in regressing tail muscles of *Xenopus* larvae at metamorphosis . 22: P. 481- 487.
- (5)-Lockshin RA, Zakeri Z. *Nat Rev Mol Cell Biol* .(2001), Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. 2 : P.545-550
- (6)- Steller H. *Science*. (1995), Mechanisms and genes of cellular suicide. 267: P.1445-1449
- (7)-Cikala M, Wilm B, Homayer E, Bottger A, David CN. *Curr Biol*. (1999), Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra* 9 : P.959-962.
- (8)-Bicknell, G. R., et G. M. Cohen. (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*.vol. 207, no 1, P. 40-47.
- (9)-Dong, Z., P. Saikllmar, 1. M. Weinberg et M. A. Venkatachalam. (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death.Involvement of serine but not cysteine proteases.*Am J Pathol*.vol. 151, no 5, P. 1205-1213.
- (10)-Bortner CD, Cidlowski JA, *Am J Physiol*. (1996).Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes . 271: P. 950-961.
- (11)-Evan, G., et T. Littlewood. (1998). A matter of life and cell death .*Science*. vol. 281, no 5381, P. 1317-1322
- (12)-Rai, N. K., K. Tripathi, D. Sharma et v. K. Shukla. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Law Extrem Wounds*.vol. 4, no 3, P. 138-144.
- (13)-Buja, L.M, Eigenbrodt, M.L. and Eigenbrodt, E.H. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of celi death. *Arch Pathol Lab Med*.117: P. 1208-1214
- (14)-Hetts, S.W. (1998).To dies or not to die.An overview of apoptosis and its role in disease.*JAMA*.279.P: 300-320.

- (15)-**Susan Elmore.** (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicol Pathol.* 35(4). P: 495–516.
- (16)- **Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA.** *Am J Med.* (1999). Apoptosis : definition, mechanisms, and relevance to disease. 107 : P. 489-506.
- (17)-**Ziegler U, Groscurth P.** *News Physiol Sci* .(2004). Morphological features of cell death. 19 :P. 124-128.
- (18)-**Ye J, Wang S, Leonard SS, Sun Y, Butterworth L, Antonini J, Ding M, Rojanasakul Y, Vallyathan V, Castranova V, Shi X.** *J Biol Chem.* (1999). Role of Reactive Oxygen Species and p53 in Chromium(VI)-induced Apoptosis. 274 .P: 34974-34980
- (19)- **Rovere-Querini, P., S. BruneUi, E. Clementi et A. A. Manfredi.** (2008). Cel! Death : tipping the balance of autoimmunity and tissue repaim. *Curr Pharm Des.* vol. 14, no 3, P. 269-277.
- (20)-**Savill J, Fadok V.** (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death.*Nature.* 407:p. 784-788.
- (21)-**Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S.** *Nature.* (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD 391 :P. 43-50..
- (22)-**Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X.** (1997). *Cell.*DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis 89 : P.175-184.
- (23)-**Sakahira, H, Enari, M. and Nagata, S.** (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.*Nature* 391, 96-9.
- (24)-**Ferri KF, Kroemer G** .(2000). *Nat Cell Biol* Control of apoptotic DNA degradation. 2 : P.63-64
- (25)-**Bratton, D. L, Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A. and Henson, P. M.** (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calciummediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *JBiol Chem* 272, P.26159-65.
- (26)-**Gardai, S. J., Bratton, D. L., Ogden, C. A. and Henson, P. M.** (2006). Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol* 79, P.896-903.
- (27)-**Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR, Martin P.***Development* .(2000) . Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos127 : P. 5245-5252.

- (28)-Nishikawa A, Hayashi H. (1995), *Differentiation* Spatial, temporal and hormonal regulation of programmed muscle cell death during metamorphosis of the frog *Xenopus laevis*. 59 : P. 207-214.
- (29)-Clarke PG, Posada A, Primi MP, Castagne V. **Biomed Pharmacoth.** (1998) Neuronal death in the central nervous system during development), 52 : P. 356-362.
- (30)-Ekert PG, Vaux DL. (1997) .Apoptosis in the immune system. *Br Med Bull.* ; 53: P. 591-603.
- (31)-Goldrath A, Bevan M. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.*402 : P. 255-262
- (32)-Neurath MF, Finotto S, Fuss I., Boirivant M, Galle PR, Strober W. (2001) Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease : to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol.*22 : P. 21-26.
- (33)-Rich T, Stephens R, Trowsdale J. (1999) MHC linked genes associated with apoptosis/programmed cell death. *Biochem Soc Transactions.* 27 : P. 781-785.
- (34)-Agnantis NJ, Goussia AC. (1999) Apoptose et cancer. *Bull Acad Natl Med.* 183 P. 277-287.
- (35)-Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Manjeri A, Venkatachan M.B (1999).Apoptosis : definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med.* 107 :P.489-506.
- (36)-Thompson CB. (1995).Apoptosis in the pathogenesisand treatment of disease.*Science.*267 : P. 1456-1462.
- (37)-Barinaga M. (1998). Is apoptosis key in Alzheimer's disease ?*Science.*281 : P.1303 - 1304.
- (38)-Selliah N, Finkel TH. (2001) Biochemical mechanisms of HIV-induced T-cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 8 : P. 127-136.
- (39)-Muthumani K, Choo AY, Hwang DS, Chattergoon MA, Dayes NN, Zhang D, Lee MD, Duvuri U, Weiner DB. (2003). Mechanism of HIV-1 viral protein R-induced apoptosis.*BiochemBiophys Res Commun.*304 : P. 583-592.
- (40)-Hay S, Kannourakis G. (2002) .A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol.*83 : P. 1547-1564.
- (41)-Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L. (1999). Molecular biology of aging. *Cell.*96 : P. 291-302.

- (42)-**Kroemer, G ; and J. C. Reed** . (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* (5):p. 513- 159
- (43)-**Rich T ; Stephens R, Trowsdale J.** (1999) .MHC linked genes associated with apoptosis/programmed cell death. *Biochem Soc Transactions.* ; 27 :p.781-785.
- (44)- **Nagata S** .(1997). Apoptosis by death factor.*Cell.* ; 88 :p.355-365.
- (45)-**Jin, Z. El-Deiry, W.S.** (2005) .Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*;4:p.139-63.
- (46)-**Zimmermann KC , Bonzon C, Green DR.** (2001) .The machinery of programmed cell death.*Pharmacol Ther.* ; 92 : p.57-70.
- (47)-**Amarande-Mendes GP, Green DR.** (1999). The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res.* ; 32 : p.1053-1061.
- (48)-**Thornberry NA, Rosen A, Nicholson DW.** (1997) .Control of apoptosis by proteases. *Adv Pharmacol.*; 41 :p. 155-177
- (49)-**Lavrik, I.N., Golks, A. Krammer, P.H.** (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*;115:p.2665-72.
- (50)-**Degterev, A, Boyce, M.Yuan, J.** (2003). A decade of caspases. *Oncogene*;22:P.8543-67.
- (51)-**Guerrero, A.D., Chen, M. & Wang, J.** (2007). Delineation of the caspase-9 signaling cascade. *Apoptosis*;13:p.177-86.
- (52)-**Li, H, Zhu, H, Xu, C.J. Yuan, J.** (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*;94:p.491-501.
- (53)-**Slee, E.A, Adrain, C. , Martin, S.J.** (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*;276:p.7320-6.
- (54)-**Schutte, B, Henfling, M, Kolgen, W, Bouman, M, Meex, S, Leers, M.P, Nap,M, Bjorklund, V, Bjorklund, P, Bjorklund, B, Lane, E.B, Omary, M.B, Jornvall,H , Ramaekers, F.C.** (2004). Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis.*Exp Cell Res*;297:p.11-26.
- (55)-**Lakhani, S.A, Masud, A, Kuida, K, Porter, G.A, Jr, Booth, C.J, Mehal, W.Z, Inayat, I. Flavell, R.A.** (2006). Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*;311:p.847-51.
- (56)-**Jang, M, Park, B.C, Lee, A.Y, Na, K.S, Kang, S, Bae, K.H, Myung, P.K, Chung, B.C, Cho, S, Lee do, H. , Park, S.G.** (2007).Caspase-7 mediated cleavage of proteasome subunits during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*;363:p.388-94.

- (57)-Germain, M, Affar, E.B, D'Amours, D, Dixit, V.M, Salvesen, G.S. , Poirier,G.G.** (1999). Cleavage of automodified poly (ADP-ribose) polymerase during apoptosis.Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 274:p.28379-84.
- (58)-Tang, D. , Kidd, V.J.** (1998). Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem*;273:p.28549-52.
- Widlak, P. , Garrard, W.T.** (2005). Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem*;94:p.1078-87.
- (59)-Kivinen, K, Kallajoki, M. , Taimen, P.** (2005). Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix. *Exp Cell Res*;311:p.62-73.
- Janicke, R.U., Sprengart, M.L, Wati, M.R. , Porter, A.G.** (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*;273:p.9357-60.
- (60)-Liang, Y, Yan, C. , Schor, N.F.** (2001).Apoptosis in the absence of caspase 3.*Oncogene*;20:p.6570-8.
- Zheng, T.S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D.W.,Lazebnik, Y. , Flavell, R.A.** (2000). Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med*;6:p.1241-7.
- (61)-Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, Salvesen GS. J Biol Chem .**(1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. 272 : p.7797-7800
- (62)-Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S,Ghayur T, Li P.Science.** (1995), Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. 269 : p.1885-1888.
- Riedl SJ, Renatus M, Snipas SJ, Salvesen GS. Biochemistry.** (2001). Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35. , 40 : p.13274-13280.
- (63)-Tschopp J, Irmeler M, Thome M. Curr Opin Immunol.** (1998). Inhibition of fas death signals by FLIPs. 10 : p.552-558
- (64)-Liston P, Fong WG, Korneluk RG. Oncogene.** (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. 22 :p. 8568-8580.
- (65)-Yang YL, Li XM. Cell Res.** (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. 10 : p.169-177
- Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Proc Natl Acad Sci U S A.**(2001).Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal

degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.). 98 : p.8662-8667

(66)-Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. *Cell.* (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.). 102 : p.33-42.

-Liston P, Fong WG, Korneluk RG. *Oncogene.* (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. 22 :p. 8568-8580.

(67)-Thornberry NA, Peterson EP, Zhao JJ, Howard AD, Griffin PR, Chapman KT. *Biochemistry.* (1994). Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones. 33 :p. 3934-3940

(68)-Wei Y, Fox T, Chambers SP, Sintchak J, Coll JT, Golec JM, Swenson L, Wilson KP, Charifson PS. *Chem Biol.* (2000). The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. 7 : p.423-432.

(69)-Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. *J Biol Chem.*, (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. 273 : p.32608-32613.

(70)-Srivastava, Rakesh, et Inc NetLibrary. (2007). Apoptosis, cell signaling, and human diseases. Volume 2, Molecular mechanisms. Humana Press.

-Ziegler, David, et Andrew Kung. (2008). Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Current opinion in oncology.* vol. 20, no 1, p. 97.

(71)-Micheau, O. & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*;114:p.181-90.

(72)-Wang, X, Zhang, J, Kim, H.P, Wang, Y, Choi, A.M. , Ryter, S.W. *Bcl-XL.* (2004).disrupts death-inducing signal complex formation in plasma membrane induced by hypoxia/reoxygenation. *Faseb J*;18:p.1826-33

(73)-www2.ulg.ac.be

(74)-Brenner, C. and G. Kroemer (2000). Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science* **289** (5482): 1150-1.

(75)-Mohamed, F, O. A. Stuart, O. Glehen, M. Urano et P. H. (2006). Sugarbaker. Optimizing the factors which modify thermal enhancement of melphalan in a spontaneous murine tumour. *Cancer Chemother Pharmacol.* vol. 58, no 6, p. 719-724. En ligne.

- (76)-Helewski, K. 1, G. 1. Kowalczyk-Ziomek et 1. Konecki.** (2006). Apoptosis and necrosis--two different ways leading to the same target. *J. Wiad Lele* vol. 59, no 9-10, p. 679-684. En ligne.
- (77)-Kelly, K. 1, R. M. Sandoval, K. W. Dunn, B. A. Molitoris et P. C. Dagher.** (2003). A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* vol. 284, no 5, p. CI309-1318.
- (78)-Shibue, T. , Taniguchi, T.** (2006) .BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer*;119:p.2036-43.
- (79)-Willis, S.N. , Adams, J.M.** (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*;17:p.617-25.
- (80)-Lalier, L, Cartron, P.F. Juin, P, Nedelkina, S, Manon, S, Bechinger, B. ,Vallette, F.M.** (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*;12:p.887-96.
- (81)-Rasola, A. , Bernardi, P.** (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*;12:p.815-33.
- (82)-Zamzami, N, C. Maise, D. Metivier et G. Kroemer.** (2001). Measurement of membrane permeability and permeability transition of mitochondria. *Methods Cell Biol.* vol. 65, p.147-158.
- (83)-Youle, R. J, et A. Strasser.** (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol. 9, no 1, p. 47-59.
- (84)-ahmed bettaieb .** (2009) .mécanismes d'induction de l'apoptose par le choc thermique et effet protecteur de la thermotolérance induite à 40°C. p : 55.
- (85)-garrido, c, galluzzi, l, brunet, m, puig, p.e, didelot, c. , kroemer, g.** (2006). mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *cell death differ*;13:p.1423-33.
- (86)-Widlak, P. , Garrard, W.T.** (2005). Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem*;94:p.1078- 87.
- (87)-Ravagnan, L, Roumier, T., Kroemer G.** (2002). Mitochondria, the killer Organelles and their weapons. *Journal of cellular physiology* 192, p.131-137.
- (88)-Ye, H., Cande, C., Stephanou, N.C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Dauga, S E., Garrido, C., Kroemer, G. & Wu H.** (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nature structural biology* 9, p. 680-684.

- (89)-Widlak, P., Li, P., Wang, X. & Garrard, W.T.** (2000). Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (Caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *The journal of biological chemistry* 275,p. 8226-8232.
- (90)-Van Gurp, M., Festjens, N., Van Loo, G., Saelens, X. & Vandenaebroeck, P.** (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 34,p. 487-497.
- (91)-Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D. & Green, D.R.** (2005); PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309:p.1732-5.
- (92)-Raab, O.** (1900). Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z Biol*;39:p.524-530.
- (93)-Vaux DL, Cory S, Adams JM.** *Nature*. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-Myc to immortalize pre-B cells. 335 ,p.440-442.
- (94)-Youle, R.J. Strasser. A.** (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, p. 47-59.
- (95)-Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. and Lutz, R. J.** (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* 14, p.5589-96.
- (96)-O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S. and Huang, D. C.** (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* 17, p.384-95.
- (97)-Adachi, M., Zhao, X. and Imai, K.** (2005). Nomenclature of dynein light chain-linked BH3-only protein Bim isoforms. *Cell Death Differ* 12,p. 192-3.
- (98)-Strasser A.** (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol.* Mar;5(3):p.189-200.
- (99)-Nguyen, M., P. E. Branton, P. A. Walton, Z. N. Oltvai, S. J. Korsmeyer et G. C. Shore.** (1994). Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B defective adenovirus. *J Biol Chem.*, p. 16521-16524
- (100)-Daniel, I. C., et W. R. Smythe.** (2004). The role of Bcl-2 family members in non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* , p. 19-27.
- (101)-Huang, D. C. and Strasser, A.** (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103,p. 839-42.

- (102)-Grad, J. M., Zeng, X. R. and Boise, L. H.** (2000). Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr Opin Oncol* **12**, p.543-9.
- (103)-Cuconati, A., Mukherjee, C., Perez, D. and White, E.** (2003). DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev* **17**, p.2922-32.
- (104)-Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A.** *Mol Cell* (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. **3** : p.287-296
- (105)-Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A.** *Science* .(2003), p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. **302** : p.1036-1038.
- (106)-Imaizumi K, Morihara T, Mori Y, Katayama T, Tsuda M, Furuyama T, Wanaka A, Takeda M, Tohyama M.** *J. Biol. Chem.* (1999). The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. **274** : p.7975-7981.
- (107)-Cory S, Adams JM.** (2002). *at Rev Cancer*. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch . **2** :p. 647-656.
- (108)-Hengartner MO, Horvitz HR.** (a) *Curr Opin Genet Dev.* (1994). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. **4** : P. 581-586
- (109)-Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR.** *Cell.* (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. **75** : P. 641-652.
- (110)-Hengartner MO, Horvitz HR.** (b) *Cell* (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. **76** : P. 665-676.
- (111)-Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X.** *Cell.* (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **90**:P.405-413.
- (112)-Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., Emi, M., Inoue, H. and Toge, T.** (2002). Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **50** : P. 343-52.
- (113)- Herr, I. and Debatin, K. M.** (2001). Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* **98** : P. 2603-14.

- (114)-Honda, R. and Yasuda, H.** (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J* 18 : P. 22-7.
- (115)-Igney, F. H. and Krammer, P. H.** (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2: P. 277-88.
- (116)-Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green, D. R.** (1998). DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* 1: P.543-51.
- (117)-Ravi, R., Bedi, G. C., Engstrom, L. W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., Fuchs, E. J. and Bedi, A.** (2001). Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol* 3: P. 409-16.
- (118)-Bernardi, P., et A. Rasola.** (2007). Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem.* vol. 45: P.481-506.
- (119)-Kim, R., M. Emi, K. Tanabe, S. Murakami, Y. Uchida et K. Arihiro.** (2006). Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol.* vol. 208, no: P.319-326.
- (120)-Hay, B. A., D. A. Wassarman et G. M. Rubin.** (1995). Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell.* vol. 83, no 7: P.1253-1262.
- (121)-Deveraux, Q. L., N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S. M. Srinivasan, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen et J. C. Reed.** (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo* 17, no 8: P. 2215-2223.
- (122)-Takahashi, R., Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen et J. C. Reed.** (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem.* vol.273,no:P.7787-7790.
- (123)-Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen et J. C. Reed.** (1997). «The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo* 16, no 23: P.6914-6925.
- (124)-Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, I. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, E. French et I. Tschopp.** (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FUP. *Nature.* vol. 388, no 6638: P. 190-195.

- (125)- **SOTO AM, SONNENSCHNEIDER C, CHUNG KL, FERNANDEZ MF, OLEA N, SERRANO FO.** (1995).The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect*, 103(suppl7):p.113-122.
- (126)-**Xiao-Ming,Yin,MD,phD,Zheng Dong,phD.**(2003). A Guide for Basic and Clinical Research.p.247.
- (127)-**Roy, S. and Nicholson, D.W.** (2000) .Criteria for identifying authentic caspase substrates during apoptosis. *Methods Enzymol.* 322, p.110–125.
- (128)-**Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S.** (2000). Caspase assays. *Methods Enzymol.* 322, p.91–100.
- (129)-**Cao, G., Pei, W., Lan, J., Stetler, Y. R., Nagayama, A., Luo, T., et al.** (2001). Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40 mediates apoptotic DNA fragmentation in transient cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J. Neurosci.* 21,p. 4678–4690.
- (130)-**Komoriya, A., Packard, B. Z., Brown, M. J., Wu, M-L., and Henkart, P. A.** (2000). Assessment of caspase activities in intact apoptotic thymocytes using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *J. Exp. Med.* 191, p.1819–1828.
- (131)- www2.ulg.ac.be.
- (132)-**Guillaume Boucher, PhD.** (2013). Western Blot Introduction et Optimisation.p.22-27 -www.abcam.com .
- (133)-**Li, Y., Sharov, V. G., Jiang, N., Zaloga, C., Sabbah, H., and Chopp, M.** (1995). Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am. J. Pathol.* **146**, 1045–1051.
- (134)-<http://www.ebioscience.com/knowledge-center/area-of-biology/apoptosis/dna-fragmentation-assays.htm>
- (135)-**Oumou Goundiam .** (2009), etude de la resistance a l'anoïkis des cellules de melanome b16f10 cultivees sur revetements anti-adhesifs, p : 69.
- (136)-**Elodie Velzenberger .** (2008) .validations biologiques et physico-chimiques d'un Revêtement cellulosique de boites pour cultures cellulaires bioactives, p : 78.
- (137)-**willingham ; M.C.** (1999). cytochemical methods for the détection of apoptosis .p: 1101-10.

- (138)-**Leist M; B.Single et al;** (2001).intracellular adenosine triphosphate concentration a switch in the decision between apoptosis and necrosis;. P: 1481-6
- (139)-https://fr.wikipedia.org/wiki/Test_MTT
- (140)-www.polymtl.ca/liab/doc/rapport-stageKatiaete2011.pdf.
- (141)- www.test.lbo2-intranet.eu/.../3%20Protocoles/.../BC07%20-%20Test%20
- (142)-<http://www.nib.si/eng/index.php/departments/departments-of-genetic-toxicology-and-cancer-biology>.
- (143)-**Mosmann T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.journal of immunological Methods.65, (1-2). P:55-63.
- (144)-**Holst CM, Oredsson SM.** (2005). Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of spermine analogue on human breast cancer cell lines.Toxicology in vitro,19 (3). P:332-338.
- (145)-**Hansen MB,Nielsen SE,Berg K .**(1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill.Journal of Immunological Methods.119 (2). P:203-210.
- (146)-**Konsoula R, Barile FA.** (2005). Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells.Toxicology in vitro.19 (5).P: 675-684.
- (147)-www.champignons-passion.be/TrypanBleu.pdf.
- (148)- https://fr.wikipedia.org/wiki/Bleu_de_trypan .
- (149)- www.test.lbo2-intranet.eu/.../3%20Protocoles/.../CC14-%20Bleu%20tryp
- (150)-data.over-blog-kiwi.com/.../ob_0c7bc8f41a6e6bc67b227a974e9eb1a3_td-4 apoptose [1].pptx.
- (151)-**Slater TF, Sawyer B, Strauly U.** (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III.Points of coupling of four tetrazolium salts.Biochim Biophys Acta.77.P : 383-393.
- (152)- https://en.wikipedia.org/wiki/Phyllanthus_urinaria.
- (153)-https://www.cals.ncsu.edu/plantbiology/ncsc/.../Phyllanthus_urinaria.htm
- (154)-**Sheng-Teng Huang*,† Rong-Chi Yang‡ and Jong-Hwei S. Pang.**(2004).Aqueous Extract of *Phyllanthus urinaria* Induces Apoptosis in Human Cancer Cells.Vol.32,No.2,p.175–183

(155)-Du, Y.H. and P.C. Ho. (2001). Arsenic compounds induce cytotoxicity and apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant gynecological cancer cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47: p.481–490,.

- **Ishiko, O., T. Sumi, H. Yoshida, S.** (2001).Ogita and R. Yamada. Expression of apoptosis regulatory proteins in advanced cancer of the uterine cervix after cyclic balloon-occluded arterial infusion chemotherapy. *Int. J. Oncol.* 18: p.1151–1155.

(156)-Bishay, K., K. Ory, M.F. Olivier, J. Lebeau, C. (2001).Levalois and S. Chevillard. DNA damage-related RNA expression to assess individual sensitivity to ionizing radiation. *Carcinogenesis* 22: p.1179–1183.

- **Naumann, U., S. Kugler, H. Wolburg, W. Wick, G. Rascher, J.B. Schulz, E. Conseiller, M. Bahr and M. Weller.** (2001).Chimeric tumor suppressor 1, a p53-derived chimeric tumor suppressor gene, kills p53 mutant and p53 wild-type glioma cells in synergy with irradiation and CD95 ligand. *CancerRes.* 61: p.5833–5842.

(157)-Kondo, T., T. Matsuda, T. Kitano, A. Takahashi, M. Tashima, H. Ishikura, H. Umehara, N. Domae, T.Uchiyama and T. Okazaki. (2000). Role of c-jun expression increased by heat shock- and ceramideactivated caspase-3 in HL-60 cell apoptosis. Possible involvement of ceramide in heat shockinduced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: p.7668–7676.

- **Feng, H., Y. Zeng, L. Whitesell and E.** (2001) .Katsanis. Stressed apoptotic tumor cells express heat shock proteins and elicit tumor-specific immunity. *Blood* 97: p.3505–3512

(158)-Vouldoukis, I., V. Sivan, M.C. Vozenin, C. Kamate, A. Calenda, D. Mazier and B. Dugas. (2000). Fc-receptormediated intracellular delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) protects against redoxinduced apoptosis through a nitric oxide dependent mechanism. *Mol. Med.* 6: p.1042–1053

(159)-Mansat, V., A. Bettaieb, T. Levade, G. Laurent and J.P. (1997).Jaffrezou. Serine protease inhibitors block neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and apoptosis triggered by daunorubicin. *FASEB J.* 11: p.695–702 .

(160)-Calixto, J.B., A.R. Santos, V. Cechinel Filho and R.A. Yunes. (1998). A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* 18: p.225–258.

(161)-Giridharan, P., S.T. Somasundaram, K. Perumal, R.A. Vishwakarma, N.P. Karthikeyan, R. Velmurugan and A. (2002) .Balakrishnan. Novel substituted methylenedioxy lignan suppresses proliferation of cancer cells by inhibiting telomerase and activation of *c-myc* and caspases leading to apoptosis. *Br. J. Cancer* 87: p.98–105.

- (162)-Huang, S.T., R.C. Yang, L.J. Yang, P.N. Lee and J.H.S.Pang. (2003). *Phyllanthus urinaria* triggers the apoptosis and Bcl-2 down regulation in Lewis lung carcinoma cells. *Life Sci.* 72: p.1705–1716
- (163)-Riordan, F.A., C.A. Bravery, K. Mengubas, N. Ray, N.J. Borthwick, A.N. Akbar, S.M. Hart, A.V. Hoffbrand, A.B. Mehta and R.G. (1998). Wickremasinghe. Herbimycin A accelerates the induction of apoptosis following etoposide treatment or gamma-irradiation of bcr/abl-positive leukaemia cells. *Oncogene* 16: p.1533–1542,
- Jamieson, L., L. Carpenter, T.J. Biden and A.P. Fields. (1999). Protein kinase C α activity is necessary for Bcr-Abl-mediated resistance to drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274: p.3927–3930,
- (164)-Sheng-Teng Huang, Rong-Chi Yang† and Jong-Hwei S. Pang.(2004).Aqueous Extract of *Phyllanthus urinaria* Induces Apoptosis in Human Cancer Cells.Vol. 32, No. 2, p. 175–183.
- (165)-Paris : Albin Michel,(1987) ,DELAVEAU P. Les épices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments, P.130-136.
- (166)-<http://newsletter.vitalchoice.com>
- (167)-[www.news-medical.net/health/What-is-Curcumin-\(French\).aspx](http://www.news-medical.net/health/What-is-Curcumin-(French).aspx)
- (168)-<https://fr.wikipedia.org/wiki/Curcuma>.
- (169)-Rubnitz Je ,Gibson B,Smith FO.(2010). Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol,Clin,North,Am,24(1):P.35-63*.
- (170)-Das T,Sa G,Saha B,Das K . (2010). Multifocal signal modulation therapy of cancer. Ancient Weapon , modern targets. *Mol Cell Biochem*, 336 (1-2) : P.85-95.
- (171)-Ravindran J,Prasad S, Aggarwal BB . (2009). Curcumin and cancer cells : how many ways can curry kill tumor cells selectively ? *AAPS J* 11 (3) .P:495-510 .
- (172)-Anuchapreeda S,Limtrakul P, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Chanarat P . (2006) ,Inhibitory effect of curcumin on WT1 gene expression in patient leukemic cells. *Arch Pharm Res* 29 (1): P.80-87.
- (173)-Anuchapreeda S, Thanarattanakorn P, Sittipreechacharn S, Timas S, Chanarat P, Limtrakul P . (2006). Inhibitory effect of curcumin on MDR1 gene expression in patient leukemic cells. *Arch Pharm Res* 29 (10) : P. 866-873
- (174)-Roy, M., Chakraborty, S., Siddiqi, M., and Bhattacharya, R.K. (2002). Induction of Apoptosis in Tumor Cells by Natural Phenolic Compounds. *Asian Pac J Cancer,Prev*3:P.61-67.

(175)-Tourkina, E., Gooz, P., Oates, J.C., Ludwicka-Bradley, A., Silver, R.M., and Hoffman, S. (2004). Curcumin-induced apoptosis in scleroderma lung fibroblasts: role of protein kinase cepsilon. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: P.28-35.

(176)-www.curcumine-sante.net/curcumine-apoptose-leucemie.

(177)-bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/.../147-6882/12/22.

(178)-Yogev O, Goldberg R, Anzi S, Shaulian E. (2010). Jun proteins are starvation-regulated inhibitors of autophagy. *Cancer Res.*70 (6) P: 2318-2327. 10.1158/0008-5472.CAN-09-3408.

(179)-Yogev O, Shaulian E. (2010) Jun proteins inhibit autophagy and induce cell death. *Autophagy*. 6 (4) P: 566-567.10.4161/auto.6.4.11950.

(180)-Mollinedo F, Gajate C, Modolell M. (1994) The ether lipid 1-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine induces expression of fos and jun proto-oncogenes and activates AP-1 transcription factor in human leukaemic cells. *Biochem J.*302(Pt2).P:325-329.

(181)-Kondo T, Matsuda T, Kitano T, Takahashi A, Tashima M, Ishikura H, Umehara H, Domae N, Uchiyama T, Okazaki T. (2000). Role of c-jun expression increased by heat shock- and ceramide-activated caspase-3 in HL-60 cell apoptosis. Possible involvement of ceramide in heat shock-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 275 (11).P: 7668-7676. 10.1074/jbc.275.11.7668.

(182)-Sawai H, Okazaki T, Yamamoto H, Okano H, Takeda Y, Tashima M, Sawada H, Okuma M, Ishikura H, Umehara H. (1995) .Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem.*270 (45). P: 27326-27331. 10.1074/jbc.270.45.27326.

(183)-Chen SH, Lin JK, Liang YC, Pan MH, Liu SH, Lin-Shiau SY. (2008). Involvement of activating transcription factors JNK, NF-kappaB, and AP-1 in apoptosis induced by pyrrolidine dithiocarbamate/Cu complex. *Eur J Pharmacol.*, 594 (1-3) P:9-17. 10.1016/j.ejphar.2008.07.024.

(184)-ZHENGI W., RA VEN P.H. (1995) .Flora of China, Science press & Missouri botanical garden.

(185)-<http://www.uni-graz.at/~katzer/germ/generiframe.html?Alpigal.html>.

(186)-JUDD, CAMPBELL, KELLOGG, STEVENS. (2002). Botanique systématique, une perspective phylogénétique, De Boeck Université, Paris .

(187)-KUBOTA K., UEDA Y., Y ASUDA M., MASUDA A. (2001) Occurence and antioxidative activity of l '-acetoxychavicol acetate and its related compounds in the rhizomes

of *Alpinia galanga* during cooking. Food Flavors and Chemistry, special publication, Royal society of chemistry, p. 601-607.

(188)-MITSUI S., KOBA Y ASHI S., NAGAHORI H., OGISO A. (1976). Constituents from seeds of *Alpinia galanga* Wild. And their anti-ulcer activities. Chem. Pharm. Bull., 24, p.2377-2382.

(189)-YANG X., EILERMAN R.G. Pungent principle of *Alpinia galanga* (L.) Swartz and its applications. J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 1657-1662.

(190)-ITOKAWA H., MORITA H., SUMITOMO T., TOTSUKA N., TAKEYA K. (1987). Antitumour principles from *Alpinia galanga*. Planta Med., 53: 32-33.

(191)-Thai, Junior, Encyclopedia-mars. (2005) URL:

<http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK14/chapter10/tl4-10-12.htm>

(192)-MOFFATT J., HASHIMOTO M., KOJIMA A. et al. (2002). Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. Carcinogenesis, 21: p.2151-2157.

(193)-ITO K., NAKAZATO T., MURAKAMI A. et al. (2004). Induction of apoptosis in human myeloid leukemic cells by 1'-acetoxychavicol acetate through mitochondrial- and fas-mediated dual mechanism. Clin. Cancer Res., 10: p.2120-2130.

(194)-ITO K., NAKAZATO T., XIAM M.J. et al. (2005). 1'-acetoxychavicol acetate is a novel nuclear factor KB inhibitor with significant activity against multiple myeloma in vitro and in vivo. Cancer Res., 65: p.4417-4424.

(195)-ICHIKAWA H., TAKADA Y., MURAKAMI A., AGGARWAL B.B. (2005). Identification of a novel blocker of IKBa kinase that enhances cellular apoptosis and inhibits cellular invasion through suppression of NF-KB-regulated gene products. J. Immunol., 174: p.7383-7392.

Résumé

Depuis des millénaires, les produits d'origine naturelle ont été utilisés par l'homme comme remède en médecine traditionnelle. Les recherches récentes ont révélé que de telles substances naturelles sont capables d'empêcher l'apparition et de bloquer le développement de nombreux cancers, c'est pour cette raison qu'on a fait une étude bibliographique sur le rôle des extraits des plantes médicinales qui induit l'apoptose.

Nous avons utilisé l'extrait aqueux de *Phyllanthus urinaria* ; le curcumine l'extrait du rhizome de *Curcuma longa*, et l'extrait méthanolique (l'acétate d'acétoxychavicol) du rhizome d'*Alpinia galanga*, qui ont un pouvoir pro-apoptotique.

Ces résultats pourraient constituer une base scientifique solide pour la recherche de nouveaux composants anticancéreux naturels, complémentaires à la thérapie chimique existante.

Les mots clés : L'apoptose, caspases, BCL2, activité pro-apoptotique, les extraits des plantes.

ABSTRACT

Since millenia, the products of natural origin were used by the man like remedy in traditional medicine. Recent research revealed that such natural substances are able to prevent the appearance and to block the development of many cancers, for this reason one made a bibliographical study on the role of the extracts of the plants medicinal which induces the apoptose.

We used the aqueous extract of *Phyllanthus urinaria*. Curcumin extracts it from the rhizome from *Curcuma longa*, and the extract methanolic (the acetate of acétoxychavicol) of the rhizome of *Alpinia galanga*, which have a capacity pro-apoptotique.

These results could constitute a solid scientific base for research the new ones compose anti-cancer natural, complementary to the existing chemical therapy.

ملخص

منذ آلاف السنين، المواد ذو الصلة الطبيعية كانت تستعمل من طرف الإنسان من اجل العلاج في الطب التقليدي.

الأبحاث الحديثة بينت أن هذه المواد الطبيعية قابلة لمنع ظهور أو نمو عدة أمراض سرطانية لأجل هذه الأسباب
أجرينا هذه الدراسة المرجعية حول هدف مستخلصات النباتات الطبية التي تؤدي إلى الموت المبرمج
استعملنا المستخلص المائي لاوريناريا فيلاننتوس و مستخلص جذر الكركم و مستخلص جذر الخولجان الذين لديهم
القدرة لتفعيل الموت المبرمج .

هذه النتائج يمكن أن تكون قاعدة علمية صلبة من اجل البحث على مكونات طبيعية إضافية صد السرطان للعلاج
الكيميائي الموجود حاليا.

| | | |
|--|---------------------------|--|
| NOM : | PRENOM : | Date de soutenance : 05/06/2016 |
| ABDELALI KHELIFI TOUHAMI LEMOUDA | FAIZA RANDA KHAOULA | |

Thème :

Etude bibliographique sur les extraits des plantes médicinales et leurs effets pro-apoptotique

Résumé:

Depuis des millénaires, les produits d'origine naturelle ont été utilisés par l'homme comme remède en médecine traditionnelle. Les recherches récentes ont révélé que de telles substances naturelles sont capables d'empêcher l'apparition et de bloquer le développement de nombreux cancers, c'est pour cette raison qu'on a fait une étude bibliographique sur le rôle des extraits des plantes médicinales qui induit l'apoptose.

Nous avons utilisé l'extrait aqueux de *Phyllanthm urinaria*. La curcumine l'extrait du rhizome de *Curcuma longa*, et l'extrait méthanolique (l'acétate d'acétoxychavicol) du rhizome d'*Alpinia galanga*, qui ont un pouvoir pro-apoptotique.

Ces résultats pourraient constituer une base scientifique solide pour la recherche de nouveaux composants anticancéreux naturels, complémentaires à la thérapie chimique existante.

LES MOTS CLES :

L'apoptose, caspases, BCL2, activité pro-apoptotique, les extraits des plantes

**Université des frères Mentouri constantine
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de la biologie animale**

Jury d'évaluation :

Président du jury : LALAOUI KORAICHI (Prof-UFM Constantine).
Rapporteur : IHOUAL SAFIA (MAA-UFM Constantine).
Examineurs : BOUBEKRI NASSIMA (MCB-UFM Constantine).
HABBACHI Wafa (MCB-UBM Annaba).

