

# **UNIVERSITE DE LIMOGES**

**ECOLE DOCTORALE n°258 : Science – Technologie – Santé**

**Faculté de PHARMACIE**

Année : 2004

Thèse N°

## **THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

**Discipline / Spécialité : Biologie Cellulaire et Biologie moléculaire**

présentée et soutenue par

**Pierre-Olivier HARMAND**

le 26 Octobre 2004

**Etude du processus apoptotique induit par l'acide ursolique sur  
deux lignées cellulaires humaines de la peau :**

**-les cellules HaCaT dérivées de kératinocytes humains**

**-les cellules M4Beu issues d'un mélanome humain**

**Thèse dirigée par Mme le Professeur Christiane DELAGE**

### **JURY :**

Mme CHARVERON M.	Docteur en Pharmacie	(Université de Toulouse)	Rapporteur
M. MAURIZIS JC.	Chargé de Recherche	(Université de Clermont-Ferrand)	Rapporteur
Mme le Pr. DELAGE C.	Professeur	(Université de Limoges)	Juge
M. le Pr DUROUX JL.	Professeur	(Université de Limoges)	Président
M. DUVAL R.	Maître de Conférences	(Université de Nancy)	Juge
M. SIMON A.	Maître de Conférences	(Université de Limoges)	Juge

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTÉ DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard  
Madame le Professeur CHULIA Dominique  
ASSESEURS : Monsieur COMBY Francis, Maître de Conférences

### PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE
	CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE et BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE et MINERALE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE et CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame ROCHE Doriane

# Remerciements

## **A Madame le Professeur Christiane DELAGE**

Professeur des Universités de Chimie Physique et Minérale  
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges  
UPRES EA 1085 Biomolécules et cibles cellulaires tumorales  
Directeur de Thèse

Recevez mes plus sincères remerciements pour la bienveillance avec laquelle vous m'avez accueillie dans votre service, pour la confiance que vous m'avez accordée et pour votre soutien précieux qui a fait progresser ce travail.

Je tiens à vous exprimer ma gratitude, mon estime et mon profond respect.

## **A Monsieur Alain SIMON**

Maître de Conférences des Universités de Chimie Physique et Minérale  
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges  
Co-directeur de Thèse

Tu as suivi ce travail pas à pas ; je t'adresse ma sincère reconnaissance pour tes conseils, ta disponibilité, ton soutien, ils ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je suis particulièrement honoré de ta présence dans ce jury de thèse. Soit assuré de ma gratitude et de mon amitié.

## **A Madame Marie CHARVERON**

Directeur de recherche à « European Skin Research Center » - Pierre Fabre Research Institut  
Institut de recherche de Biologie Cellulaire à Toulouse

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Veuillez recevoir mes sincères remerciements et l'assurance de mon profond respect.

## **A Monsieur Jean-Claude MAURIZIS**

Chercheur CNRS  
Unité 484, Centre Jean Perrin, INSERM Rhône-Alpes-Auvergne

Je suis très heureux que vous ayez accepté d'être le rapporteur de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur Jean-Luc DUROUX**

Professeur des Universités de Biophysique  
Faculté de Pharmacie, Université de Limoges  
UPRES EA 1085 Biomolécules et cibles cellulaires tumorales

Je suis particulièrement honoré de votre présence dans ce jury de thèse. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements et toute ma gratitude.

**A Monsieur Raphaël DUVAL**

Maître de Conférences des Universités de Microbiologie Moléculaire  
Faculté de Pharmacie, Université de Nancy  
UMR UHP-CNRS 7565 "Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes"

Les remerciements exprimés ici ne seront jamais à la hauteur de ton implication dans la réalisation de ce travail de thèse. Je souhaite t'exprimer toute ma reconnaissance pour ton aide, ton soutien sans faille, tes nombreux conseils avisés, ta disponibilité, ton dynamisme, ta volonté, ton abnégation et ta bonne humeur. Sois assuré, Raphaël, de mon respect, de ma gratitude et de toute mon estime. Plus qu'un frère d'arme, tu es un ami.

### **A Monsieur Bertrand LIAGRE**

Maître de Conférences des Universités de Biochimie et Biologie Moléculaire  
Faculté de Pharmacie de Limoges  
UPRES EA 1085 Biomolécules et cibles cellulaires tumorales

En témoignage du temps que tu m'as accordé pour mes recherches en biologie moléculaire et lors de mon apprentissage de la technique RT-PCR, je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide, ta sympathie, tes conseils avisés et la confiance que tu m'as accordée. Sois assuré, Bertrand, de mon profond respect et de mon amitié sincère.

### **A Madame Chantal JAYAT-VIGNOLES**

Responsable scientifique du service commun de cytométrie en flux  
Faculté des Sciences de Limoges

J'ai cœur à t'adresser mes plus sincères remerciements pour tes conseils, ton dévouement, tes compétences, ta patience et surtout pour tout le temps que tu m'as accordé lors de la réalisation de mes articles et de mon travail de thèse concernant la cytométrie en flux. Tu as largement contribué à l'aboutissement de mes travaux. Sois assurée, chère Chantal, de toute ma gratitude, de mon profond respect et de ma sympathie.

### **A Madame Jeanne COOK-MOREAU**

Maître de Conférences des Universités d'immunologie  
Faculté de Médecine de Limoges

Je tiens à t'exprimer ma reconnaissance pour le temps passé à corriger mes publications en anglais, après les avoir lues et relues encore. En remerciement de ta disponibilité, de ton dévouement, de ta gentillesse et de ta bonne humeur, chère Jeanne crois en ma gratitude et toute ma sympathie.

- Ces travaux de recherche ont été réalisés grâce à l'obtention d'une bourse FSE, attribuée par le Conseil Régional du Limousin.

- Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude à M. le Dr. WUYTS, Président du Comité de la Ligue contre le Cancer de la Corrèze pour son soutien financier à la réalisation de ce travail.

- Enfin je remercie tous ceux et celles au sein des Facultés de Pharmacie et de Médecine qui, à titre divers, m'ont aidé et soutenu dans toutes les situations et les circonstances.

### **A ma famille,**

A mes Parents, Jean-Noël et Françoise,

Je vous remercie pour votre Amour, votre aide, votre soutien, vos sacrifices, votre abnégation, pour m'avoir toujours écouté sans jamais avoir vraiment compris tout ce que je disais, pour vos encouragements, vos nombreux conseils avisés, votre éternelle disponibilité, vos « coups de pied au cul » et surtout votre éducation. Ce que vous m'avez inculqué, donné, apporté et offert ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je ne vous serai jamais assez reconnaissant de ce que vous avez fait pour moi. Je souhaite pour cela vous exprimer tout mon Amour et mon éternel affection.

A ma Sœur, Isabelle,

Je tiens à te remercier pour cette affection d'ainée, cette attention féminine et ce regard fraternel que tu as toujours eu pour moi. Je tiens tout particulièrement à souligner ton courage et ta volonté dans le drame que tu as combattu et traversé. De ces deux vertus, tu en as fait ta force que tu as su insuffler à tous ceux qui furent perdus à ce moment-là. Sache, Zabou, que ton exemplarité est un atout majeur dans ma vie ; et sois assuré de tout mon Amour, mon profond respect et de mon admiration.

A mes Grands Parents,

Je tiens à vous remercier pour l'Amour et l'affection que vous avez m'apporté, mais aussi pour avoir su éveiller en moi la découverte de la nature et des sciences. Je tiens à vous exprimer tout mon Amour.

A ma Compagne, Virginie,

Les remerciements exprimés ici ne seront jamais à la hauteur de l'aide que tu m'as apporté dans la réalisation de ce travail de thèse. Je souhaite sincèrement t'exprimer toute ma reconnaissance, pour tes conseils avisés, parfois sévères mais toujours justes, tes connaissances, ta volonté, tes sacrifices, ta disponibilité lors de mon apprentissage des techniques biomoléculaires et, surtout, ta compréhension, ton aide, ton soutien moral et ton affection. Tu as toujours été présente au moment où j'ai cru faillir, aux moments les plus dures, les plus difficiles ; je ne t'ai pas rendu la tâche facile et pourtant ton soutien, tes colères, tes encouragements, ta force, ta gentillesse et surtout ton Amour, m'ont permis de ne jamais baisser les bras, de me ressourcer et de m'apporter ce qui me manquait le plus dans ces moments-là : la patience, la sagesse et la sérénité, afin de terminer correctement ma thèse. Sois assurée, Virginie, de mon plus grand respect, de ma gratitude, de ma plus haute estime et aussi de recevoir les sentiments affectueux d'un compagnon.

## **A mes amis,**

A tous ceux et celles qui n'ont jamais rien compris à ce que je faisais et à quoi cela allait me mener, à tous ceux et celles qui ont du mal à comprendre mes sacrifices, mes oublis et mes abandons, à tous ceux et celles qui m'ont tout simplement soutenu(e)s et aimé(e)s pour ce que je suis.

A mes amis d'enfance, Franck, Matthieu, Alexandra, Karine, "Mouloud", Vincent ...

A mes amis de Fac, Arnaud, Ludo, Nicolas, Marlène, Océanne, Karine, Tatiana, Nadia, Emmanuel, Olivier, Alexandra ...

A mes amis de thèse,

A tous les moments passés ensemble à apprendre, à se soutenir et à ripailler. A notre Amitié. Lucie, sans qui je ne serai jamais venu à Limoges, je te dois beaucoup et plus encore. Je tiens à t'exprimer ma gratitude et surtout toute mon amitié.

Cécile, en souvenir des manipulations de RT-PCR et de western blots réalisés ensemble, je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide et tes précieux conseils.

A tout ce que nous avons traversé. So long, la Rouanaise !

Yves, "notre ingénieur en Reumeuneuneu", malgré nos différences de santé et de morphologie, tu as toujours été présent pour me guider et me soutenir. A notre amitié, née autour du squash, des cartes, des "glouglous" et de tout ce qui nous reste à faire encore.

Raphaël, au « Gros », l'épicurien-travailleur : les yeux sur les cellules et le nez dans une chopine. Frères d'armes, nous avons été ; amis nous resterons !

David, le junior de la bande, trois poumons, quatre estomacs, toujours souriant et prêt à aider autrui. Sois sûr de mon amitié « Gamin », je serai toujours là pour guider tes pas de Padawan. Ne porte pas l'anneau et que la Force soit avec toi !

Stéphane, pharmacien, poète, rêveur, sportif, appréciant la bonne chair. Tu inspires la sérénité.

Serge, Bertrand, Claude, Patrick, Philippe, Sylvie à vos conseils en tant que MCU et à notre amitié.

**« A Cœur Vaillant, rien n'est impossible »**

Jacques CŒUR (1395-1456)

**A mes Parents,**

**A ma Sœur,**

**A mes Grands-parents,**

**A mes Amis**

**A Virginie,**



## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>12</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE I : L'ACIDE URSOLIQUE .....</b>	<b>16</b>
I. HISTORIQUE.....	17
II. DISTRIBUTION DANS LE RÈGNE VÉGÉTAL .....	17
III. PRINCIPAUX EFFETS BIOLOGIQUES .....	18
III.1. Effet anti-bactérien et anti-fongique.....	18
III.2. Effet anti-viral .....	19
III.3. Effet hépatoprotecteur.....	20
III.4. Effet anti-inflammatoire .....	20
III.5. Effet anti-tumoral .....	21
III.6. Effet anti-prolifératif.....	22
III.7. Effet pro-apoptotique.....	23
IV. TRAVAUX EFFECTUÉS AU SEIN DU LABORATOIRE.....	24
<b>CHAPITRE II : LA PEAU, LES TUMEURS ET LES LIGNÉES ÉTUDIÉES .....</b>	<b>26</b>
I. LA PEAU.....	27
I.1. Description.....	28
I.2. Agression solaire.....	34
II. LES TUMEURS .....	36
II.1. Les carcinomes .....	36
II.2. Les mélanomes.....	37
III. LES LIGNÉES ÉTUDIÉES.....	45
III.1. Lignée HaCaT .....	45
III.2. Lignée M4Beu.....	49
<b>CHAPITRE III : L' APOPTOSE .....</b>	<b>50</b>
I. DIFFÉRENTS TYPES DE MORT CELLULAIRE : NÉCROSE ET APOPTOSE .....	52
I.1. Nécrose.....	52
I.2. Apoptose.....	52
II. IMPORTANCE DU PROCESSUS APOPTOTIQUE.....	53
II.1. Rôle physiologique.....	53
II.2. Apoptose et pathologies .....	55
III. MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES CARACTÉRISTIQUES DE L' APOPTOSE .....	57
III.1. Cytoplasme .....	57
III.2. Organites intracellulaires.....	58
III.3. Noyau.....	58
III.4. Membrane cytoplasmique.....	59
IV. PHASES ET MÉCANISMES GÉNÉRAUX DE L' APOPTOSE.....	60
IV.1. Phase d'initiation.....	64
IV.2. Phase de régulation des voies intrinsèque et extrinsèque, par les protéines membres de la famille Bcl-2 .....	87
IV.3. Phase d'exécution par les caspases.....	92
IV.4. Autres mécanismes régulant l'apoptose .....	110
<b>MATERIEL &amp; METHODES.....</b>	<b>130</b>
I. ACIDE URSOLIQUE .....	131
II. CULTURE CELLULAIRE.....	131
II.1. Lignées cellulaires .....	131
II.2. Conditions de culture des lignées cellulaires étudiées.....	133
III. TECHNIQUES D'ÉTUDE DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE .....	136
III.1. Technique d'exclusion du bleu trypan .....	136
III.2. Technique du MTT.....	136
IV. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX (CMF) .....	138
IV.1. Principe .....	138
IV.2. Protocole opératoire.....	138
V. ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARN MESSAGERS PAR LA TECHNIQUE DE RÉTROTRANSCRIPTION - RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (RT-PCR).....	141

V.1. Principe.....	141
V.2. Protocole opératoire.....	143
VI. ETUDE <i>IN SITU</i> DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNOFUORESCENCE INDIRECTE.....	149
VI.1. Principe.....	149
VI.2. Protocole opératoire.....	150
VII. ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR LA TECHNIQUE DE "WESTERN BLOT".....	153
VII.1. Principe.....	153
VII.2. Protocole opératoire.....	155
VIII. MISE EN ÉVIDENCE DES ACTIVITÉS CASPASES PAR MARQUAGE <i>IN SITU</i> À L'AIDE DU MARQUEUR FITC-VAD-FMK.....	160
VIII.1. Principe.....	160
VIII.2. Protocole opératoire.....	162
IX. ETUDE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES CASPASES : DOSAGE PAR SPECTROFLUOROMÉTRIE.....	162
IX.1. Principe.....	163
IX.2. Protocole opératoire.....	164
X. ETUDE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL, EN CYTOMÉTRIE DE FLUX, PAR UN DOUBLE MARQUAGE (TOTO-3 / JC-1) ET EN MICROSCOPIE À FLUORESCENCE PAR UN MARQUAGE <i>IN SITU</i> (JC-1).....	167
X.1. Analyse en cytométrie de flux du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par un double marquage TOTO-3 / JC-1.....	169
X.2. Etude <i>in situ</i> du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par simple marquage avec la sonde JC-1 : observation en microscopie à fluorescence.....	172
XI. STATISTIQUES.....	173
<b>RESULTATS.....</b>	<b>174</b>
<b>CHAPITRE I : LIGNÉE CELLULAIRE HACAT.....</b>	<b>175</b>
I. ÉVALUATION DU POTENTIEL ANTI-PROLIFÉRATIF DE L'ACIDE URSOLIQUE.....	175
I.1. Technique du MTT.....	175
I.2. Technique du bleu trypan.....	177
I.3. Etude comparative de la viabilité des cellules HaCaT en présence d'acide ursolique. Techniques du MTT et du bleu trypan.....	178
II. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES HACAT, PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX.....	179
II.1. Etude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.....	179
II.2. Mise en évidence d'une population cellulaire apoptotique : présence d'un pic sub-G1.....	180
III. PROTÉINES P53 ET P21. ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARNm ET DES PROTÉINES.....	182
III.1. Etude de p53.....	182
III.2. Etude de p21.....	186
IV. ETUDE DU PROCESSUS APOPTOTIQUE DÉPENDANT DE L'ACTIVATION DES CASPASES.....	191
IV.1. Etude de l'activation des caspases par marquage <i>in situ</i> des cellules HaCaT à l'aide du substrat-inhibiteur de caspases FITC-VAD-FMK.....	191
IV.2. Etude des activités caspases.....	194
V. ETUDE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ ).....	207
V.1 Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial par marquage <i>in situ</i> avec le fluorochrome JC-1.....	207
V.2. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial en cytométrie de flux.....	209
VI. ETUDE DES MOLÉCULES APOPTOGÈNES LIBÉRÉES À PARTIR DE LA MITOCHONDRIE : CYTOCHROME C ET « APOPTOSIS INDUCING FACTOR » (AIF).....	220
VI.1. Etude du cytochrome c par immunofluorescence indirecte.....	220
VI.2. Etude de l'« Apoptosis Inducing Factor » (AIF).....	222
VII. BAX ET BCL-2. ETUDES DES EXPRESSIONS DES ARNm ET DES PROTÉINES.....	225
VII.1. Etude de Bax.....	225
VII.2. Etude de Bcl-2.....	228
VII.3. Etude du ratio Bax / Bcl-2.....	230
<b>CHAPITRE II : LIGNÉE CELLULAIRE M4BEU.....</b>	<b>232</b>
I. ÉVALUATION DU POTENTIEL ANTI-PROLIFÉRATIF DE L'ACIDE URSOLIQUE.....	232
II. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES M4BEU PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX.....	234
II.1. Etude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.....	234
II.2. Mise en évidence d'une population cellulaire apoptotique : présence d'un pic sub-G1.....	235
III. PROTÉINES P53 ET P21. ETUDES DES EXPRESSIONS DES ARNm ET DES PROTÉINES.....	237
III.1. Etude de p53.....	237

IV. ETUDE DES ACTIVITÉS CASPASES .....	246
IV.1. Etude de la caspase-3 .....	246
IV.2. Etude de la caspase-1 .....	249
IV.3. Etude de la caspase-8 .....	252
IV.4. Etude de la caspase-9 .....	254
IV.5. Etude comparative de l'activité enzymatique des caspases étudiées .....	257
V. ETUDE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ( $\Delta\Psi_M$ ).....	259
V.1 Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial par marquage in situ avec le fluorochrome JC-1 .....	259
V.2. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial en cytométrie de flux.....	261
VI. ETUDE DES MOLÉCULES APOPTOGÈNES LIBÉRÉES À PARTIR DE LA MITOCHONDRIE : CYTOCHROME C ET « APOPTOSIS INDUCING FACTOR » (AIF) .....	272
VI.1. Etude du cytochrome c par immunofluorescence indirecte .....	272
VI.2. Etude de l'« Apoptosis Inducing Factor » (AIF) .....	274
VII. PROTÉINES BAX ET DE BCL-2 : ÉTUDES DES EXPRESSIONS DES ARNm ET DES PROTÉINES .....	277
VII.1. Etude de Bax.....	277
VII.2. Etude de Bcl-2 .....	281
VII.3. Etude du ratio Bax / Bcl-2 .....	284
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>287</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>303</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>306</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>339</b>

# **INTRODUCTION**

Nous avons effectué notre travail de thèse au sein de l'EA 1085 de la Faculté de Pharmacie de Limoges, équipe intitulée « Biomolécules et cibles cellulaires tumorales - Prolifération cellulaire et expression enzymatique ». Dans ce cadre, nous avons étudié les effets pro-apoptotiques d'une biomolécule d'origine végétale, l'acide ursolique, sur des cellules de la peau : les cellules HaCaT dérivées de kératinocytes humains et les cellules M4Beu issues d'un mélanome humain.

L'acide ursolique est un triterpène pentacyclique contenu dans certains fruits et plantes. De nombreux travaux, principalement réalisés ces dix dernières années, lui attribuent des propriétés biologiques pléiotropiques : anti-bactérienne, anti-fongique, hépatoprotectrice, anti-inflammatoire, anti-proliférative, anti-tumorale... Depuis plusieurs années, les travaux de recherche effectués au sein de l'équipe, ont largement contribué à approfondir les connaissances physico-chimiques et biologiques de l'acide ursolique. En particulier, il a été mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires de cette molécule, propriétés dues à son potentiel anti-lipoxygénase et anti-cyclooxygénase. Il a été montré aussi l'effet anti-prolifératif de l'acide ursolique sur de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et notamment sur des cellules murines B16, issues d'un mélanome. Parmi les mécanismes d'action qui, sur ces lignées cellulaires, entraînent une inhibition de la prolifération, il a été montré entre autre, que l'acide ursolique induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 sur les cellules B16 et que cette biomolécule induit un effet pro-apoptotique sur des cellules DAUDI, issues d'une lignée lymphomateuse.

Bien que possédant des vertus biologiques intéressantes, l'acide ursolique n'a pas trouvé sa place dans l'arsenal thérapeutique, sans doute par un manque de spécificité, mais aussi par un manque d'efficacité par rapport aux molécules déjà disponibles sur le marché. C'est ainsi qu'actuellement, l'acide ursolique est utilisé uniquement en cosmétologie dans des crèmes revitalisante et anti-âge, grâce à ses propriétés pro-collagène et anti-élastase.

Dans la continuité des travaux menés sur l'acide ursolique au sein de notre laboratoire et en particulier de son action sur les cellules B16, mais aussi en tenant compte de son utilisation en cosmétologie, il nous a paru intéressant de savoir si, au-delà de ses effets bénéfiques pour la peau, cette molécule pouvait être utilisée dans la prévention ou le développement de nouvelles voies thérapeutiques des cancers cutanés.

Depuis 50 ans, la fréquence des cancers de la peau, carcinomes et mélanomes sont en constante augmentation chez les populations blanches. Parmi ces cancers, le mélanome représente en France comme dans la plupart des pays occidentaux, un problème important de santé publique par sa fréquence, sa létalité, notamment en cas de prise en charge tardive de la

lésion initiale. Malgré les différentes mesures de prévention, l'incidence de ce cancer de la peau fait plus que doubler tous les dix ans. Les facteurs de risque des cancers cutanés sont relativement bien connus : exposition solaire intense, lampes à bronzer, préexistence de naevus, et certains facteurs de prédisposition génétique sont également en cause. La gravité du pronostic de cancer en cas de découverte tardive et l'identification des facteurs de risque sur lesquels il est possible d'agir convergent fortement vers la nécessité d'intensifier les mesures de prévention. Ces mesures doivent concerner l'ensemble des cancers cutanés, compte tenu de leurs facteurs de risques commun.

Aussi l'objectif de notre travail de thèse a été d'étudier sur deux lignées cellulaires de la peau, les effets de l'acide ursolique et les mécanismes d'actions associés, de façon à mieux appréhender le potentiel de cette molécule dans la prévention ou le traitement des cancers cutanés. Pour cela, nous avons choisi deux modèles cellulaires de la peau, les cellules HaCaT et les cellules M4Beu. Les cellules HaCaT sont issues de kératinocytes humains spontanément immortalisés : *in vitro* ces cellules sont considérées comme un modèle de kératinocytes avec toutes les caractéristiques qui en découlent, mais du fait de leur immortalisation elles sont quelquefois considérées également comme un modèle pour étudier les cancers épidermiques. En ce qui concerne les cellules M4Beu, ce sont des cellules cancéreuses issues d'un mélanome humain.

Dans notre étude expérimentale, nous avons étudié successivement sur ces deux lignées cellulaires l'effet anti-prolifératif de l'acide ursolique, son action au niveau du cycle cellulaire, et son effet pro-apoptotique. L'apoptose est définie comme une mort génétiquement programmée des cellules : elle intervient aussi bien en conditions physiologiques, lors de l'élimination de cellules superflues ou dangereuses pour l'organisme, que dans le développement de certaines pathologies où elle peut être selon le cas, en excès ou en déficit. Lors du processus apoptotique induit par l'acide ursolique, nous avons recherché les différents marqueurs biochimiques associés à ce processus. Nous avons également étudié les différentes voies de transduction du signal apoptotique induit par cette molécule.

Préalablement à l'étude expérimentale, nous avons fait une étude bibliographique sur l'acide ursolique, la peau et les cancers associés, le cycle cellulaire ainsi que l'apoptose.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **CHAPITRE I : L'Acide Ursolique**



## I. Historique

L'acide ursolique est un triterpène pentacyclique isolé pour la première fois par Trommsdorff à partir des feuilles d'*Arctostaphylos uva ursi* : il appelle cette molécule urson (Gintl, 1893).

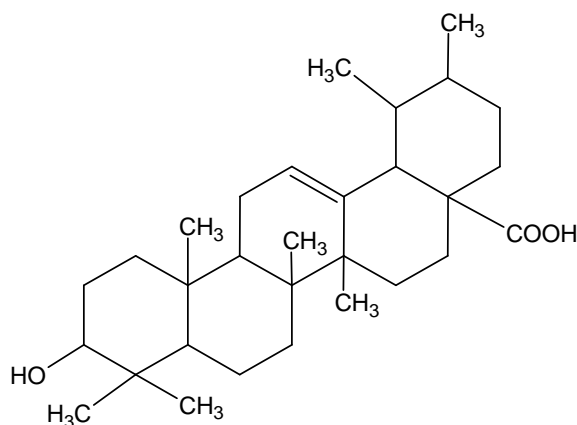
En 1893, Gintl en donne la formule brute ( $C_{30}H_{48}O_3$ ) et un point de fusion compris entre 263 et 266°C.

En 1910, Power et Moore l'isolent de nouveau à partir des feuilles de *Prunus serotina* et déterminent un nouveau point de fusion compris entre 275 et 277°C ; ils l'appellent prunol, pensant avoir isolé un isomère de l'urson.

En 1923, Sando l'isole à partir d'épluchures de pommes et détermine un autre point de fusion compris entre 284 et 285°C ; il l'appelle malol. Il s'agit toujours de la même molécule, l'acide ursolique, dont le point de fusion est compris entre 285 et 288°C.

En 1945, Ruzicka et coll. déterminent la structure plane de l'acide ursolique (Figure 1).

En 1992, Simon et coll. ont établi la structure cristallographique de ce triterpène.



**Figure 1** : Formule développée de l'acide ursolique.

## II. Distribution dans le règne végétal

L'acide ursolique est largement distribué dans le règne végétal. Il est présent dans de nombreuses familles de plantes : Sapotacées (Gupta *et al.*, 1969), Ericacées, Oléacées, Labiées et Caprifoliacées (Pellecuer *et al.*, 1970 ; Susplugas *et al.*, 1970), Rosacées (Trumbull *et al.*, 1976), Euphorbiacées (Fang *et al.*, 1985).

Parmi les principales plantes européennes qui contiennent de l'acide ursolique et qui sont utilisées en médecine traditionnelle, nous pouvons citer :

- la busserole (*Arctostaphylos uva-ursi*) reconnue pour ses propriétés diurétique, antiseptique, anti-putride. Cette plante est également utilisée pour ses propriétés astringentes intestinales ainsi que contre certaines infections, notamment des voies urinaires.

- le thym (*Thymus vulgaris*) aux vertus antiseptiques, utilisé comme expectorant et spasmolytique bronchique, est aussi préconisé dans les états inflammatoires des voies respiratoires supérieures.

- le lierre terrestre (*Glechoma hederacea*) aux vertus pectorales, utilisé dans des cas de bronchites chroniques comme expectorant.

- le romarin (*Rosmarinus officinalis*) efficace dans le traitement de gastralgies, des dyspepsies et de l'eczéma. Il facilite aussi la cicatrisation.

- la bruyère commune (*Calluna vulgaris*) aux propriétés diurétique et antiseptique, est aussi préconisée contre l'insuffisance cardiaque, les rhumatismes et la goutte.

- la sauge (*Salvia officinalis*), utilisée contre la diarrhée, la dysenterie. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires, mais aussi des vertus antiseptique et cicatrisante contre les infections touchant la sphère buccale, la gorge, les poumons, la vessie.

- le basilic (*Ocimum basilicum*) utilisé pour des propriétés antispasmodique, antiseptique intestinal et emménagogue. Il peut être aussi employé comme anti-dépresseur, hypotenseur, anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique.

La plupart de ces plantes, riches en acide ursolique, sont surtout connues en médecine traditionnelle de façon empirique, pour leurs vertus thérapeutiques.

### **III. Principaux effets biologiques**

Les travaux effectués jusqu'à ce jour sur l'acide ursolique font apparaître des effets biologiques pléiotropiques : anti-bactérien, anti-fongique, anti-viral, hépatoprotecteur, anti-inflammatoire, anti-tumoral, anti-prolifératif et pro-apoptotique.

#### **III.1. Effet anti-bactérien et anti-fongique**

L'équipe de Kowaleski, en 1976, montre que l'acide ursolique empêche la croissance bactérienne de plusieurs souches de Staphylocoques.

En 1987, Zaletova et coll. montrent qu'un traitement par l'acide ursolique inhibe la croissance d'un champignon de type *Microsporium lenosum* et de levures du genre *Candida*.

En 1989, Isobe et coll. montrent que l'acide ursolique extrait de *Leucoseptrum stellipillum* a une activité anti-bactérienne contre *Streptococcus mutans*.

En 1995, Sattar et coll. rapportent que l'acide ursolique contenu dans les plantes de la famille des *Lamiaceae* a une activité anti-bactérienne mais aussi une activité anti-fongique.

En 2001, Chattopadhyay et coll. confirment l'effet anti-bactérien de l'acide ursolique contre plusieurs espèces de Staphylocoques : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, mais aussi contre d'autres bactéries : *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, ainsi que son effet anti-fongique contre *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporium gypseum*.

En 2003, Chandramu et coll. montrent que l'acide ursolique extrait de *Vitex negundo L.*, plante de la famille des *Verbenaceae* a un effet anti-bactérien contre *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*.

### **III.2. Effet anti-viral**

L'acide ursolique extrait du lierre terrestre, *Glechoma hederaceae L.*, est capable d'inhiber, *in vitro*, l'activation du virus Epstein-Barr induit par le 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) dans des cultures de cellules Raji (lymphomes de Burkitt). Son activité est comparable à celle de deux anti-tumoraux reconnus : l'acide rétinoïque et l'acide glycyrrhétinique (Ohigashi *et al.*, 1986). Ces travaux ont été confirmés en 2002, par Taniguchi et coll., et en 2004 par Banno et coll. Ces auteurs ont montré que l'acide ursolique, extrait respectivement à partir du Néflier du Japon (*Eriobotrya japonica*) et de la périlla pourpre ou verte appelée aussi sésame sauvage (*Perilla frutescens L.*) a un effet inhibiteur sur l'activation du virus Epstein-Barr induit par le TPA sur des cellules de Raji.

L'acide ursolique possède une activité inhibitrice sur la protéase du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine de type 1) (Xu *et al.*, 1992 ; Ma *et al.*, 1999 ; Min *et al.*, 1999 ; Baglin *et al.*, 2003), en empêchant sa dimérisation (Quere *et al.*, 1992). Ainsi, cette protéase ne peut plus cliver les précurseurs protéiques viraux en protéines matures. Cette inhibition empêche ainsi la formation de nouveaux virions.

### III.3. Effet hépatoprotecteur

La cholestase est l'ensemble des manifestations liées à la diminution ou à l'arrêt de la sécrétion biliaire. L'injection chez le rat de paracétamol modifie les paramètres biochimiques hépatiques, en induisant la cholestase et une réduction de la viabilité des hépatocytes ; l'administration d'acide ursolique antagonise ces effets de manière dose-dépendante, traduisant alors une action anti-cholestatique et hépatoprotectrice (Shukla *et al.*, 1992). L'acide ursolique a un potentiel hépatoprotecteur contre le paracétamol, mais aussi contre le tétrachlorure de carbone, l'acétaminophène et le chlorure de cadmium. En effet, sur des rats, ce triterpène diminue les lésions causées par ces agents hépatotoxiques (Liu *et al.*, 1994 ; Liu *et al.*, 1995).

L'acide ursolique, isolé de l'eucalyptus hybride *Eucalyptus tereticornis*, montre *in vivo* une activité hépatoprotectrice dose dépendante contre la thioacétamide, la galactosamine et l'éthanol, agents qui induisent une hépatotoxicité chez le rat (Saraswat *et al.*, 1996 ; Saraswat *et al.*, 2000).

### III.4. Effet anti-inflammatoire

Le potentiel anti-inflammatoire de l'acide ursolique est attribué aux activités suivantes :

- Activité anti-œdémateuse :

*In vivo*, sur des oreilles de souris, l'acide ursolique diminue la formation de l'œdème provoqué par un traitement à la carragénine (Kosuge *et al.*, 1985). De même, sur la peau de souris, l'acide ursolique diminue l'œdème provoqué dans ce cas par un traitement avec l'ester de phorbol TPA (Recio *et al.*, 1991 ; Recio *et al.*, 1995 ; Manez *et al.*, 1997).

En 1990, Hirota et coll. ont supprimé l'inflammation induite par un autre ester de phorbol, le 12-*O*-hexadecanoyl-16-hydroxyphorbol-13-acetate, par application au préalable d'acide ursolique sur la peau de rats.

En 2004, Banno et coll. confirment l'effet inhibiteur de l'acide ursolique sur l'inflammation induite par le TPA, sur la peau de souris.

- Activité anti-allergique :

- anti-histaminique

L'histamine libérée des granules de mastocytes est un des principaux médiateurs de l'inflammation et de l'allergie.

Au cours du traitement des mastocytes de rat par de la concanavaline A (activateur du processus inflammatoire), l'acide ursolique inhibe de manière dose-dépendante le relargage de l'histamine (Tsuruga *et al.*, 1991).

- anti- $\beta$ -hexosaminidase

La  $\beta$ -hexosaminidase, enzyme lysosomiale allergisante, est stockée dans les mêmes granules des mastocytes que l'histamine. Lors de l'activation des mastocytes, la  $\beta$ -hexosaminidase est libérée de manière concomitante à l'histamine. Ainsi comme l'histamine, la  $\beta$ -hexosaminidase est considérée comme un marqueur de dégranulation des mastocytes et plus généralement du processus inflammatoire et allergique. *In vitro*, l'acide ursolique inhibe de manière dose-dépendante le relargage de la  $\beta$ -hexosaminidase des cellules RBL-2H3 (mastocytes de rat) (Ryu *et al.*, 2000).

- Activité anti-élastase leucocytaire :

L'élastase leucocytaire humaine (HLE) est une enzyme lysosomiale dont la libération dans les tissus entraîne de nombreuses pathologies, telles que emphysèmes pulmonaires ou encore la polyarthrite rhumatoïde. L'acide ursolique, évalué sur cette enzyme, montre une activité anti-élastase et, donc, un effet anti-inflammatoire (Ying *et al.*, 1991 ; Liu *et al.*, 1995 ; Safayhi *et al.*, 1997 ; Mitaine-Offer *et al.*, 2002).

- Activité sur le métabolisme de l'acide arachidonique :

Les cyclooxygénases et les lipoxygénases sont des enzymes qui oxydent l'acide arachidonique, respectivement en prostaglandines et en leucotriènes, médiateurs impliqués dans les phénomènes inflammatoires. L'acide ursolique est capable d'inhiber *in vitro* l'activité de ces enzymes dans les cellules leucémiques HL60 (Najid *et al.*, 1992).

En 1998, Ringbom et coll. montrent l'effet inhibiteur de l'acide ursolique sur la cyclooxygénase 2 (Cox-2), enzyme majeure impliquée dans l'inflammation et l'apoptose.

Des travaux plus récents, sur des cellules épithéliales mammaires, confirment l'activité inhibitrice spécifique de l'acide ursolique sur la Cox-2 (Subbaramaiah *et al.*, 2000).

### **III.5. Effet anti-tumoral**

En 1986, Ohigashi et coll. ainsi que Tokuda et coll. démontrent *in vitro*, dans des cultures de cellules Raji (lymphomes de Burkitt), l'effet inhibiteur de l'acide ursolique sur des tumeurs induites par l'ester de phorbol TPA. Ces travaux montrent une activité efficace de

l'acide ursolique, comparable à celle de l'acide rétinoïque. L'acide ursolique agirait en bloquant la phase initiale de survenue des tumeurs.

En 1994, Huang et coll. confirment que, sur la souris, l'acide ursolique inhibe le développement des tumeurs induites par le TPA.

En 1994, Lee et coll. montrent que, *in vitro*, l'acide ursolique induit la différenciation des cellules tératoïdes de souris (cellules F9). Les tératoïdes sont des tumeurs se développant au cours de la période embryonnaire. Dans les conditions normales de culture, les cellules F9 présentent une différenciation spontanée très lente et de ce fait ces cellules sont utilisées comme modèle de différenciation tumorale. L'acide ursolique induirait la différenciation de ces cellules en régulant l'expression de gènes par interaction avec des récepteurs aux glucocorticoïdes (membranaires et nucléaires) (Lee *et al.*, 1994).

En 1996 et 1998, Cha et coll. montrent que l'acide ursolique empêche l'invasion des cellules tumorales HT1080 de la lignée humaine de fibrosarcomes métastatiques par inhibition des métalloprotéinases de la matrice (MMPs), et en particulier de la métalloprotéinase-9. Cette dernière dégrade par clivage protéolytique les composants de la matrice extra-cellulaire, des protéines d'adhérence et des récepteurs membranaires. Cette dégradation de la matrice favorise ainsi le processus invasif des tumeurs.

### **III.6. Effet anti-prolifératif**

En 1976, Trumbull et coll. montrent l'activité anti-proliférative d'un extrait chloroformique contenant de l'acide ursolique. Ce dernier s'est avéré posséder une activité inhibitrice sur des cellules leucémiques P-388.

Depuis, l'activité anti-proliférative de ce triterpène est confirmée sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses telles que les cellules KB de carcinome épithélial (Fojo *et al.*, 1985), les cellules leucémiques HL60 (Miller *et al.*, 1990), les cellules HT1080 métastatiques humaines d'un fibrosarcome (Cha *et al.*, 1996), les cellules A431 responsables d'un carcinome épidermique (Hollosoy *et al.*, 2000), les cellules cancéreuses HCT-15 et HT-29 du colon (Li *et al.*, 2002 ; Andersson *et al.*, 2003).

### III.7. Effet pro-apoptotique

De nombreuses études démontrent que l'acide ursolique induit la mort cellulaire par apoptose, sur différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines.

En 1997, Baek et coll. ainsi que Huang et coll. en 1999, montrent que l'acide ursolique induit l'apoptose sur les cellules leucémiques humaines HL60, par une augmentation du niveau calcique intracellulaire et une fragmentation de l'ADN génomique.

*In vitro*, le traitement de cellules épithéliales mammaires normales de rat par l'acide ursolique entraîne un arrêt du cycle cellulaire, une induction de l'apoptose et une différenciation morphologique (Paik *et al.*, 1998).

En 2000, Kim et coll. étudient également l'effet apoptotique de l'acide ursolique sur des cellules cancéreuses HepG2, issues d'un hépatoblastome humain. Parmi les caractéristiques du processus apoptotique induit par l'acide ursolique, les auteurs montrent la fragmentation de l'ADN, le relargage du cytochrome c par la mitochondrie, une inhibition de la réplication de l'ADN, une réduction du clivage de l'ADN par inhibition de la topoisomérase I et une activation de la caspase-3, protéine impliquée directement dans la mort cellulaire par apoptose.

Des travaux sur des cellules prostatiques humaines montrent également que l'acide ursolique induit l'apoptose. Les auteurs mettent en évidence, lors de ce processus, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et l'activation des caspases-1, -3, -8, -9. Ils mettent également en évidence le clivage protéolytique de protéines cibles spécifiques comme la PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase) impliquée dans la réparation de l'ADN (Choi BM *et al.*, 2000).

L'acide ursolique diminue la viabilité des cellules HL60 et induit l'apoptose par fragmentation de l'ADN en « ladder » ; il segmente le noyau, ce qui est observé sous fluorescence DAPI (Choi YH *et al.*, 2000). Ces auteurs montrent que la voie de signalisation de l'activation des protéines kinases A, dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP), peut être affectée par l'acide ursolique. En effet, cette molécule induit l'apoptose sur les cellules HL60 et agit comme inhibiteur sur l'activation des protéines kinases A. Toutefois, après le traitement de ces cellules par l'acide ursolique, l'addition de cAMP permet de réactiver les protéines kinases A et d'inhiber l'apoptose induite par l'acide ursolique.

L'acide ursolique inhibe la prolifération des cellules cancéreuses du colon HT-29 et induit l'apoptose par activation des caspases-3, -8 et -9. Ces effets anti-prolifératif et pro-

apoptotique pourraient être dûs au fait que l'acide ursolique augmente l'activité de la sphingomyélinase alcaline intestinale. En effet, cette dernière est une enzyme physiologiquement responsable de la digestion des sphingomyélines et qui produit de multiples signaux régulant la différenciation, la prolifération et l'apoptose des cellules intestinales (Andersson *et al.*, 2003).

Hollosoy et coll. en 2001, décrivent l'acide ursolique comme étant une molécule pro-apoptotique sur des lignées cancéreuses de la peau. En effet, ces auteurs montrent que l'acide ursolique inhibe la prolifération cellulaire, arrête le cycle cellulaire en phase G1 et induit l'apoptose sur les cellules A431 provenant d'un carcinome épidermique humain. Leurs travaux montrent que l'acide ursolique induit une diminution de la viabilité cellulaire, et induit une activation protéolytique de la caspase-3 de manière dose-dépendante.

#### **IV. Travaux effectués au sein du laboratoire**

Depuis 1991, les travaux effectués au sein du laboratoire ont porté plus particulièrement sur l'étude phytochimique de la bruyère commune, *Calluna vulgaris*, et sur l'évaluation biologique de l'un de ses constituants, l'acide ursolique.

*Calluna vulgaris* est une plante de la famille des Ericacées ; elle est connue depuis longtemps, en médecine traditionnelle, de manière empirique, pour ses vertus diurétiques et anti-inflammatoires. Afin de donner une base moléculaire aux propriétés anti-inflammatoires de la plante, il a été entrepris une étude phytochimique à partir d'extraits de cette plante, préalablement sélectionnés pour leur potentiel à inhiber les lipoxygénases, enzymes impliquées dans le processus inflammatoire. Chez l'homme, les lipoxygénases oxydent l'acide arachidonique qui est alors métabolisé, en particulier en leucotriènes, médiateurs biologiquement actifs dans les phénomènes de l'inflammation et de la prolifération cellulaire cancéreuse (Samuelsson, 1993).

L'étude réalisée au laboratoire sur un modèle de lipoxygénases végétales a permis d'isoler et d'identifier l'acide ursolique comme étant responsable du potentiel anti-inflammatoire de *Calluna vulgaris* (Simon *et al.*, 1992b).

Ce travail a été complété en utilisant d'autres modèles biologiques qui mettent en jeu les lipoxygénases : macrophages murins, plaquettes humaines, cellules leucémiques HL60 différenciées (utilisées comme modèle de granulocytes). Sur ces différents modèles cellulaires, l'acide ursolique inhibe le métabolisme de l'acide arachidonique (Najid *et al.*,



1992), ce qui confirme le potentiel anti-inflammatoire de la molécule. De nombreux travaux suggèrent l'implication des métabolites de l'acide arachidonique dans le processus inflammatoire, dans la prolifération et la différenciation des cellules cancéreuses et plus particulièrement, ceux issus de la voie des lipoxygénases (Snyder *et al.*, 1986 ; Ondrey *et al.*, 1989 ; Miller *et al.*, 1990). C'est ainsi que des inhibiteurs de la voie des lipoxygénases comme l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) et le BW755C sont également des inhibiteurs de la prolifération des cellules leucémiques HL60. Par analogie avec ces inhibiteurs, il a été évalué et montré le potentiel de l'acide ursolique à inhiber la prolifération des cellules HL60 (Najid *et al.*, 1992 ; Simon *et al.*, 1992b).

Ces résultats ont conduit ensuite à évaluer cette molécule sur d'autres lignées cancéreuses. C'est ainsi que l'acide ursolique inhibe la prolifération des lignées cellulaires suivantes :

- cellules cancéreuses gastriques humaines (HGT-1) (Es-saady *et al.*, 1994),
- cellules cancéreuses issues d'une tumeur spontanée de la peau de souris (B16) avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Es-Saady *et al.*, 1996a),
- cellules cancéreuses mammaires (MCF-7) avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Es-Saady *et al.*, 1996b),
- cellules Daudi issues d'une lignée lymphomateuse. L'acide ursolique inhibe la prolifération en induisant le processus apoptotique. Lors de ce processus, il a été montré les caractéristiques morphologiques de l'apoptose : une perte de l'asymétrie membranaire, une fragmentation de l'ADN et une augmentation du calcium intracellulaire (Lauthier *et al.*, 2000).

Au cours de cette présentation bibliographique de l'acide ursolique, nous avons montré que ce dernier possède de multiples propriétés biologiques. Ce triterpène est aussi utilisé en cosmétologie, car il possède un potentiel inhibiteur de l'induction des MMPs (Cha *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 2003 ; Shishodia *et al.*, 2003), ce qui pourrait expliquer également le rôle bénéfique de cette molécule dans la prévention du vieillissement cutané. En 2000 et 2002, Yarosh *et coll.* et Both *et coll.* montrent, *in vitro*, sur un modèle de kératinocytes (cellules NHEK) et, *in vivo*, sur un échantillon de personnes âgées de 45 à 55 ans, que l'acide ursolique augmente le taux de céramide et la synthèse de collagène.

Cette biomolécule inhibe aussi la prolifération des cellules cancéreuses murines issues d'un mélanome. Aussi nous avons étudié les effets de l'acide ursolique sur la peau, et plus précisément sur les cellules HaCaT dérivées de kératinocytes humains, et sur des cellules M4Beu issues d'un mélanome humain.

## **CHAPITRE II : La peau, les tumeurs et les lignées étudiées**

Responsable de plusieurs milliers de décès chaque année en France, le cancer de la peau est un des cancers les plus redoutable. Sa fréquence augmente très fortement avec l'âge, avec la diminution de l'ozone et avec une forte exposition au soleil. Compte tenu de l'augmentation croissante de l'espérance de vie et de l'augmentation de sa fréquence, le cancer de la peau sera bientôt l'un des problèmes de santé publique les plus importants.

Nous présenterons ce chapitre en trois points ; nous décrirons la peau, les différentes tumeurs de la peau et enfin nous détaillerons les différentes lignées cellulaires utilisées au cours de notre étude.

## **I. La peau**

La peau est l'organe le plus important en poids (environ 3,5 kg) et en surface (1,80 m<sup>2</sup> chez un adulte de 75 kg). En contact direct avec le milieu extérieur, elle est le tissu le plus étendu car il constitue le revêtement du corps humain. La peau provient de deux feuillettes embryonnaires différents :

- l'ectoderme qui donne naissance à l'épiderme et aux annexes : follicules pileux, glandes sébacées, glandes sudorales et ongles ;
- le mésoderme de nature conjonctive, qui est à l'origine du derme et de l'hypoderme.

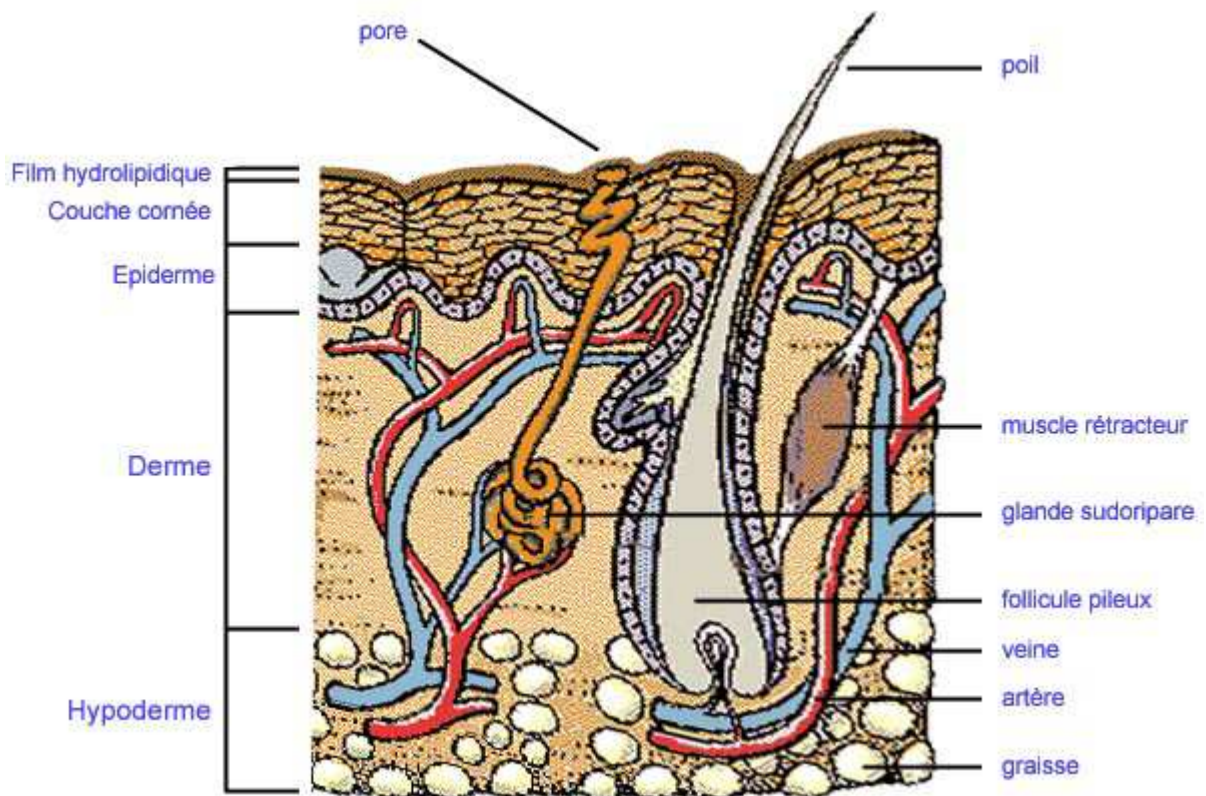
Ces deux structures s'articulent autour de la jonction dermoépidermique qui est traversée par les annexes.

La peau est donc un organe complexe composé d'éléments épithéliaux, mésenchymateux, glandulaires et neurovasculaires. Ce n'est pas une enveloppe inerte et ses fonctions sont multiples :

- elle a un rôle de barrière avec le milieu extérieur. Elle empêche la pénétration des micro-organismes, freine l'entrée de produits toxiques, absorbe les radiations et limite les pertes d'eau.
- elle possède de nombreux récepteurs sensitifs et intervient dans la vie de relation : elle est un média qui transmet à l'organisme les informations provenant du milieu environnant.
- elle est impliquée dans la régulation thermique par la sécrétion sudorale ; elle protège du froid et de la chaleur.

- elle participe à l'immunosurveillance par l'intermédiaire de nombreuses cellules et plus particulièrement les cellules de Langerhans.

La peau est constituée de différentes couches possédant des rôles bien définis. De l'extérieur vers l'intérieur, se trouvent l'épiderme, le derme et l'hypoderme. La constitution de ces couches est schématisée sur la Figure 2 (Dubois, 2001).



**Figure 2 :** Représentation des différentes couches de la peau

## I.1. Description

### I.1.1. L'épiderme

L'épiderme, épithélium pavimenteux stratifié kératinisé, est une couche superficielle, mince, dont l'épaisseur, estimée en moyenne à 0,10 mm, varie selon les régions du corps. En surface, l'épiderme est formé d'une couche dite cornée. En profondeur, se situe une zone de cellules qui se constituent à partir d'une couche germinative où se produisent les mitoses

cellulaires. Trois principales populations de cellules différentes composent l'épiderme : les kératinocytes, les mélanocytes et les cellules de Langerhans. Nous présenterons aussi les cellules de Merkel qui constituent les récepteurs du sens du toucher.

➤ **Les kératinocytes** (du grec *keras*, « corne ») constituent 80 % des cellules composant l'épiderme. Ils se présentent en quatre couches superposées marquant leur évolution morphologique (kératinisation) de la profondeur à la surface :

- ❖ *stratum germinatum* (ou basale) : cette couche unique de cellules cubiques repose sur la membrane basale ; ce sont les seules cellules qui se multiplient pour donner naissance à celles qui occupent les couches supérieures.
- ❖ *stratum spinosum* (ou corps muqueux de Malpighi, du nom de l'anatomiste italien du XVII<sup>ème</sup> siècle) : cette couche comprend quatre à huit rangées de cellules superposées ayant des caractères différents de celles du *stratum germinatum*. A l'origine cubique, ces cellules s'aplatissent progressivement en remontant vers la surface. On note dans cette couche la formation de groupements de tonofilaments assemblés en trousseaux parallèles à la surface (ils sont les précurseurs de la kératine fibreuse) mais aussi l'existence d'épines, c'est-à-dire de courts prolongements cellulaires formant avec les desmosomes des « ponts inter-cellulaires ».

Ces groupements de tonofilaments et ces « ponts inter-cellulaires » assurent la cohésion entre les cellules et apportent la résistance à la couche cornée.

- ❖ *stratum granulosum* : cette couche se présente en trois ou quatre strates de cellules compactées présentant à l'observation microscopique un aspect différent. Le *stratum granulosum* est caractérisé par un tassement des cellules dont le noyau commence à dégénérer et les organites à disparaître. Il est à noter également une abondance des grains de kératohyaline et un fort réseau de tonofilaments.
- ❖ *stratum corneum* (ou couche cornée) : cette couche présente une épaisseur variable selon la région du corps ; l'épaisseur maximale se situe au niveau de la plante du pied ou de la paume des mains (2 mm environ), alors qu'au niveau des paupières, l'épaisseur est infime (de l'ordre de 0,06 mm). La transformation des kératinocytes se poursuit jusqu'à un aplatissement complet de la cellule, mais aussi jusqu'à la disparition totale de son noyau et des organites. Seules restent dans le cytoplasme des fibres de kératine.

Cette couche superficielle est elle-même subdivisée en trois zones qui marquent chaque degré d'évolution :

- le *stratum lucidum*, fine bande claire située à la base ;
- le *stratum compactum*, au milieu ;
- le *stratum disjunctum*, zone de desquamation, en surface.

La couche cornée est principalement constituée de kératine (protéine fibreuse riche en acides aminés soufrés - cystéine). Ce composé remplit les cellules qui durcissent et remontent vers la surface, en formant une couche dure : la couche cornée. La kératine joue un rôle protecteur très efficace, véritable bouclier à la surface de la peau. La zone superficielle desquame naturellement, entraînant avec elle l'élimination des microbes et des corps étrangers.

La durée moyenne de transformation des cellules de la couche basale jusqu'à la couche cornée desquamante est évaluée à 21-28 jours, et varie selon les conditions physiopathologiques.

➤ **Les mélanocytes** (du grec *melas* « noir », et *kutos*, « cellule »), représentent environ 16 % des cellules de l'épiderme, et sont situés aussi sur la membrane basale, dans le *stratum germinatum*. Ces cellules sont peu nombreuses, comparées aux kératinocytes au milieu desquels elles s'intercalent, puisque le rapport est d'environ 1200 mélanocytes par mm<sup>2</sup> de surface cutanée pour 10<sup>5</sup> kératinocytes. De forme étoilée, les mélanocytes présentent des prolongements (d'où leur nom de cellules dendritiques) qui s'insinuent entre les kératinocytes voisins.

Les mélanocytes contiennent dans leur cytoplasme des grains de mélanine assemblés sous forme de mélanosomes. Produit par le mélanocyte, la mélanine est un pigment responsable de la couleur de la peau après s'être dispersé dans l'épiderme. Cette dispersion se fait par le transfert et la phagocytose des mélanosomes par les kératinocytes au cours de leur évolution, de l'assise germinative vers les couches supérieures de l'épiderme.

Le nombre de mélanocytes varie selon les régions cutanées chez un même individu. Ainsi leur densité est de 2000/mm<sup>2</sup> pour la peau de la face et de 1000/mm<sup>2</sup> pour celle du corps. En revanche, leur nombre est sensiblement identique dans toutes les populations humaines (caucasiennes, négroïdes et mongoloïdes). La différence de couleur entre les races s'explique principalement par la qualité de pigments que ces cellules produisent. La couleur noire est apportée par l'eumélanine. Les variantes plus claires résultent de la

combinaison à ce pigment de base, dans des proportions variables, de phaeomélanine et chez les sujets roux d'érythromélanine.

Outre cette différence qualitative, il est à signaler que les mélanosomes sont plus larges chez les populations noires et qu'ils se répartissent dans toutes les couches de l'épiderme jusqu'à la zone de desquamation. Au contraire, chez les populations blanches, les mélanosomes se répartissent uniquement dans les couches inférieures de l'épiderme.

➤ **Les cellules de Langerhans** (du nom du médecin allemand Paul Langerhans qui les découvrit en 1868) sont aussi des cellules dendritiques et représentent environ 4 % des cellules de l'épiderme (500 à 1000 par mm<sup>2</sup>). Situées dans le *stratum spinosum* et placées côte à côte, elles forment une « première ligne » de défense capable de capter des particules étrangères, y compris des micro-organismes, qui auraient franchi les barrières cutanées. Ces cellules de Langerhans sont aussi une mémoire du système de défense immunitaire puisqu'elles transmettent, après un long trajet à travers l'épiderme et le derme, les caractéristiques de l'agresseur aux lymphocytes, chargés de défendre l'organisme attaqué. Ces derniers vont alors aller protéger le site cutané agressé.

➤ **Les cellules de Merkel** (doivent leur nom à Friedrich Merkel, médecin allemand qui les mit en évidence en 1875). Nombreuses sur les lèvres et les doigts, elles sont localisées dans la partie basse de l'épiderme. Les cellules de Merkel, associées à une terminaison nerveuse, constituent le récepteur essentiel du sens du toucher

Il convient de souligner l'absence de vaisseaux au niveau de l'épiderme. Par voie de conséquence, l'eau et les nutriments nécessaires aux cellules germinatives et aux couches de cellules vivantes sont fournis par imbibition à partir du derme, à travers la membrane basale. Ils peuvent l'être également par apport externe.

### **I.1.2. Le derme**

Le derme a une structure conjonctive. Il est constitué par des structures fibreuses (fibres de collagène et fibres élastiques), et par une substance fondamentale composée de protéoglycannes et de glycoprotéines de structures ; les inter-relations qui existent entre ces constituants ont conduit à la notion de matrice extra-cellulaire. Les cellules présentes dans le derme sont les fibroblastes, les histiocytes et les mastocytes. Le derme est en outre le support

des systèmes vasculaires et nerveux cutanés très différenciés ainsi que des annexes qui interviennent dans la vie de relation et la régulation de fonctions générales.

La structure du derme n'est pas homogène et l'on distingue 3 niveaux :

- le derme papillaire : le derme est séparé de l'épiderme par la membrane basale ; la jonction entre les deux prend l'apparence de montagnes russes et dessine ce que l'on appelle les « papilles dermiques ». Le derme papillaire renferme les anses capillaires, des fibres élastiques fines, du collagène jeune, les corpuscules nerveux de Meissner et quelques cellules sanguines.
- le derme moyen ou réticulaire, encore appelé chorion, est la couche essentielle de la peau puisqu'il lui confère sa résistance et son élasticité. Il constitue le « cuir » des animaux. En effet, il est constitué d'un tissu conjonctif dense, des annexes pilosébacées et des corpuscules nerveux de la sensibilité au froid.
- le derme profond contient les glandes sudorales qui, grâce à des canaux, s'ouvrent vers l'extérieur, et permettent grâce à la production de sueur, d'éliminer les déchets et de protéger l'organisme contre la chaleur. Il contient aussi les corpuscules nerveux de la sensibilité profonde et de la sensibilité au chaud. Cette couche est constituée de vaisseaux sanguins assurant l'alimentation des cellules. On trouve également des fibroblastes assurant le maintien de la structure de la peau.

Plus épais que l'épiderme (il mesure de 1 à 4 mm), moins dense, le derme correspond à l'association de cellules fixes peu nombreuses mais particulièrement importantes, les fibroblastes. Ces derniers sont situés dans un gel, la « substance fondamentale », qu'ils synthétisent eux-mêmes. Cette substance est constituée de mucopolysaccharides qui, par leur hydrophilie, sont capables de retenir 1000 fois leur poids d'eau. Ce caractère explique la souplesse et la consistance particulière de la peau.

#### ➤ **Les cellules du derme**

Les mastocytes, d'origine médullaire, sont répartis dans tout le derme, mais surtout autour des vaisseaux et des travées conjonctives. Ils interviennent dans les réactions immunologiques, dans les phénomènes inflammatoires, la vasodilatation, les altérations tissulaires et la fibrose.

Les histiocytes sont des macropages du tissu conjonctif d'origine médullaire. Ils interviennent dans la phagocytose, les phénomènes d'immunité cellulaire et tumorale, les



phénomènes d'inflammation et de réparation tissulaire, mais ils possèdent aussi une activité microbicide et tumoricide.

Les fibroblastes représentent majoritairement les cellules du derme. Ce sont des cellules mésenchymateuses de grandes tailles et fusiformes présentant un noyau ovale et un cytoplasme peu développé. Partie intégrante du tissu conjonctif, disséminés dans l'ensemble de l'organisme, les fibroblastes sont en contact les uns avec les autres, soit par leurs prolongements, soit à travers la substance fondamentale dans laquelle ils baignent. Les fibroblastes échangent des informations, se mobilisent et se multiplient. Leur principale fonction est de sécréter divers constituants de la matrice extra-cellulaire, comme le collagène et l'élastine qui restent liés avec ces cellules.

### ➤ **Les fibres du derme**

Les fibres de collagène et d'élastine incluses dans ce milieu résultent de l'activité biosynthétique des fibroblastes. Il est à noter que la production de chacune de ces fibres évolue en fonction de l'âge de l'individu et se ralentit avec le vieillissement.

- Les fibres de collagène composent l'essentiel du derme. Le collagène représente plus de 90% du tissu conjonctif dermique, constitué par des trousseaux de fibres distribués sur toute la hauteur du derme et orientés de façon variable. Sa synthèse débute dans le fibroblaste ; une fois excrétée, le collagène subit la fibrillogénèse sous l'influence de nombreuses enzymes comme la lysesyloxidase, aussi sécrétée par le fibroblaste. Les molécules de collagène subissent un assemblage longitudinal par pontages intra et extracellulaire, qui conduisent à un collagène de moins en moins soluble, la fibre de collagène. Ces fibres de collagène regroupent treize variétés de molécules. Organisées en réseau tridimensionnel, elles forment des faisceaux qui confèrent la solidité à l'édifice.

- Les fibres élastiques ou d'élastine, moins nombreuses (ne représentent que 4% des protéines dermiques) et plus fines, forment sur toute la hauteur du derme un maillage souple qui lui donne son élasticité. Elles sont constituées d'une trame de microfibrille et d'une matrice, l'élastine, qui se dépose progressivement sur les microfibrilles. De part sa structure, l'élastine est responsable de l'élasticité de la fibre élastique.

A la différence de l'épiderme, le derme contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques qui assurent sa nutrition. Dans le derme, il est à noter la présence de :

- Nombreuses terminaisons nerveuses sensibles libres et corpusculaires (corpuscules de Meissner et de Pacini) ;
- Cellules musculaires lisses (muscles érecteurs des poils) ;
- Fibres musculaires striées (muscles peauciers de la face qui interviennent dans les différentes expressions du visage).

Enfin diverses annexes cutanées dérivées de l'épiderme plongent dans le derme (follicules pileux, glandes sébacées, glandes sudoripares).

### **I.1.3. L'hypoderme**

L'hypoderme est constitué d'un tissu conjonctif lâche qui prolonge celui du derme ; il est très souvent associé en sa partie profonde au tissu adipeux. Ce tissu adipeux hypodermique constitue une réserve capable de stocker des graisses et de les libérer en fonction des besoins de l'organisme ; cela forme une réserve énergétique et permet ainsi la régulation thermique du corps. Les adipocytes, dérivés des histiocytes et constituant le tissu adipeux, forment un « molleton » généralement plus développé chez la femme que chez l'homme. Son épaisseur est variable : inexistant au niveau des paupières, plus épais autour de l'abdomen, des fesses ou des cuisses.

## **I.2. Agression solaire**

En contact avec le milieu extérieur, la peau subit en permanence des agressions ; l'un des effets visibles des attaques de l'environnement est son vieillissement. La peau dispose de mécanismes naturels pour se défendre : la mélanine et la kératine assurent ainsi la protection de l'organisme contre les ultraviolets. Apparaissant dès le deuxième jour d'exposition, la mélanine augmente jusqu'aux alentours du vingtième jour donnant à la peau son hâle coloré tout en la protégeant des radiations ultraviolettes. La kératine assure, quant à elle, le maintien de l'épiderme et forme une couche protectrice d'épaisseur variable selon les parties du corps.

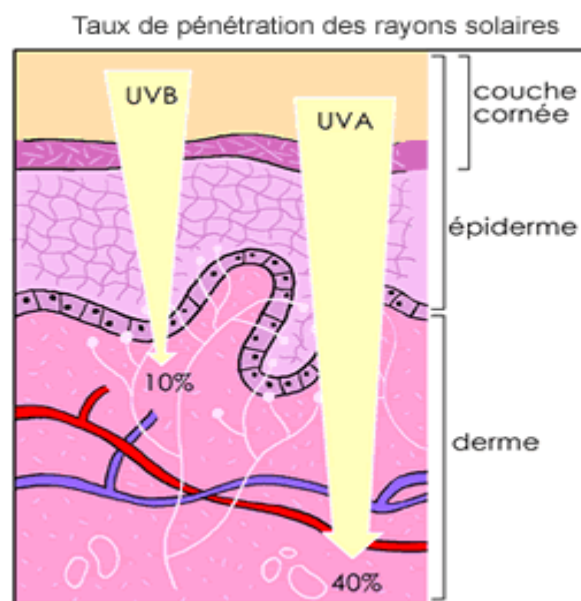
Si l'exposition solaire a des effets bénéfiques pour le corps humain (synthèse de vitamine D, effet calorique et anti-inflammatoire, amélioration de certaines dermatoses), les conséquences néfastes des surexpositions ne doivent pas être sous-estimées.

La peau est un organe spécifique dans la protection de l'organisme contre les agressions extérieures, dont la principale est le stress engendré par les ultra-violetts issus du spectre solaire.

Le spectre solaire est caractérisé par les radiations émises par le soleil, mêlant lumière visible, infra-rouge et radiations ultraviolettes (UV). La lumière visible et l'infrarouge constituent 95 % des radiations solaires nous parvenant alors que les UV représentent seulement 5%. Parmi les UV, on peut distinguer les UVA, les UVB et les UVC. Seuls les rayonnements les moins énergétiques, comme les UVA et UVB, atteignent la surface de la Terre car l'atmosphère terrestre les filtre de façon sélective. Les UVC sont totalement absorbés par l'ozone et les autres gaz composant l'atmosphère. La proportion d'UVA et d'UVB qui traverse les couches supérieures de l'atmosphère terrestre est également modulée de façon importante en fonction de la couverture nuageuse. D'une façon générale, la composante UV des rayonnements solaires au niveau terrestre se compose de 95 % d'UVA et 5 % d'UVB. Les vêtements constituent une barrière efficace mais incomplète contre les radiations ultraviolettes en général, et les UVA en particulier.

Le taux d'UVA et d'UVB pénétrant les différentes couches de la peau, comme l'épiderme et le derme, sont de l'ordre de 40 % et 10 %, respectivement (Figure 3). En fonction du lieu (couche de la peau) et de la dose de rayonnements UVA et/ou UVB, les dommages occasionnés sur les cellules varient.

En cosmétologie, de nombreuses crèmes sont créées pour permettre une protection contre les UV et induire ainsi une prévention du vieillissement cutané (Seite *et al.*, 2000).



**Figure 3 :** Taux de pénétration des rayonnements solaires UV

## II. Les tumeurs

Les rayons ultraviolets traversent la peau et endommagent les cellules en attaquant le patrimoine génétique de la cellule. Ces attaques répétées au fil des années accélèrent le processus de vieillissement, la sécheresse de la peau et lui donne un aspect plissé. Les conséquences de ces attaques engendrent un risque de cancer. En effet, l'exposition aux rayons ultraviolets du soleil est responsable de 80% des cancers de la peau (van Weelden *et al.*, 1990).

Les cancers de la peau sont des maladies où les cellules cancéreuses se trouvent dans la couche externe de la peau (épiderme). Ces cancers peuvent se développer suite à une exposition au soleil répétée pendant plusieurs années, mais ils peuvent être d'origine génétique.

Le terme de cancers de la peau recouvre deux catégories de tumeurs cutanées distinctes : les carcinomes et les mélanomes.

### II.1. Les carcinomes

**Les carcinomes baso- ou spino- cellulaires** (appelés aussi cancers épithélias) touchent les cellules épithéliales de la peau (Schwartz *et al.*, 1981). Ces dernières constituent la majeure partie de la peau, de par leur nombre. Elles constituent, en vieillissant et en se remplissant de kératine, une véritable barrière protectrice entre le milieu extérieur et le milieu intérieur de l'organisme. Ces cellules protègent l'organisme des facteurs environnementaux. Quand ces cellules subissent une altération génétique induite par les UV, il se forme un carcinome (Figure 4).



**Figure 4** : Photographie d'un carcinome cutané

Les carcinomes se présentent sous deux formes :

- **Le carcinome basocellulaire** est un cancer de la peau qui se produit sur des zones exposées au soleil. Les gens avec les teints clairs qui ne bronzent pas facilement sont les plus en danger. En principe, ces cancers basocellulaires résultent d'une altération d'une cellule de l'épiderme ; ce type de cellule est normalement à l'origine d'une lignée de cellules "filles" qui forment l'essentiel de la barrière cutanée de la peau. Les carcinomes basocellulaires sont caractérisés par une ulcération de la peau sans risque de métastase ; ils ne se répandent donc pas dans le corps, et sont par conséquent moins dangereux (non mortels) mais ils doivent être soignés immédiatement pour ne pas le devenir. Les carcinomes basocellulaires représentent 80% des cancers de la peau. Ils touchent essentiellement les individus de plus de 40 ans et sont rarement mortels.
- **Le carcinome spinocellulaire** est aussi un cancer de la peau qui se développe souvent sur des zones exposées au soleil. Il peut se répandre à d'autres parties du corps. Ces cancers apparaissent essentiellement sur le visage et les mains et peuvent se propager à l'ensemble de la peau et devenir mortels. Plus de 90% des cas de cancers spinocellulaires peuvent être guéris, si on les détecte tôt. Ils représentent 10% des cancers de la peau et sont rarement observés chez les patients de moins de 50 ans. Les carcinomes spinocellulaires résultent de l'endommagement d'une cellule déjà différenciée en kératinocyte. Ils affectent essentiellement les sujets blonds à peau claire et présentent un risque plus élevé de conduire dans 20 % des cas à l'apparition de métastases, dû à un pouvoir invasif supérieur à celui des carcinomes basocellulaires.

## II.2. Les mélanomes

Le mélanome, qui ressemble à un simple grain de beauté, est le plus grave des cancers cutanés. Un mélanome peut être bénin (naevus § III.2.2) ou malin (mélanome malin ou mélanoblastome). Les mélanomes malins ne représentent certes que 10% des cancers de la peau, mais ils sont mortels s'ils ne sont pas traités. C'est l'un des cancers les plus agressifs qui soient, mais le traitement à une phase initiale permet de guérir le patient. Un mélanome malin

non traité envahit rapidement la peau et progresse vers le reste de l'organisme particulièrement le foie, les poumons, les os et le cerveau, entraînant la mort du patient en quelques mois. Le mélanome est une tumeur maligne développée à partir des mélanocytes. Le plus souvent, les cellules atteintes par le mélanome continuent à produire de la mélanine ; c'est pourquoi ce cancer peut apparaître sous forme de plusieurs tâches : marrons, brunes et noires (Figure 5). Le mélanome peut partir de l'intérieur, ou à côté, d'un grain de beauté ou de toute autre tâche foncée (d'une tâche de rousseur par exemple). Il tend à se répandre rapidement. Le mélanome peut devenir rouge, bleu ou blanc et peut produire des croûtes et se mettre à saigner. Chez les femmes, les mélanomes se développent généralement sur les bras et les jambes, alors que chez les hommes ils peuvent se développer sur le dos. Les causes sont une exposition intense et intermittente aux rayons ultraviolets du soleil responsables de brûlures, en particulier pendant l'enfance ou l'adolescence. En effet, les coups de soleil répétés et les facteurs génétiques multiples (photo-type et mélanomes familiaux, comme le syndrome du naevus dysplasique ou xeroderma pigmentosum) sont responsables de l'apparition des mélanomes.



**Figure 5 :** Photographie d'un mélanome malin cutané

### **II.2.1. Epidémiologie**

La principale caractéristique du cancer de la peau est l'apparition de mélanome cutané. Il s'agit d'une tumeur maligne de haute gravité développée, à partir de cellules mélanocytaires, et dont l'incidence augmente en France et dans tous les pays occidentaux. Classiquement considéré comme rare, le mélanome voit son incidence augmenter dans toutes les populations à peau claire, hommes et femmes, en particulier dans les tranches d'âge 30-50

ans (Menegoz *et al.*, 1997), plus rarement chez les enfants ou les adolescents. La fréquence du mélanome, -et avec elle la mortalité dont il est responsable-, augmente plus que celle de tout autre cancer (Roush *et al.*, 1988) et de manière constante depuis 50 ans ; son incidence double tous les 10 ans en France.

Il s'agit de la plus sévère des tumeurs cutanées malignes fréquentes et de la première cause de décès par cancer cutané en France. Aujourd'hui, si le mélanome est un cancer rare, son incidence en France est de l'ordre de 9 à 10 nouveaux cas pour 100000 habitants par an, soit environ 4000 à 6000 personnes atteintes de ce cancer par an. Plus d'un millier en meurent tous les ans (Tableau 1). Dans tous les cas, l'augmentation de cette incidence, de 10% par an, est très rapide et place le mélanome cutané en tête de tous les cancers en terme d'augmentation de fréquence. Cette fréquence varie selon la latitude et la composition ethnique des populations (pour 100000 habitants : 0,4 en Afrique Noire, 0,8 en Asie, 4 en Europe, 8 aux USA, 40 en Australie) (Muir *et al.*, 1987).

Les données épidémiologiques internationales démontrent un gradient d'incidence en fonction de la position de la population étudiée par rapport à l'équateur. Les modèles de prédiction épidémiologique actuels permettent de penser que, dans les années à venir, une personne sur 65 née en 2000 dans les pays occidentaux devrait présenter un mélanome au cours de sa vie (Thomas *et al.*, 1998) et aurait 15 fois plus de risques de développer un mélanome qu'une personne née en 1970. En France, comme dans la plupart des pays européens, on estime que les cancers cutanés représentent, à l'heure actuelle, 15 à 20 % de tous les cancers mais cette incidence atteint presque 50 % dans certains pays comme l'Australie ou les Etats-Unis.

Ceci laisse à penser que les cancers de la peau sont devenus une préoccupation majeure en santé publique et le resteront durant les années à venir. Effectivement, même si il est observé une régression de la mortalité des autres formes de cancers cutanés, tels que les carcinomes baso- ou spino- cellulaires, dus principalement à un diagnostic de plus en plus précoce ; les mélanomes figurent parmi les cancers les plus fréquents et les plus dangereux.

Type de cancer	Nombre de nouveaux cas en 2000	Nombre de décès en 2000
Sein	41 845	11 637
Prostate	40 209	10 004
Colon / Rectum	36 257	15 973
Poumon	27 774	27 164
Lèvre – Bouche – Pharynx	15 385	5 090
Vessie	10 771	4 558
Lymphome malin non-Hodgkinien	9 908	5 243
Reins	8 293	3 607
<b>Mélanome</b>	<b>7 231</b>	<b>1 408</b>
Estomac	7 126	5 069
Leucémie	6 243	5 095
Foie	5 976	7 856
Système nerveux central	5 299	3 168
Corps de l'utérus	5 064	1 809
Œsophage	4 968	4 434
Pancréas	4 887	7 181
Ovaires	4 488	3 508
Larynx	4 226	2 134
Thyroïde	3 711	431
Myélome multiple et maladies immuno-prolifératives	3 587	2 254
Col de l'utérus	3 387	1 004
Maladie de Hodgkin	1 367	220
Mésothéliome	871	1 157
Totaux	278 253	150 045

**Tableau 1** : Estimation du nombre de cancers en France pour l'année 2000.

(Source : Rapport de la commission d'orientation sur le cancer.)



### III.2.2. Evolution

Un mélanome peut être bénin (naevus) ou malin (mélanome malin ou mélanoblastome).

La plupart des mélanomes ne semblent pas avoir de précurseur et se développent en peau saine. Une minorité proviendrait de la dégénérescence de naevus bénins pré-existants (Burg *et al.*, 1993 ; Runkle & Zalosnik, 1994) :

- les **naevus congénitaux** de grande taille exposent à un risque de mélanome dans plus de la moitié des cas avant l'âge de 10 ans ; ceux de petite taille ont un potentiel de dégénérescence mal établi ;

- les **naevus acquis dysplasiques** apparaissent particulièrement dans les familles de mélanome héréditaire, en sachant que la proportion de mélanome naissant d'un naevus dysplasique reste mal appréciée.

L'évolution spontanée d'un mélanome est très variable dans le temps. Certaines tumeurs progressent rapidement alors que d'autres évoluent sur plusieurs années avec des régressions et plus rarement des guérisons spontanées. L'évolution spontanée habituelle est marquée par un envahissement local avec extension possible à la peau adjacente ou à distance, aux ganglions régionaux et apparition de métastases, habituellement multiples. Tissus mous, poumons, foie, cerveau sont dans cet ordre les localisations métastatiques les plus fréquentes. L'atteinte osseuse est plus tardive ; tous les organes sont susceptibles d'être atteints secondairement.

La majorité des métastases survient entre 2 et 5 ans après le traitement de la tumeur primitive. Il en existe cependant de très précoces et de très tardives.

Le pronostic d'un mélanome dépend :

- de son épaisseur en millimètre, mesurée par l'histologiste (indice de Breslow), facteur pronostique essentiel (Tableau 2),
- du niveau d'invasion en profondeur de la tumeur (niveau de Clark),
- de l'activité mitotique (nombre de mitoses/mm<sup>2</sup>),
- de sa localisation : les mélanomes de la tête et du cou, des extrémités et des muqueuses récidivent plus souvent localement que ceux du tronc et des membres,
- du sexe du patient (meilleur pronostic chez la femme),
- du type anatomoclinique de la tumeur (gravité décroissante : mélanome nodulaire, mélanome à extension superficielle, mélanome sur mélanose de Dubreuilh),

- de l'extension régionale, stade I : tumeur primitive isolée, stade II : envahissement ganglionnaire régional ou métastases en transit,
- de la présence de métastases, autre facteur pronostique déterminant (stade III).

Epaisseur tumorale	< 0,75 mm	96 %	Pourcentage de survie en 5 ans
	0,76 à 1,49 mm	87 %	
Indice de Breslow	1,50 à 2,49	75 %	
	2,50 à 3,99 mm	66 %	
	> 4 mm	47 %	

**Tableau 2 :** Corrélation entre l'indice de Breslow et la survie à 5 ans d'après une série de 15 798 mélanomes au stade I.

Selon Balch & Milton, en 1985.

### II.2.3. Différentes sortes de mélanomes malins

Il existe plusieurs formes anatomo-cliniques de mélanomes malins (MM) (Clark *et al.*, 1975 ; Runkle & Zaloznik, 1994 ; Reed & Martin, 1997 ; Poetsch *et al.*, 2003) :

**Mélanome à extension superficielle** (SSM = superficial spreading melanoma). Fréquent chez l'adulte jeune (60% des MM) et de topographie ubiquitaire, il prédomine sur la jambe chez la femme et sur le dos et le tronc chez l'homme. C'est une lésion plane, polychrome (avec différentes teintes possibles : marron, noir, rose, gris, bleu ...), à contour régulier, polycyclique et de surface irrégulière parfois un peu kératosique. L'augmentation de taille régulière peut s'accompagner de plages de régression blanchâtres. Sur le plan histopathologique, il évolue d'abord en surface (phase horizontale) pendant 2 ans en moyenne, puis envahit le derme (phase verticale).

**Mélanome nodulaire** (ou NM = nodular melanoma) (15 à 20% des MM). C'est une tumeur noire, d'emblée, infiltrée. Le caractère ulcéré ou saignant signe un stade évolutif plus avancé. Il en existe des formes achromiques de diagnostic difficile. Histologiquement, il s'agit d'une tumeur à croissance tumorale verticale d'emblée (risque élevé de métastases précoces) à prolifération dermique, avec un pronostic grave.

**Mélanome lentigo** (ou LMM = lentigo maligna melanoma ou mélanome de Dubreuilh) (5% des MM). Avec une prédominance féminine et assez fréquent chez les sujets

âgés, il est de meilleur pronostic. Il siège sur les régions photo-exposées c'est-à-dire au niveau du visage, avec une évolution lente. C'est une lésion plane, noire avec des variations de noir, de marron foncé, à limites géographiques irrégulières. Histologiquement, il croît en surface pendant de nombreuses années (phase horizontale). L'envahissement dermique se marque par une papule, une plaque infiltrée, un nodule (phase verticale) : prolifération des mélanocytes atypiques au niveau de la couche basale de l'épiderme dans une peau atrophique et infiltration quand il y a présence de mélanocytes dans le derme.

**Mélanome des extrémités** (ou ALM = acral lentiginous melanoma) (15 à 20% des MM). Le mélanome des extrémités (ou acro-lentigineux) a été individualisé plus récemment et touche les hommes de 50 - 60 ans. Il siège aux paumes, aux plantes ou aux extrémités des doigts. Il peut également toucher primitivement la matrice unguéale. L'évolution est lente. Histologiquement, il comporte une évolution horizontale puis verticale. L'aspect anatomopathologique est celui d'un mélanome à extension superficielle ou d'un mélanome lentigineux.

#### **II.2.4. Grains de beauté et mélanomes malins**

Les personnes à peau claire, aux yeux bleus, blondes ou rousses sont parmi les plus susceptibles de développer un jour un mélanome ou un autre cancer cutané. En effet ces types de pathologies sont 15 fois plus fréquents chez les personnes à peau claire que chez les individus à peau plus foncée. Bien qu'en général les lésions apparaissent le plus souvent dans le haut du dos et sur le torse des hommes et sur les jambes des femmes, elles peuvent apparaître partout sur la peau.

##### **II.2.4.1. Apparences d'un mélanome**

La plupart des mélanomes provient d'un grain de beauté tout à fait banal en apparence. Tout le monde ou presque a des grains de beauté à la surface de la peau, seuls ou en groupe. Il s'agit de petites lésions bénignes qui contiennent des dizaines de cellules pigmentées. Ils sont normalement de couleur brune et peuvent être de taille et de forme différentes. La couleur brune est due à la mélanine. La plupart des grains de beauté apparaissent pendant les 20 premières années de la vie. Avec le temps, ils changent souvent lentement, se soulèvent et s'éclaircissent. Certains peuvent ne jamais changer ou peuvent devenir plus foncés, soit après une exposition au soleil ou lors de traitements à base de

stéroïdes. Ils peuvent être plats ou en relief, d'aspect lisse ou plissé, contenir des poils ou non. Ils varient en couleur, forme et taille. Certains apparaissent à la naissance mais la plupart se développent plus tard dans la vie (Belaich, 1975).

Il est important de se rappeler que tous les grains de beauté n'ont pas le même aspect :

- ils peuvent être de la couleur de la peau, ou rose, brun clair ou foncé, et même bleu-noir,
- leur forme peut également varier : ils peuvent être ronds ou ovales, ou de forme irrégulière,
- ils peuvent être plats ou surélevés, grands ou petits, avec ou sans poils.

Certaines personnes en ont moins de dix sur l'ensemble du corps, d'autres peuvent en avoir jusqu'à une centaine. Si la majorité des grains de beautés ne requière jamais de traitements médicaux, ceux dont l'apparence change doivent être examinés par un médecin.

Les grains de beauté connus sous le nom de grains de beauté atypiques ou grains de beauté dysplasiques sont plus grands que la moyenne. Ces grains de beauté sont souvent de couleur inégale et sont souvent héréditaires. Les personnes avec des grains de beauté atypiques ont plus de chance de développer le mélanome (Ziegler *et al.*, 1993).

Chaque année, des milliers de ces petites lésions dermatologiques d'apparence tout à fait bénigne se révèlent être des mélanomes malins. De nombreux patients consultent trop tardivement lorsque le cancer a déjà envahi la peau en profondeur.

Un mélanome malin qui n'est pas traité rapidement progresse en profondeur dans la peau avant de se répandre ou de métastaser dans le reste de l'organisme et devenir mortel. Le taux de guérison à 5 ans est de 100% pour un mélanome de 0,75 mm d'épaisseur. Ce taux tombe toutefois rapidement à 50% dès que la lésion atteint 3 mm.

Les personnes à la peau plus foncée ont aussi des grains de beauté mais en moins grand nombre que les individus à la peau blanche et donc elles encourent moins de risques de développer un mélanome. En effet, le pigment contenu dans les peaux noires protège contre les rayons ultraviolets du soleil.

#### **II.2.4.2. Détection d'un mélanome**

Les grains de beauté étant situés à la surface de la peau, il est facile de détecter un mélanome malin sur l'épiderme. Un grain de beauté dont l'apparence change peut évoluer en cancer de la peau sur quelques mois ou quelques années.

Afin de différencier les grains de beautés ordinaires et bénins, de ceux qui sont anormaux, l'American Cancer Society a établi la règle alphabétique ABCDE suivante (Burg *et al.*, 1993) :

A = Asymétrie : les deux moitiés du grain de beauté qui étaient symétriques sont maintenant différentes.

B = Bords : les bords du grain de beauté sont devenus irréguliers, dentelés, ou flous.

C = Couleur : le grain de beauté a récemment changé de couleur. Les couleurs les plus fréquemment observées sont différentes (tons marron, beige, noir et rouge ou bleuâtre).

D = Diamètre : le diamètre du grain de beauté s'est récemment agrandi.

E = Epaisseur : le grain de beauté, qui était plat à l'origine, prend plus ou moins du volume ou du relief.

### **III. Les lignées étudiées**

Les deux lignées utilisées comme support à notre étude sont la lignée cellulaire HaCaT et la lignée cellulaire M4Beu.

#### **III.1. Lignée HaCaT**

Pour étudier les différents changements génétiques, tel que le stade phénotypique impliqué dans le processus du cancer de la peau humaine, il a été développé un modèle *in vitro*. Ce modèle, appelé lignée HaCaT, résulte de l'immortalisation spontanée de kératinocytes humains. Cette lignée permet d'étudier les différents stades de développement de tumeurs ainsi que la progression des différents stades de carcinomes de la peau humaine (Fusenig *et al.*, 1985 ; Fusenig *et al.*, 1991 ; Fusenig *et al.*, 1994 ; Boukamp *et al.*, 1994 ; Boukamp *et al.*, 1995).

##### **III.1.1. Création de la lignée HaCaT : Processus d'immortalisation**

Cette immortalisation a été réalisée de trois manières différentes :

### III.1.1.1. Immortalisation spontanée par altérations génétiques

L'équipe de Boukamp a démontré en 1988 l'immortalisation spontanée des cellules HaCaT après 140 générations (ou divisions cellulaires) dans un milieu avec une faible concentration de calcium et une température élevée (38,5°C), engendrant ainsi la perte de gènes de la sénescence. L'émergence spontanée de la lignée cellulaire HaCaT dans une culture, à long terme, de kératinocytes adultes se produit graduellement à travers différents stades accompagnés par des changements génétiques visibles comme des altérations chromosomiques (Boukamp *et al.*, 1988 ; Boukamp *et al.*, 1997). La perte de gènes de sénescence pourrait être la cause de l'immortalisation des cellules HaCaT. Il a été observé, dans le cas de ces cellules, une perte de copies du chromosome 3, après une culture à long terme de 300 générations (Boukamp *et al.*, 1997). Plus exactement, le bras court du chromosome 3 (ou chr 3p) des cellules HaCaT est absent, ce qui suggère que ce bras court 3p abrite un ou plusieurs gènes de sénescence et que sa perte est un événement majeur dans l'immortalisation des cellules de la lignée HaCaT. Malgré ses variations génétiques, la lignée cellulaire HaCaT soutient la balance génomique et maintient un phénotype non-tumorigénique.

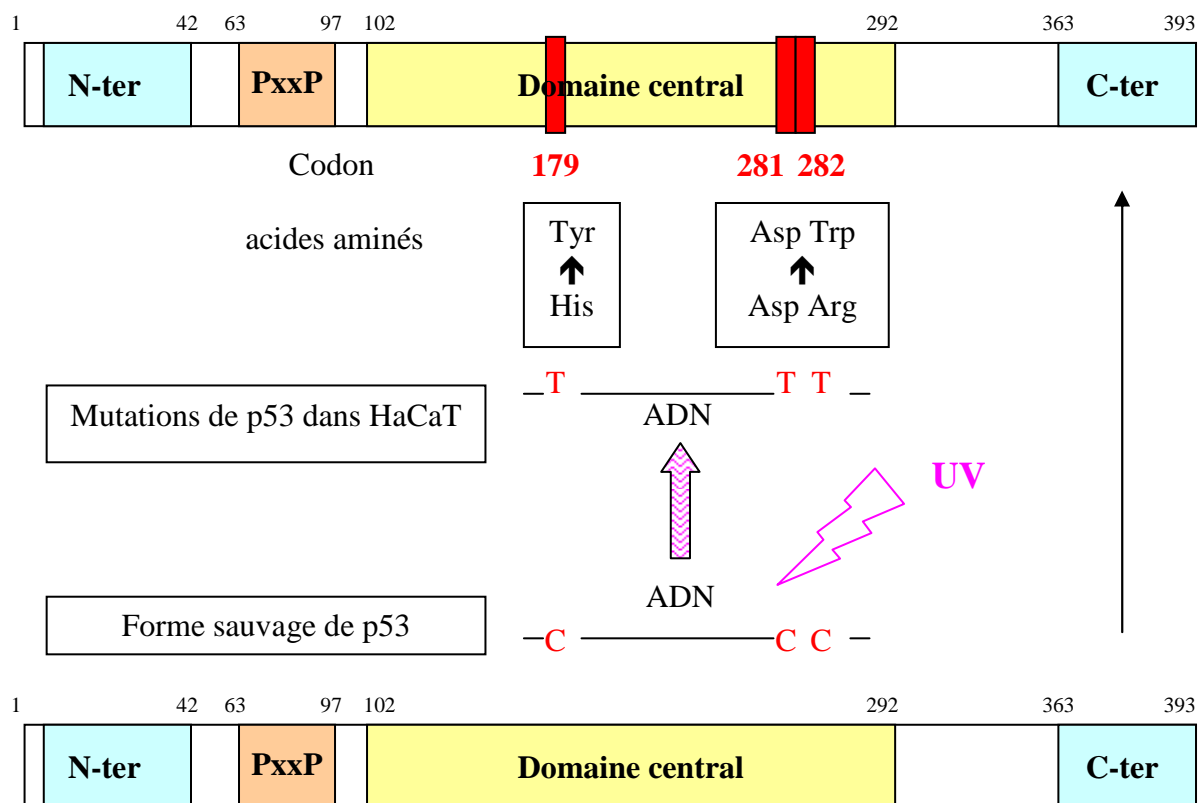
### III.1.1.2. Immortalisation *via* des mutations sur p53 induites par UV

L'immortalisation peut être également obtenue sur ces cellules, après seulement 2 générations suivies d'une irradiation aux UV (Boukamp *et al.*, 1994).

Les mécanismes régulant normalement les réparations de l'ADN endommagé sont perturbés ou perdus lors de l'immortalisation. Ces mécanismes sont attribués à la fonction du gène *p53* (Lane, 1992), qui est muté dans un grand nombre de tumeurs de la peau (Jonason *et al.*, 1996). Effectivement, l'exposition à la lumière solaire engendre des mutations du gène *p53*. Ces mutations sont principalement des transitions cytosine-thymine (C→T), mais aussi des doubles liaisons thymine-thymine (CC→TT) caractéristiques de la formation de dimères UV-induite (Nakazawa *et al.*, 1993).

En accord avec des études épidémiologiques montrant clairement que les UV sont un des agents carcinogéniques les plus importants dans l'induction des tumeurs de la peau, les cellules HaCaT irradiées aux UV présentent des mutations de *p53*. Ces mutations ont été identifiées sur le codon 179 (C→T), mais aussi sur les codons 281-282 (CC→TT) (Lehman *et al.*, 1993) (Figure 6).

Selon Lehman, en 1993, les mutations sur p53 des cellules HaCaT sont responsables de l'immortalisation. Toutefois, les mutations de ce gène ne peuvent pas être les seules responsables dans le processus d'immortalisation de ces cellules. En effet, la transfection de mutant de p53 dans des kératinocytes humains ne permet pas l'induction de cette immortalité, ni la formation de la lignée HaCaT (Fusenig & Boukamp, 1998). En fait, après irradiation, les cellules HaCaT, cultivées dans un milieu appauvri en calcium et avec une température de l'ordre de 38,5°C, présentent un nombre croissant de cassures et de translocations chromosomiques. Ainsi, une température élevée et une faible concentration de calcium pourrait contribuer à l'augmentation du taux d'altérations génétiques durant le processus d'immortalisation des cellules HaCaT.



**Figure 6 :** Mutations du gène *p53* sur les cellules HaCaT irradiées aux UV

### III.1.1.3. Immortalisation *via* l'inactivation des télomères

D'autres altérations génétiques et d'autres mécanismes ont été proposés pour expliquer le processus d'immortalisation comme l'activation de l'enzyme télomérase (Whitaker *et al.*, 1995). Les cellules subissent au fil de leurs divisions une perte progressive de l'ADN des télomères, à moins que n'intervienne une enzyme très particulière, la

téломérase. Cette dernière est capable de compenser la perte de l'ADN télomérique en reconstituant sa séquence. Les cellules entrant en sénescence présentent un raccourcissement des télomères de leurs chromosomes ; les cellules échappant à cette sénescence ont des télomères plus longs. Dans les cellules HaCaT, l'activité de la téломérase est significativement augmentée dès la première division cellulaire réalisée, ce qui suggère une contribution de la téломérase dans le processus d'immortalisation des cellules HaCaT.

La régulation de la téломérase est corrélée avec le calcium. L'augmentation de la concentration calcique réduit l'activité de la téломérase de manière dose et temps dépendants (Bickenbach *et al.*, 1998). Ainsi l'absence du calcium empêcherait le rôle de la téломérase au cours de l'immortalisation.

### **III.1.2. Intérêts de la lignée cellulaire HaCaT**

L'immortalisation de cette lignée HaCaT apporte un certain nombre d'intérêts :

#### 1. Modèle de kératinocytes :

- La protéine p53 sauvage dans les kératinocytes est retrouvée à un niveau basal très faible du fait de sa courte durée de vie (15-20 minutes). En revanche, les protéines p53 mutées ont fréquemment des niveaux cellulaires élevés du fait d'un allongement de leur demi-vie (5-10 heures) (Fritsche *et al.*, 1993). Ces protéines ont, par conséquent, une plus forte stabilité, ce qui permet une étude quantitative et qualitative plus précise de cette protéine p53. Cette stabilité accrue résulterait d'une altération de l'environnement cellulaire plutôt qu'une résistance à la voie normale de dégradation. Suite à une lésion de l'ADN, la plupart des mutations ponctuelles affectant le gène *p53* augmente la stabilité de la protéine par modification de sa conformation, et conduit à une accumulation de la protéine p53 mutante au sein de la cellule et plus particulièrement dans le noyau.
- Bien qu'immortelles et ayant des altérations génétiques comme les mutations sur p53, les cellules de la lignées HaCaT ont largement gardé leur capacité à reconstituer un épiderme bien structuré après une transplantation *in vivo* (Boukamp *et al.*, 1988). De ce fait, les cellules HaCaT peuvent être considérée comme modèle de kératinocytes.

#### 2. Modèle pour étudier les cancers de la peau :

- Les cellules HaCaT sont considérées comme dérivées de kératinocytes. Toutefois, étiologiquement, il est émis comme hypothèse que les cellules HaCaT pourraient alors être représentatives du mécanisme d'induction des cancers de la peau (Boukamp *et al.*, 1988).



En 1998, Fusenig & Boukamp, les « parents » de l'immortalisation de la lignée cellulaire HaCaT, en déduisent que cette lignée est effectivement un modèle biologique *in vitro* significatif pour étudier les cancers humains de la peau.

### **III.2. Lignée M4Beu**

La lignée cellulaire M4Beu est obtenue à partir d'une métastase ganglionnaire d'un mélanome humain issu de l'épiderme.

Une large variété de modèle de métastases artificielles et spontanées a été développée dans des expérimentations animales. Ces modèles ont permis de caractériser des cellules cancéreuses métastatiques et de comprendre le processus métastatique. Ces études expérimentales de métastases de tumeurs humaines ont été en particulier développées par xénogreffe sur la peau de souris (Dore *et al.*, 1987). C'est ainsi qu'une transplantation sous cutanée d'un mélanome métastatique humain sur une souris peut engendrer des métastases sous cutanée, des métastases au niveau du poumon et des nodules lymphoïdes. En 1987, Dore et coll. ont ainsi établi la lignée M4Beu et ont pu déterminer que cette lignée était hétérogène car elle contient des cellules pauvrement tumorigènes *in vitro*, et hautement *in vivo*.

Les cellules de la lignée M4Beu représentent donc un modèle de lignée maligne issues de mélanome métastasé (Dore *et al.*, 1987). Cette lignée a permis de tester de nouvelles molécules capables de diminuer l'activité enzymatique de l'O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT), une protéine à activité tumorale. Une de ces molécule, appelée O6-benzyl-N2-acetylguanosine (BNAG), est un inhibiteur de l'AGT des cellules M4Beu greffées sur des souris ; elle permet d'augmenter le pouvoir anti-tumoral du N'-[2-chloroethyl]-N-[2-methylsulfonyl]ethyl]-N'-nitrosurea (CENU ou cystemustine) (Cussac *et al.*, 1994a). En effet, il a été démontré que la CENU, couplée à la BNAG, avait une activité anti-tumorale bien plus importante que celle de la CENU seule (Cussac *et al.*, 1994b ; Debiton *et al.*, 1997).

La lignée M4Beu est un mélanome invasif ; ses gènes, permettant l'acquisition de ce comportement invasif, ont été isolés. Ces gènes seraient la fibronectine, la cyclooxygénase 2 (Cox2) et la protéine "H-ras like" (Eleveld-Trancikova *et al.*, 2002).

La lignée cellulaire M4Beu n'a jamais fait l'objet d'une étude moléculaire sur le processus apoptotique ; d'où l'intérêt de l'utiliser dans notre étude.

## **CHAPITRE III : L' APOPTOSE**

L'apoptose est une mort cellulaire physiologique, qui a successivement reçu les noms de « mort cellulaire programmée », de « suicide cellulaire » puis d'« apoptose ». La notion d'apoptose a été introduite par Kerr, Wyllie et Currie en 1972, pour décrire une forme de mort cellulaire différente de la nécrose, seule forme connue à cette époque. Le terme "apoptose" a pour origine un mot grec ancien (« apo- ou achèvement et «-ptose » ou chute) qui évoque la chute des feuilles caduques en automne et sous-entend ainsi un rôle homéostasique.

L'apoptose est un processus actif d'autodestruction déclenché à la suite de signaux intra ou extra-cellulaires déclencheurs de mort, ou en l'absence de signaux de survie dans l'environnement de la cellule (stimuli physiologiques). L'apoptose peut également être observée dans des situations pathologiques, correspondant à une réaction de défense de l'organisme. Il se produit alors de profonds remaniements morphologiques et fonctionnels. Ce processus joue un rôle déterminant dans le développement et le fonctionnement du système nerveux et du système immunitaire, dans l'homéostasie cellulaire et la morphogénèse tissulaire, équilibrant ainsi le nombre de cellules d'un tissu normal. L'apoptose joue aussi un rôle considérable dans des pathologies telles que les maladies neurodégénératives, les infections virales et les cancers.

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 environnantes est ainsi préservée. L'apoptose s'inscrit ainsi dans la vie de la cellule au même titre que la différenciation ou la division cellulaire.

Depuis 30 ans, une littérature importante a permis de mieux comprendre la séquence des événements cellulaires, biochimiques et morphologiques, qui sont à la base des techniques de détection de l'apoptose.

## **I. 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.

L'intensité et la nature du stimulus initial déterminent souvent le choix entre ces deux façons de mourir.

### **I.1. Nécrose**

La nécrose représente une mort accidentelle et rapide de la cellule ; cette mort correspond à une agonie violente et traumatique de la cellule dès que celle-ci subit une agression extrême par des agents cytotoxiques physiques (UV ou autres radiations), chimiques (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, staurosporine...), ou lorsqu'elle est soumise à des variations extrêmes des conditions physiologiques (hypoxie, hypothermie...). Un phénomène passif et « désordonné » est observé ; il en résulte un clivage de l'ADN de manière aléatoire par des endonucléases (Dong *et al.*, 1997) 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 (Bortner & Cidlowski, 1996). Cette dernière, mais aussi les organites intracellulaires tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le noyau gonflent jusqu'à l'éclatement, libérant ainsi 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.

### **I.2. Apoptose**

Par opposition à la nécrose, l'apoptose est un processus actif et ordonné qui survient lors de l'évolution physiologique d'un organisme, mais aussi dans certaines situations pathologiques.

L'apoptose est caractérisée par des modifications morphologiques et biochimiques, très différentes de celles de la nécrose.

- Parmi les critères morphologiques, on observe une diminution du volume cellulaire, le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique au début du processus, une relocalisation

des organites cytoplasmiques, une condensation de la chromatine puis la fragmentation du noyau et du cytoplasme. La cellule se scinde en corps apoptotiques, délimités par une membrane intacte, contenant des organelles, des fragments nucléaires et un cytoplasme condensé.

- Parmi les critères biochimiques, on observe une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire ( $\Delta\Psi_m$ ), une externalisation des résidus phosphatidylsérines de la membrane plasmique, l'activation de protéases à cystéine ou caspases, et la fragmentation de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires ou de petits poids moléculaires (clivage entre les nucléosomes). Des marqueurs de surface, dont les résidus phosphatidylsérines, permettent la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages environnants *in vivo*.

L'apoptose résulte aussi d'un ensemble régulé d'activations enzymatiques et d'expression de gènes pro- et anti-apoptotiques. Ces activations et ces gènes vont induire l'autodestruction de la cellule, sans léser les cellules environnantes, préservant ainsi l'intégrité tissulaire, voire celle de l'organisme (Raff *et al.*, 1993). Ainsi, au cours de l'apoptose, il n'y a pas de libération de substances à partir du milieu intra-cellulaire, substances toxiques pour les cellules environnantes. Ces dernières ne sont donc pas affectées : il n'y a pas de réaction inflammatoire (Afford & Randhawa, 2000).

## **II. 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.

### **II.1. Rôle physiologique**

L'apoptose joue un rôle fondamental tout au long de la vie d'un organisme, du stade embryonnaire jusqu'à sa mort. Elle assure le remodelage et le maintien de l'homéostasie tissulaire, c'est à dire la conservation du nombre et de la qualité des cellules qui constituent les tissus (Evan & Littlewood, 1998). La mort cellulaire participe aux phénomènes de différenciation qui donnent naissance aux trois types de tissus cellulaires (mésoderme, endoderme et ectoderme) dont dériveront l'ensemble des cellules qui constituent le corps. Ce

processus apoptotique permet la formation de cavités, sculpte la forme interne et externe de l'embryon, et élimine toutes les structures devenues inutiles, comme par exemple les tissus qui séparent les doigts, permettant ainsi leur individualisation (Meier *et al.*, 2000). L'apoptose joue un rôle essentiel dans la sculpture des métamorphoses successives de notre corps : chez la femme, par exemple, elle est impliquée dans l'involution des seins après le sevrage (Strange *et al.*, 2001) ou dans la régression de l'endomètre utérin au cours des menstruations (Vinatier *et al.*, 2001).

L'apoptose participe également à la construction de nos deux organes de régulation les plus complexes, le cerveau et le système immunitaire.

La mise en place du réseau synaptique entre les neurones dépend d'un contrôle dynamique et séquentiel de la vie et de la mort. Une fois que le câblage en réseau des synapses est établi, la survie des neurones dépendra de la capacité de ces connexions à faire preuve de leur fonctionnalité. L'absence de circulation d'informations nerveuses à travers une synapse entraîne l'autodestruction des neurones qui la composent. Au cours du développement du système nerveux central chez les vertébrés, plus de la moitié des neurones vont mourir en quelques jours : disparaissent ainsi les neurones dits « inutiles » ou « dangereux ». Le contrôle de la vie et de la mort cellulaire par des signaux de l'environnement joue un rôle dans l'auto-organisation de la cellule. Ces signaux sélectionnent, parmi toutes les interactions neuronales initialement possibles, celles qui réussissent à faire preuve de leur capacité à fonctionner (Flanagan, 1999 ; Verhage *et al.*, 2000). La survie des neurones dépendrait de leur capacité à accéder à une quantité suffisante de facteurs neurotrophiques : ceux qui reçoivent suffisamment de facteurs neurotrophiques survivent, les autres dégénèrent (Raff, 1992). Il y a donc une sélection des neurones bien connectés. L'apoptose par privation de facteurs trophiques est un processus qui permet d'ajuster ainsi le nombre de neurones au nombre de cellules environnantes (Feldmann, 1999).

Ce sont des mécanismes semblables qui permettent la sculpture et la complexité de notre système immunitaire. 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 envahi. Les cellules immunitaires prolifèrent suite à la présence d'un agent étranger. Une fois celui-ci éliminé, de nombreuses cellules sont détruites pour ralentir ainsi la réponse immunitaire qui pourrait causer de graves dommages à l'organisme (Ekert & Vaux, 1997 ; Goldrath & Bevan, 1999).

Plusieurs dizaines de milliards de nos cellules s'autodétruisent, et certains territoires de l'organisme sont toujours recomposés. Les cellules de la couche superficielles de la peau, des intestins, de la muqueuse utérine et des vaisseaux, les polynucléaires de notre sang, etc..., subissent des phénomènes de différenciation terminale, déclenchant leur autodestruction. Ces cellules sont renouvelées en permanence par des cellules souches qui se dédoublent.

L'apoptose lie étroitement le destin de chaque cellule à celui d'une collectivité à laquelle elle appartient. Elle permet une régulation permanente du nombre de nos cellules, une régulation drastique de leur localisation géographique, et une adaptation constante entre les proportions relatives des différentes familles de cellules qui composent nos organes.

## **II.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...) (Tableau 3).

Le déficit de l'apoptose est souvent associé au développement de maladies auto-immunes et lymphoprolifératives (Neurath *et al.*, 2001 ; Rich *et al.*, 1999), mais aussi aux phénomènes de carcinogénèse (Agnantis & Goussia, 1999).

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) (Saikumar *et al.*, 1999). 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 (Thompson, 1995 ; Evan & Littlewood, 1998).

DEFICIT DE L'APOPTOSE	EXCES D'APOPTOSE
<p><b>Cancers :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cancer mammaire</li> <li>- Cancer de la prostate</li> <li>- Cancer ovarien</li> <li>- Lymphome folliculaire</li> <li>- Leucémies</li> <li>- Mélanome</li> <li>- Syndrome lymphoprolifératif</li> </ul> <p><b>Infections virales :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Herpes Virus (Virus d'Epstein Barr - EBV)</li> <li>- Poxvirus (Variole)</li> <li>- VIH</li> <li>- Hépatite C (VHC)</li> </ul> <p><b>Maladies auto-immunes :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lupus érythémateux disséminé</li> </ul> <p><b>Divers :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ostéoporose</li> <li>- Syndrome d'hyper-éosinophilie</li> </ul>	<p><b>Maladies neurodégénératives :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alzheimer</li> <li>- Huntington</li> <li>- Parkinson</li> <li>- Sclérose latérale amyotrophique</li> <li>- Syndrome myéلودysplasique</li> </ul> <p><b>Infections virales :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Herpes simplex virus-1 (HSV-1)</li> <li>- Influenza virus (grippe)</li> <li>- VIH</li> <li>- Hépatite B (VHB)</li> </ul> <p><b>Divers :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alopécie</li> <li>- Anémies aplasiques</li> <li>- Arthérosclérose</li> <li>- Colite ulcéraire</li> <li>- Infarctus du myocarde</li> <li>- Ischémies</li> <li>- Troubles hépatiques</li> <li>- Vieillissement</li> </ul>

**Tableau 3 :** Pathologies associées à un dérèglement du processus apoptotique



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 (Barinaga, 1998), 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 (Thompson, 1995).

Le déclenchement anormal ou excessif de l'apoptose intervient aussi lors de certaines infections virales, comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Selliah & Finkel, 2001 ; Muthumani *et al.*, 2003) et le virus de la grippe (Hay & Kannourakis, 2002).

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 cardio-vasculaires, les maladies neurodégénératives et les cancers, toutes liées comme nous l'avons vu à un excès ou un déficit d'apoptose (Johnson *et al.*, 1999).

### **III. Modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose**

En 1972, Kerr, Wyllie et Currie montrent que des cellules, en train de mourir par apoptose, développent des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques, différentes de celles observées chez les cellules entrant en nécrose. Depuis, de nombreux critères discriminants sont venus s'ajouter à ceux décrits par ces auteurs.

#### **III.1. Cytoplasme**

L'apoptose est caractérisée par une forte diminution du volume cellulaire, avec une importante condensation du cytoplasme. Cette réduction résulte d'une perte d'eau et d'électrolytes (Yu *et al.*, 1997), conséquence de l'inhibition du co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ . La condensation cytoplasmique est associée à une désorganisation du cytosquelette qui se manifeste par l'apparition de bourgeons membranaires appelées «blebbs».

L'activation des caspases est un des facteurs intervenant dans la désorganisation du cytosquelette de la cellule, suite au clivage de molécules telles que la gelsodine et la fodrine, molécules responsables de la structuration du cytosquelette (Earnshaw *et al.*, 1999).

Les transglutaminases, dont l'activité dépend du calcium, interviennent également dans la condensation du cytoplasme en catalysant la formation de ponts protéiques entre les résidus lysine et glutamine, formant ainsi des complexes insolubles (Fesus *et al.*, 1987). A ce stade, dans le cytoplasme, il existe une structure rigide constituée de protéines « transglutaminées ». La cellule apoptotique perd alors tout contact avec les cellules voisines.

La formation de bulles cytoplasmiques est probablement précédée par l'apparition, à la périphérie de la cellule, d'un chapelet de vésicules issues de la destruction des membranes (Feldmann, 1999).

### **III.2. Organites intracellulaires**

Une relocalisation des organites cytoplasmiques est observée : les mitochondries intactes se regroupent autour du noyau alors que dans certaines cellules comme l'hépatocyte, le réticulum endoplasmique semble se déplacer vers la périphérie de la cellule. Les ribosomes sont toujours présents à la surface du réticulum endoplasmique même quand des fragments de celui-ci se retrouvent dans des bulles cytoplasmiques (Feldmann, 1999).

Dans la plupart des inductions de l'apoptose, la première perturbation cellulaire détectable est une chute (ou dissipation) du potentiel transmembranaire mitochondrial (Petit *et al.*, 1995). Celle-ci est observée bien avant les altérations nucléaires et les modifications de la membrane plasmique : la mitochondrie joue un rôle important dans l'apoptose.

L'équipe de Nicotera a démontré que la survenue de l'apoptose était dépendante de la conservation du « pool » d'ATP cellulaire (Leist *et al.*, 1997), ce qui implique un maintien de l'intégrité, au moins dans les stades précoces de l'apoptose.

### **III.3. Noyau**

L'activation des caspases est un des facteurs intervenant dans la désorganisation de la membrane nucléaire suite au clivage de molécules telles que les lamines. Ces caspases clivent aussi la PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase), permettant ainsi la fixation sur l'ADN du domaine de liaison à l'ADN de PARP libéré ; ce qui empêche toute réparation (Del Bello *et al.*, 2004)

Le nucléole se transforme en un amas granuleux homogène. La diminution du volume nucléaire est liée à une condensation de la chromatine autour de la membrane nucléaire.

La marginalisation chromatinienne est suivie d'une pycnose chromatinienne (Earnshaw, 1995). La chromatine n'est plus localisée à la périphérie du noyau, mais elle se condense en de volumineux agrégats occupant une grande partie de la matrice nucléaire. Cette dernière forme ensuite un large croissant ou un anneau dense parfois complet.

Il se produit aussi des modifications de la membrane nucléaire qui se sépare des agrégats chromatiniens avant la fragmentation du noyau (Earnshaw, 1995 ; Stuppia *et al.*, 1996).

Au cours de la condensation chromatinienne, il existe deux sortes de fragmentation de l'ADN, celle de haut poids moléculaire et celle de petit poids moléculaire :

- Les fragments d'ADN de haut poids moléculaire sont de l'ordre de 50 Kpb à 300 Kpb (Oberhammer *et al.*, 1993).
- Les fragments d'ADN de petits poids moléculaire sont obtenus par clivage internucléosomal et sont de l'ordre de 150 à 200 pb (Wyllie, 1980 ; Kaufmann *et al.*, 2000).

Ces deux types de fragmentations dépendent du type cellulaire et de la nature du stimulus.

### **III.4. Membrane cytoplasmique**

La cellule en apoptose perd le contact avec les cellules voisines et/ou la matrice extracellulaire. Il est probable que ce phénomène s'accompagne d'altérations des jonctions, en particulier au niveau des desmosomes et des protéines d'adhésion, comme les intégrines, confirmant ainsi leur rôle prédominant dans l'apoptose (Meredith & Schwartz, 1997).

Une des premières modifications caractéristiques de l'apoptose, est le changement de polarité membranaire, c'est-à-dire la translocation des résidus phosphatidylsérines du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche phospholipidique (Savill & Fadok, 2000). 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 : on parle alors d'apoptose secondaire (ou encore de nécrose secondaire).

## IV. Phases et mécanismes généraux de l'apoptose

Les mécanismes du processus apoptotique se caractérisent par des cascades de signaux moléculaires. Ces mécanismes constituent des programmes apoptotiques performants, présents dans la plupart des types cellulaires : ils peuvent être initiés par une variété de signaux intra- ou extra-cellulaires. L'activation de la voie de transduction du signal pro-apoptotique dépend du type cellulaire et d'éléments sub-cellulaires de chaque stress. Mais quelles que soient les voies de transduction en amont, celles-ci convergent toujours vers une voie finale effectrice commune (Thompson, 1995).

L'apoptose peut être classiquement décrite en trois phases (Figure 7) :

- la phase d'initiation (ou de signalisation), 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 ( $H_2O_2$ , étoposide, cisplatine, camptothécine, staurosporine...) ou encore biologiques (ligands de récepteurs membranaires impliqués dans la mort cellulaire...).

Des régulateurs de l'expression génique (le facteur de transcription NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor-Kappa B), de la prolifération cellulaire (c-myc), 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 (Rich *et al.*, 2000).

- 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).

- 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.

### 1) INITIATION

- Récepteurs de mort : Fas /TNF...
- Chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ )
- Absence de facteurs de croissance
- Stress oxydant
- Ultra-violet
- Radiation  $\gamma$
- Agents cytotoxiques
- Chaleur
- etc...

### 2) REGULATION

- FADD / TRAF / TRADD / RIP ...
- Bcl-2 / Bax
- APAF-1
- Cytochrome c / dATP
- p53
- Protéines régulant le cycle cellulaire : p21<sup>WAF-1</sup> ...
- Facteurs de transcription
- Kinases / Phosphatases
- IAP
- SMAC/DIABLO
- Endo G
- Omi/HtrA2
- Etc...

### 3) EXECUTION

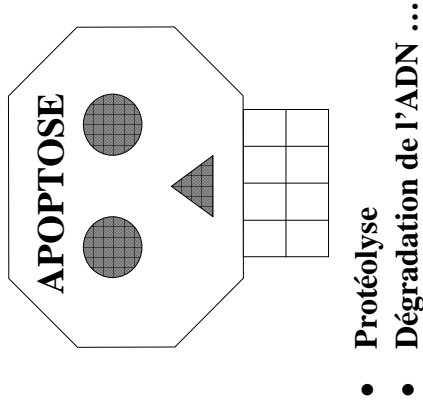


Figure 7 : Les trois phases du processus apoptotique

Nous présenterons les mécanismes de ces trois phases de la façon suivante :

- Au cours de la phase d'initiation, nous aborderons les deux voies de transduction du signal apoptotique, appelées voie extrinsèque et voie intrinsèque (Figure 8) :

⇒ La première voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires qui reçoivent des signaux extracellulaires. Cette voie est appelée **voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort**.

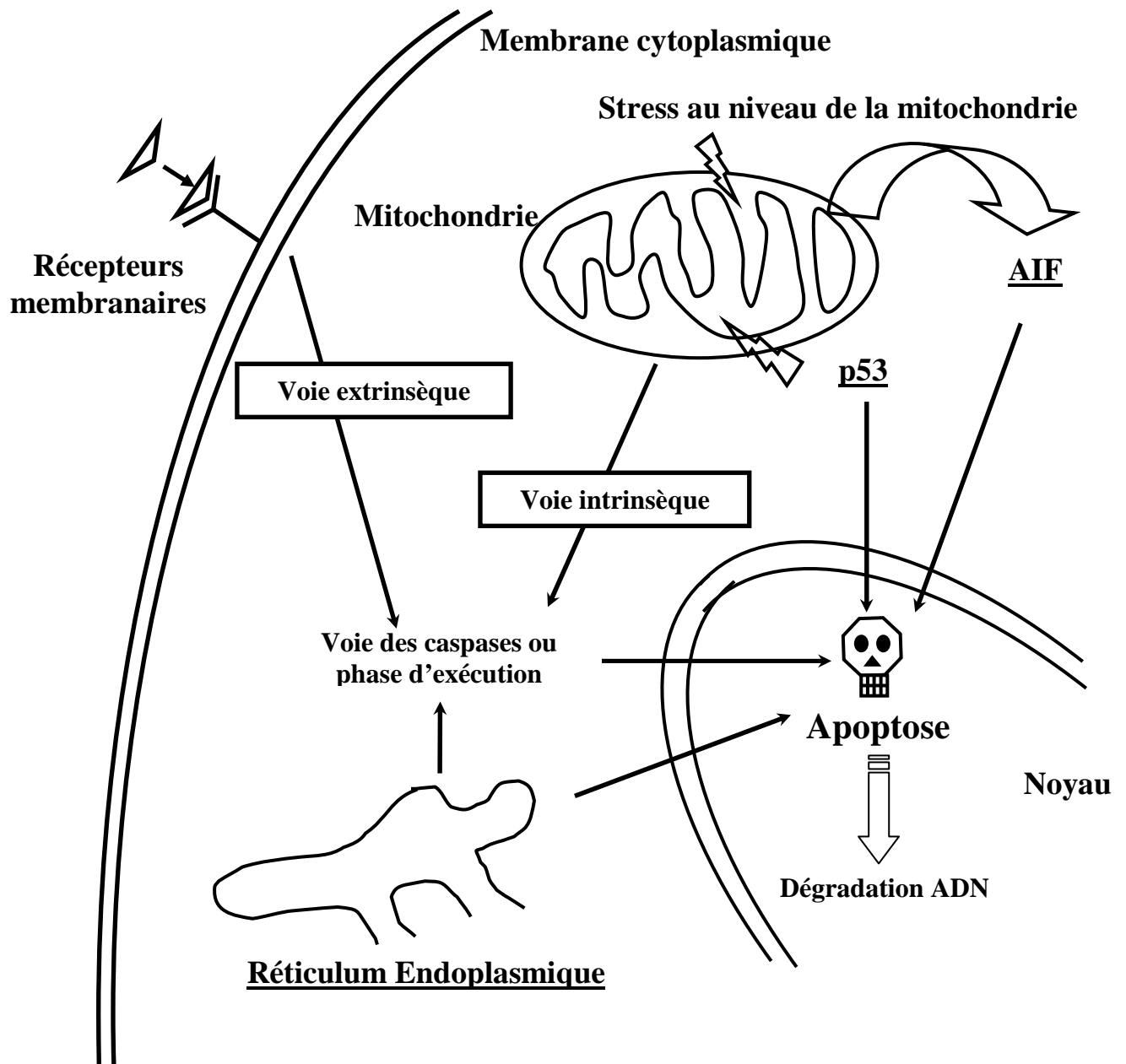
⇒ La deuxième voie est induite par des signaux internes comme le stress cellulaire ou la perturbation métabolique, et met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans la cellule. Cette voie est appelée **voie intrinsèque ou voie mitochondriale**.

- Puis, nous détaillerons la phase de régulation 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.

- Nous décrirons ensuite la phase d'exécution contrôlée par les caspases, qui est commune aux deux voies initiatrices extrinsèque et intrinsèque ; ces deux voies convergent vers une caspase commune (caspase-3), entraînant la dégradation de l'ADN.

- Enfin, nous préciserons les autres mécanismes régulant l'apoptose (Figure 8) :

- la voie caspase-indépendante mettant en jeu une protéine mitochondriale AIF (Apoptosis Inducing Factor) ;
- le réticulum endoplasmique (RE), un compartiment cellulaire pouvant aussi déclencher l'apoptose en cas de stress ;
- le suppresseur de tumeur p53, impliqué dans le maintien de l'intégrité du génome, jouant un rôle important dans le processus apoptotique.



**Figure 8 :** Représentation schématique des principales voies apoptotiques

## **IV.1. Phase d'initiation**

### **IV.1.1. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort**

La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort est initiée à la surface cellulaire par des liaisons entre des ligands de mort extracellulaires et des récepteurs de mort membranaires spécifiques. Ces récepteurs sont appelés récepteurs de mort car la liaison du ligand sur son récepteur déclenche une cascade d'évènements qui entraîne le processus apoptotique. Ces récepteurs possèdent des structures communes permettant de les regrouper dans une seule et même famille, celle des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) ou « TNF-R family » (Nagata, 1997).

Les ligands de la super famille du TNF sont, par exemple :

- TNF $\alpha$ ,
- FasL/CD95L (Fibroblast-associated Ligand),
- DR3L (Death Receptor 3 Ligand) ou TWEAK (weak homologue of TNF),
- TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand).

Les récepteurs les plus décrits sont :

- TNF-R (Tumor Necrosis Factor-Receptor),
- Fas/CD95/Apo1, DR3 (Death Receptor 3) (ou Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD),
- DR4,
- DR5 (ou Apo2, TRAIL-R2, TRICK2, KILLER),
- DR6,
- TRAIL R1 (Garg & Aggarwal, 2002 ; Borner, 2003).

Pour illustrer la voie des récepteurs de mort, nous avons choisi de présenter les voies les plus représentatives et les plus décrites, telles que celles des récepteurs TNF-R, de Fas/CD95 et de TRAIL-R.



#### IV.1.1.1. Le récepteur de mort TNF-R et son ligand TNF $\alpha$ (ou TNF)

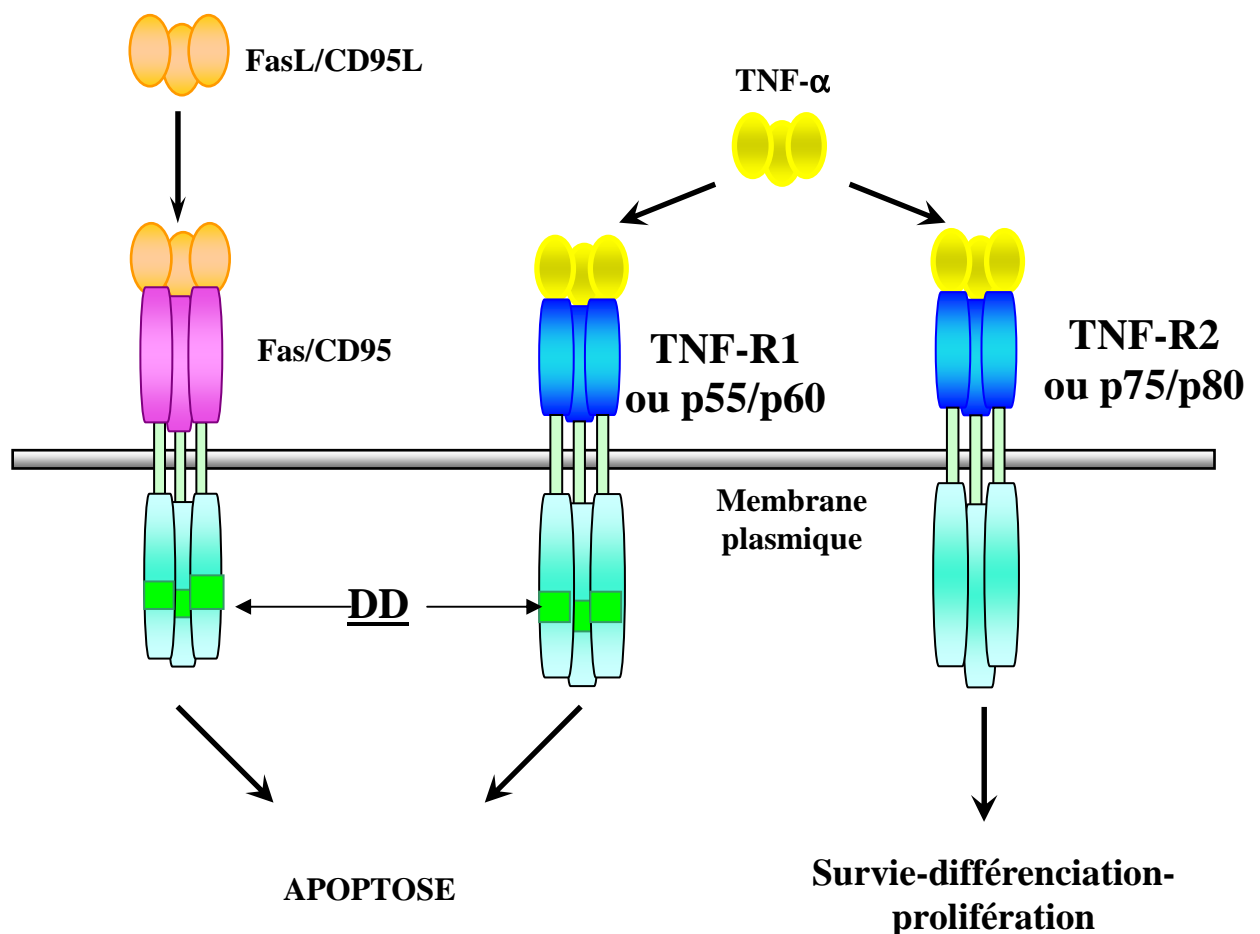
La cascade d'évènements induite par le ligand TNF commence par sa liaison avec les membres de la super-famille des récepteurs TNF-R. La liaison du ligand provoque la trimérisation puis l'activation du récepteur. Ce dernier induit une voie spécifique à l'apoptose, d'où son nom récepteur de mort (Chinnaiyan *et al.*, 1996). Toutefois, dans certains cas, ce récepteur TNF-R induit une voie tendant vers la prolifération, la survie ou la différenciation cellulaire (Arch & Thompson, 1999 ; Locksley *et al.*, 2001).

Les membres de la famille du récepteur TNF-R sont des protéines transmembranaires dont l'extrémité N-terminale est orientée vers le milieu extracellulaire (Nagata, 1997). Ce domaine extracellulaire contient deux à six régions riches en acide aminé cystéine ; ces régions permettent la liaison au ligand (Smith *et al.*, 1994).

Plus de 20 membres de la famille des récepteurs TNF-R ont été identifiés, et classés suivant deux voies d'activation (Figure 9) :

- Voie d'activation du récepteur TNF-R1 (ou p55/p60) qui induit le processus apoptotique :
  - Ces récepteurs possèdent dans leur structure intracellulaire un domaine de mort DD (Death Domain) : ils permettent la transmission d'un signal apoptotique par activation des caspases (cas des récepteurs TNF-R1 et Fas/CD95) (Figure 9).
- Voie d'activation du récepteur TNF-R2 (ou p75/p80) qui induit la survie, la différenciation et la prolifération :
  - Ces récepteurs ne possèdent pas de domaine de mort intracellulaire.

Les signaux de survie ou de mort induits par l'un ou l'autre des récepteurs dépend du recrutement des différent types de molécules adaptatrices en aval.



**Figure 9 :** Représentation schématique des voies d'activation des récepteurs TNF-R1, TNF-R2 et Fas/CD95

D'après Gupta *et al.*, 2003. (DD=Death Domain : apoptose)

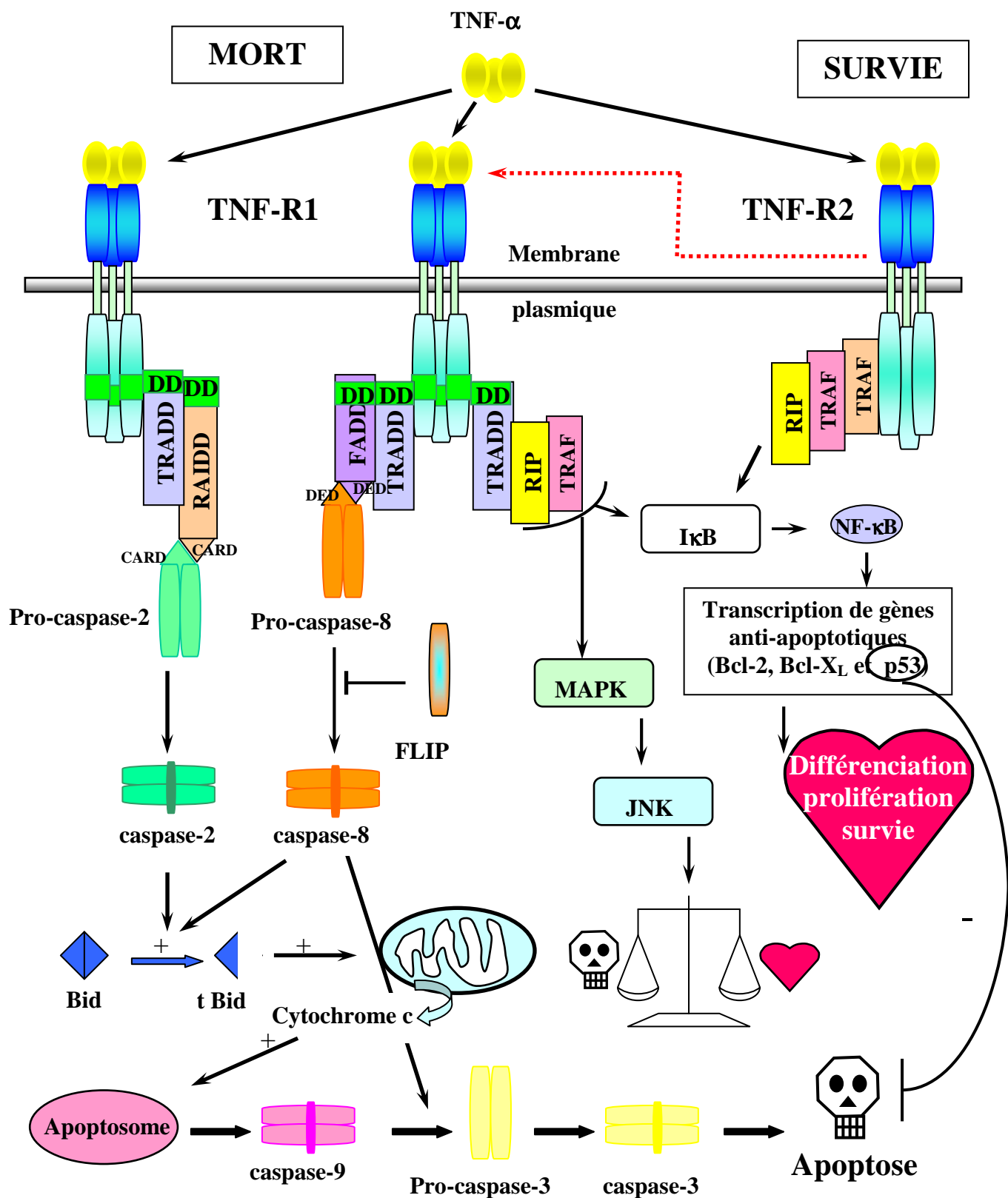
#### IV.1.1.1.1. Voie médiée par le récepteur TNF-R1

La voie apoptotique impliquant le récepteur TNF-R et son ligand TNF $\alpha$  est par exemple essentielle dans l'apoptose des cellules épithéliales tumorales (Gupta, 2003). Cette voie peut être activée en réponse à de nombreux autres stimuli que le ligand TNF, comme les molécules TNF-like : UV, irradiations  $\gamma$ , molécules chimiothérapeutiques, virus, bactéries, privation en cytokines, neurotrophines, facteurs de croissance ou détachement de la matrice extracellulaire (ou anoikis) (Borner, 2003).

La trimérisation du récepteur TNF-R1 entraîne au niveau de son domaine DD le recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques comme TRADD (TNF-R-Receptor Associated Death Domain), qui elle-même recrute FADD (Fas-Associated Death Domain) ou RAIDD

(RIPK1 Domain containing Adapter with DD), qui elle-même recrute (Figure 10). Ces protéines adaptatrices possèdent des domaines effecteurs de mort DED (Death Effector Domain) (comme TRADD) qui reconnaissent et fixent les DED des caspases initiatrices, notamment ceux des pro-caspases-8 et -10, et des domaines effecteurs de mort CARD (Caspase Recruitment Domain) (comme RAIDD) qui reconnaissent et fixent les CARD des caspases initiatrices, notamment ceux des pro-caspases-2. Ces protéines adaptatrices et ces caspases forment ainsi le casposome ou le complexe de signalisation de la mort induite, DISC (Death-Inducing Signalling Complex). Pendant la formation du DISC, la pro-caspase-8 est clivée et convertie en caspase-8 active qui sera libérée du DISC. La caspase-8 clive la protéine Bid (membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) qui stimule alors la mitochondrie et la voie intrinsèque (Luo *et al.*, 1998) ( § IV.3.). La caspase-8 active clive aussi les caspases effectrices -3, -6 et -7, permettant l'amplification du signal apoptotique. Les caspases effectrices, principalement la caspase-3, clivent de nombreux substrats provoquant ainsi l'apoptose. La voie de la caspase-8 peut être bloquée par des inhibiteurs de caspases tels que FLIPs (FLICE Inhibitory Protein) (Ekert *et al.*, 1999), molécules homologues des caspases, qui contiennent un domaine DED et se lient à FADD, empêchant ainsi l'activation de la caspase-8.

Cette voie de signalisation des récepteurs de mort peut aussi intervenir dans les lymphocytes T pour induire un signal de survie par recrutement d'autres molécules adaptatrices. En effet, il a été montré que le récepteur TNF-R1 induisait aussi des signaux de survie par recrutement de certaines molécules adaptatrices telles que TRAF-2 (Figure 10). Le mécanisme par lequel se fait le changement de voie (entre mort et survie) dans ce type cellulaire est encore mal connu.




[Casposome ou DISC = TRADD – FADD – Pro-caspase-8]

**Figure 10 :** Représentation schématique des voies de signalisation de l'apoptose dues aux récepteurs de mort TNF-R1 et TNF-R2

#### IV.1.1.1.2. Voie médiée par le récepteur TNF-R2

La voie de signalisation mettant en jeu le récepteur TNF-R2 permet le recrutement des molécules TRAF-1 et TRAF-2, au niveau de la partie cytoplasmique du récepteur ne possédant pas de domaines DD (Figure 10). Le lien de TRAF-2 à la protéine RIP (Receptor Interactive Protein) permet l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Ce dernier est un répresseur de l'apoptose (Liu ZG *et al.*, 1996 ; Beg & Baltimore, 1996) et provoque le maintien de la survie à la fois par prolifération et par différenciation cellulaire (Garg & Aggarwal, 2002).

Le TNF-R2 peut réguler TNF-R1 par transcription ; TNF-R1 recrute alors les molécules TRAF2 (TNF-Receptor-Associated Factor 2) et RIP (Figure 10 ). Ces molécules adaptatrices conduisent à l'activation des MAPK (Mitogen-Activated Protein kinase) jusqu'à la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase) ou à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-Kappa B) par l'intermédiaire de la kinase I- $\kappa$ B (Inhibitor of NF-kappa B Kinase). Si le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est un répresseur de l'apoptose, les MAPK peuvent inhiber (Darnay & Aggarwal, 1997) ou activer l'apoptose (Ichijo *et al.*, 1997).

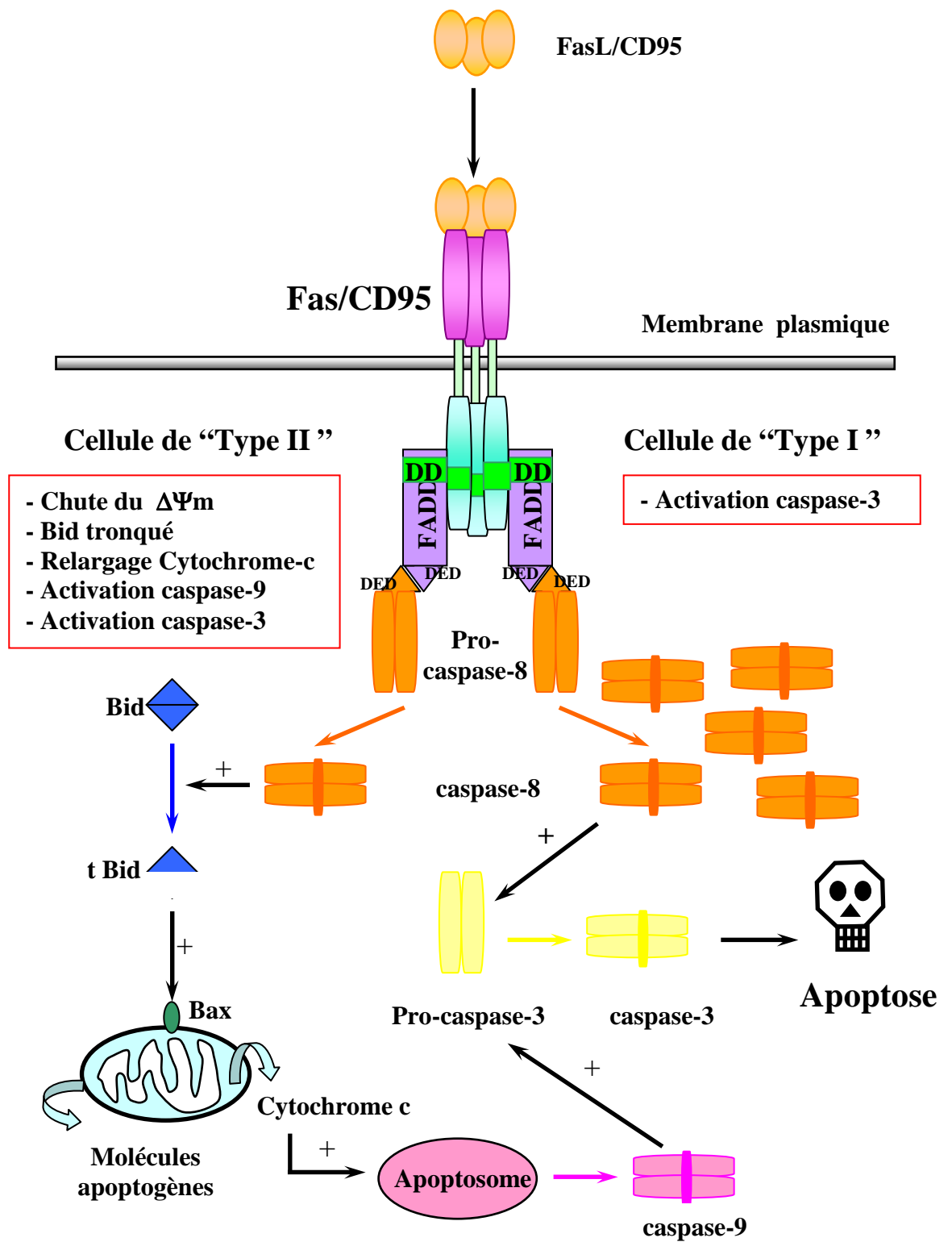
Toutefois, Lin *et al* (1999) ont démontré que RIP pourrait être un substrat de la caspase-8 lors de l'apoptose induite par le TNF et bloquerait l'activation de NF- $\kappa$ B. Dans ce cas, RIP joue dans cette signalisation un rôle opposé, c'est-à-dire pro-apoptotique. RIP serait aussi capable de recruter RAIDD (RIP-K1 Domain containing Adaptor with Death Domain) ; en effet, dans certains types cellulaires, cette protéine RAIDD contient un domaine CARD (CAspase Recruitment Domain) lui permettant d'interagir avec la caspase-2. Cette dernière, comme la caspase-8, clive la protéine Bid, qui elle même provoque le relargage des facteurs apoptogènes mitochondriaux ; ainsi, la caspase-2 induit l'apoptose (Ashe & Berry, 2003).

Si il est admis que le récepteur TNF-R2 joue un rôle dans la survie cellulaire, il pourrait également réguler l'apoptose et jouer un rôle dans la régulation des signaux de mort induits par le récepteur TNF-R1 (Grell *et al.*, 1999 ; Gupta, 2003). Ainsi, selon Gupta, la voie d'activation du récepteur TNF-R2 ne pourrait pas être strictement caractérisée par le terme de survie cellulaire mais aussi par celui d'apoptose. Toutefois, pour induire l'apoptose, le récepteur TNF-R2 est obligé de passer par la voie des caspases et donc, *via* le récepteur TNF-R1.

#### IV.1.1.2 Le récepteur de mort Fas/CD95 et son ligand FasL/CD95L

Il existe un autre récepteur de mort bien connu, impliqué dans la voie extrinsèque, le récepteur Fas/CD95 et son ligand FasL/CD95L (Figures 9 et 11). La transmission du signal apoptotique par le ligand FasL/CD95L passe par la formation du complexe multiprotéique DISC formé, ici, par l'agrégation du récepteur Fas/CD95, de la protéine FADD et de la pro-caspase-8. FADD possède un domaine de mort (DD) homologue à celui du récepteur Fas/CD95 ; ce domaine permet leur association (Boldin *et al.*, 1995). A son autre extrémité N-terminale, FADD possède un DED indispensable au recrutement et à l'activation de la caspase-8 et, de ce fait, une protéine FADD possédant un domaine DED tronqué ne peut induire l'activation de l'apoptose (Chinnaiyan *et al.*, 1996). Après le recrutement de FADD et de la pro-caspase-8, la formation d'oligomères de pro-caspase-8 suffit à activer son auto-protéolyse : la sous-unité catalytique de la caspase-8 est alors libérée dans le cytoplasme (Martin *et al.*, 1998 ; Salvesen & Dixit, 1999) (Figure 11).

L'importance de la voie mitochondriale a été récemment démontrée dans la mort induite par le récepteur Fas/CD95 (Fulda *et al.*, 1998). Un membre de la famille de Bcl-2, la protéine Bid (Luo *et al.*, 1998), constitue un des liens entre la voie du récepteur Fas/CD95 et la voie mitochondriale (Li *et al.*, 1998). La protéine Bid tronquée, t-Bid, issue du clivage par la caspase 8, est transférée du cytoplasme à la mitochondrie. En se liant à la protéine Bax (un autre membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) présente sous forme monomérique dans le cytosol, t-Bid induit l'oligomérisation de Bax et son intégration dans la membrane externe mitochondriale. Cette liaison Bax/Bid entraîne l'ouverture de mégapores mitochondriaux à l'origine de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ; cette ouverture permet la libération du cytochrome c (Eskes *et al.*, 2000), ainsi que d'autres facteurs apoptogènes (AIF, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, Endo G, caspase-2, -3, -9). Cette ouverture des pores mitochondriaux entraîne aussi la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-9 qui activera la caspase-3 (Li *et al.*, 1998).



**Figure 11** : Représentation schématique de la voie de signalisation de l'apoptose due au récepteur Fas/CD95

L'activation de la voie apoptotique en aval du récepteur Fas/CD95 a permis de distinguer deux types de cellules (Scaffidi *et al.*, 1998) (Figure 11) :

- Les cellules de type I induisent l'apoptose uniquement *via* l'activation des caspases -8 et -3 et sont indépendantes d'une activité apoptotique *via* la mitochondrie. Dans ce processus, la caspase-8 active par clivage la caspase-3, caspase effectrice conduisant inéluctablement vers une mort apoptotique (Slee *et al.*, 1999). Il est à noter que la caspase-8 est essentielle à la mort cellulaire induite par le récepteur Fas/CD95 (Varfolomeev *et al.*, 1998).

- Dans les cellules de type II, l'activation de la voie apoptotique mitochondriale est indispensable. A ce jour, aucun argument, hormis la quantité de caspase-8 recrutée et clivée au niveau du DISC (faible dans les cellules de type II et importante dans les cellules de type I), ne permet d'expliquer, suite à l'activation du récepteur Fas/CD95, le choix entre la voie mitochondriale ou la voie caspase dépendante (Scaffidi *et al.*, 1999).

Dans la mort induite par le récepteur Fas/CD95, l'identification des cellules de type I ou de type II dépend du rôle des membres de la famille Bcl-2 (§ IV.2.).

Les protéines de la famille Bcl-2 ne joueraient aucun rôle dans la mort induite par le récepteur Fas/CD95 dans les cellules de type I où une activation directe des caspases est suffisante. En revanche, dans des cellules de type II pour lesquelles une amplification du signal d'activation *via* la voie mitochondriale est nécessaire, la mort induite par le récepteur Fas/CD95 serait modulée par des protéines pro-apoptiques de la famille Bcl-2 (Scaffidi *et al.*, 1998).

#### **IV.1.1.3 Le récepteur de mort TRAIL-R et son ligand TRAIL**

Parmi les membres de la famille du récepteur TNF-R (ou « TNF-R family »), il existe d'autres ligands dont TRAIL (TNF-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand) ou Apo2L. Par fixation sur son récepteur de mort spécifique TRAIL-R, le ligand TRAIL induit l'apoptose principalement dans des lignées cellulaires tumorales, et pas dans les cellules normales. Ce ligand TRAIL est exprimé de manière importante dans un grand nombre de tissus. Il existe quatre membres de récepteurs TRAIL-R 1 à 4, qui seraient capables d'induire différents signaux, apoptotiques ou non, en fonction du type cellulaire (MacFarlane, 2003). Les voies de signalisation induites par le ligand TRAIL sont similaires à celles induites par les ligands TNF $\alpha$  ou FasL/CD95L.



## IV.1.2. Voie intrinsèque ou voie mitochondriale

Il convient de rappeler les fonctions physiologiques de la mitochondrie avant de présenter son rôle au cours de l'apoptose.

### IV.1.2.1. Fonctions physiologiques de la mitochondrie dans la cellule

En 1890, Altmann découvrit un ensemble d'organites intra-cytoplasmiques, différents au niveau de leur forme et de leur nombre, mais semblables au niveau structural : ce « bioplaste » fut baptisé chondriome (du grec *chodrion* « petit grumeau ») par Meves en 1908, puis mitochondrie par la suite. Les mitochondries seraient apparues il y a 1,5 milliard d'années par association symbiotique entre leur « ancêtre », une cyanobactérie et un proto-eucaryote (Dyall & Johnson, 2000). Elles possèdent une série de caractéristiques qui reflètent leur origine endosymbiotique avec une double membrane délimitant deux compartiments : la matrice et l'espace intermembranaire. La mitochondrie comporte également un génome circulaire et des systèmes propres de transcription-traduction. La membrane interne (MI) sépare la matrice de l'espace intermembranaire et la membrane externe (ME) sépare l'espace intermembranaire du cytoplasme (Figure 12).

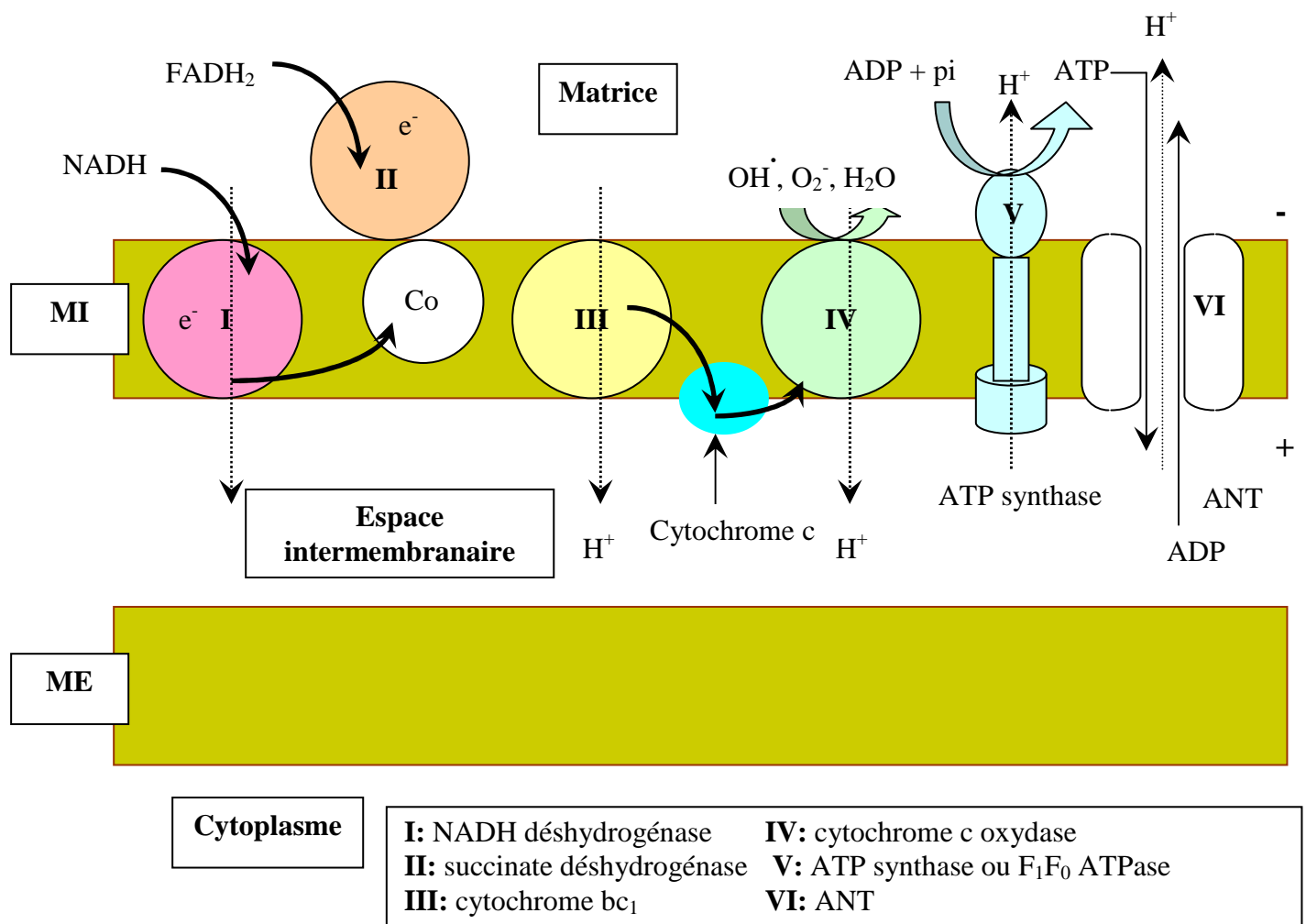
Le nombre, la taille et la position des mitochondries dépendent du type cellulaire et reflètent les besoins énergétiques de la cellule.

La principale fonction des mitochondries est de produire de l'énergie, toutefois elle génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et permet aussi la régulation de l'apoptose. La mitochondrie génère l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) grâce au processus de phosphorylation oxydative qui a lieu au niveau de la MI. Dans les conditions physiologiques, la MI est quasi imperméable. Au cours de la phosphorylation oxydative, des électrons sont générés à partir du NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), produit par l'oxydation des nutriments. Ces électrons sont ensuite transférés à l'oxygène moléculaire par une série de quatre complexes enzymatiques : NADH déshydrogénase (I), succinate déshydrogénase (II), cytochrome  $bc_1$  (III) et cytochrome *c* oxydase (IV). Ces différents complexes sont tous présents dans la membrane interne de la mitochondrie. Le passage des électrons entre ces complexes produit de l'énergie qui est utilisée pour expulser des protons  $H^+$  de la matrice vers l'espace intermembranaire. Ce couplage chimio-osmotique crée un gradient électrochimique ( $\Delta\Psi$ ) que l'on appelle aussi potentiel transmembranaire, positif et acide du côté externe de la membrane interne, et négatif dans la matrice. L'existence du

potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) autorise une diffusion facilitée et spontanée de  $H^+$  de la matrice par le canal  $F_0$  de la  $F_1F_0$  ATPase (ATP synthase, complexe V). Ce flux de protons est utilisé par ce complexe pour fabriquer de l'ATP qui est exporté en échange d'ADP par le translocateur nucléotidique à adénine, ANT (Adenine Nucleotide Translocator, complexe VI) ; ce dernier fonctionne comme un antiport.

La phosphorylation oxydative est la principale source de ROS (anion superoxide  $O_2^-$ , peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , radical hydroxyl  $OH^\bullet$ ) qui sont des radicaux libres impliqués dans l'apoptose, engendrant ainsi des dommages oxydatifs des lipides, des protéines et de l'ADN (Hanson & Clegg, 2002).

Bien qu'elle est un rôle essentiel dans la production d'énergie pour la cellule, il est clairement décrit aujourd'hui que la mitochondrie est un des acteurs principaux de l'apoptose (Green & Kroemer, 1998).



**Figure 12 :** La chaîne de respiration mitochondriale

#### IV.1.2.2. Rôle de la mitochondrie dans le processus apoptotique

Certains auteurs tels que Kroemer et coll., en 1997, décrivent la mitochondrie comme le centre des phénomènes apoptotiques qui fonctionnent selon un modèle triphasique comprenant :

- une phase d'initiation ou d'induction au cours de laquelle les signaux inducteurs d'apoptose convergent vers la mitochondrie ;
- une phase de régulation ou de décision contrôlée par les membres de la famille de protéines Bcl-2 entraînant la perméabilisation des membranes mitochondriales (MMP) et la libération de facteurs apoptogènes (sIMPs, soluble Intermembrane Mitochondrial Proteins) ;
- une phase d'exécution ou de dégradation mettant en jeu les caspases et DNases qui dégraderont de nombreux constituants cellulaires (Green & Kroemer, 1998) (Figure 13).

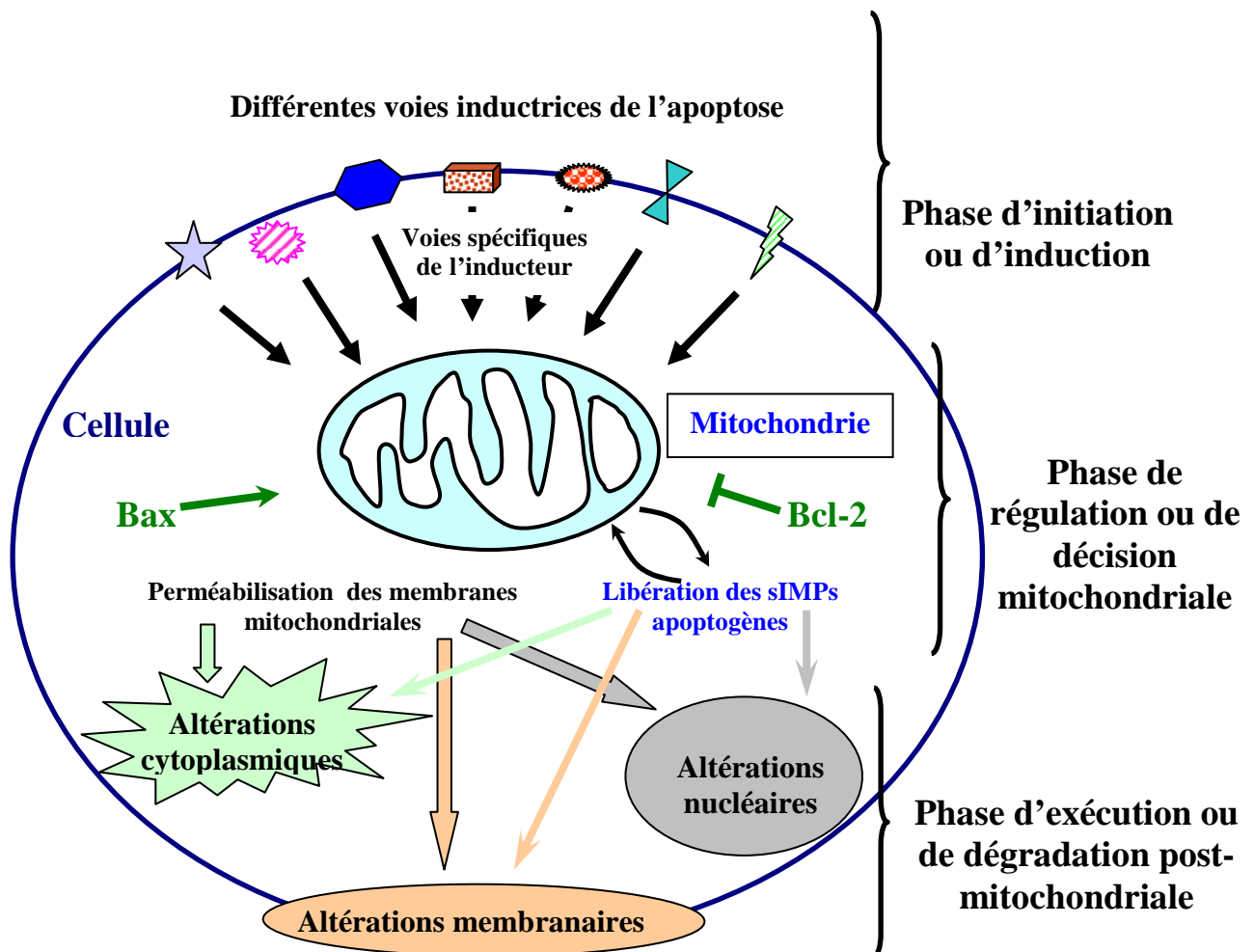


Figure 13 : Modèle de la cascade apoptotique impliquant la mitochondrie

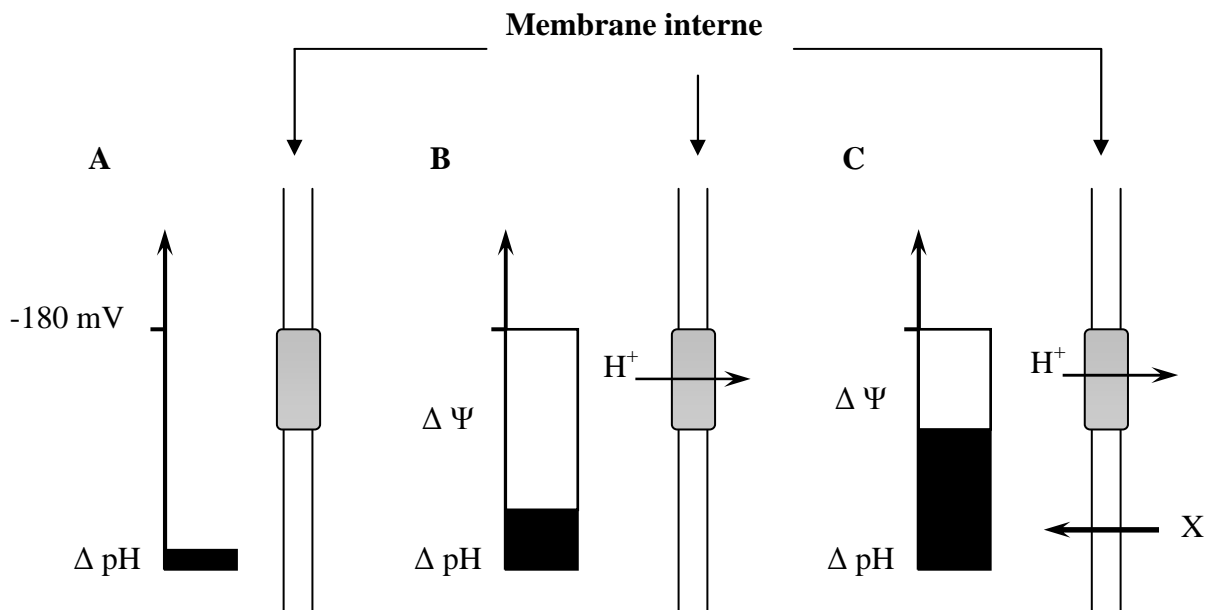
(D'après Jacotot *et al.*, 2000)

#### IV.1.2.2.1. Potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Avant d'expliquer l'importance du  $\Delta\Psi_m$  dans le processus apoptotique, il convient de rappeler ce qu'est un potentiel.

Un gradient de protons existe à travers la membrane interne (MI) des mitochondries et il est couplé à l'activité de la chaîne respiratoire (Murphy & Brand, 1987). Ce gradient comporte deux composantes : un potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ) et un gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ). L'énergie stockée sous forme de  $\Delta\text{pH}$  ou de  $\Delta\Psi$ , contrôle la synthèse de l'ATP par le complexe enzymatique  $F_1F_0$  ATPase ; celui-ci fonctionne comme une pompe à proton (Mitchell, 1979). Il est couramment admis que les mitochondries des cellules de mammifères expriment l'essentiel du gradient électrochimique principalement par un potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ) (environ 180 mV) et par un faible gradient de pH (de l'ordre de 60 mV).

En commençant par des mitochondries désénergisées (Figure 14A), l'initiation de la respiration (Figure 14B) donne naissance à un fort  $\Delta\Psi$  et un faible  $\Delta\text{pH}$ . Dans un milieu contenant une molécule X, si cette dernière perturbe le  $\Delta\Psi$ , elle le fait chuter systématiquement mais permet simultanément l'existence d'un fort  $\Delta\text{pH}$  (Figure 14C).

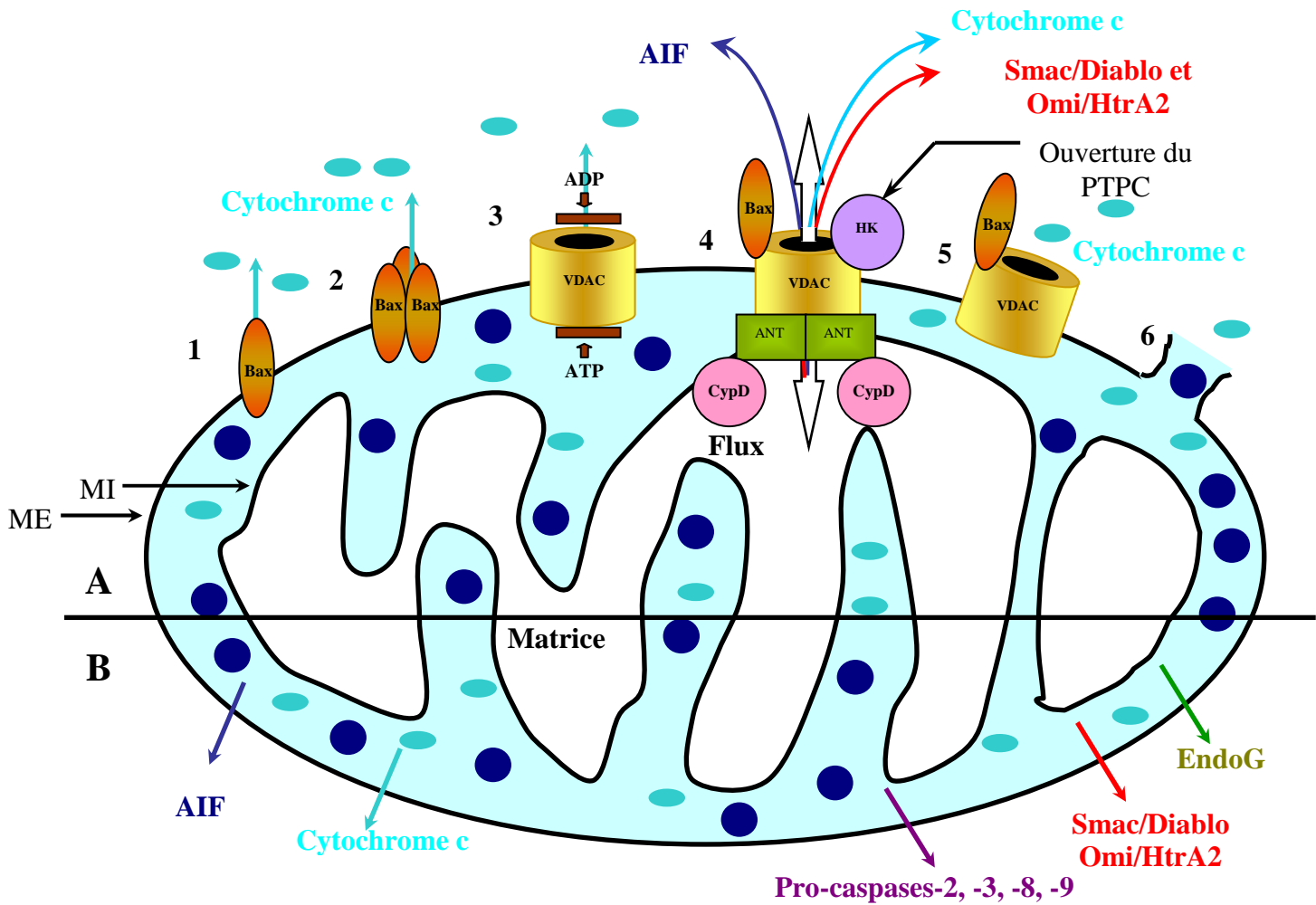


**Figure 14** : Représentation schématique de la chute du  $\Delta\Psi_m$

La première perturbation cellulaire détectable au cours du processus apoptotique est une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Dans le cas où l'apoptose se fait *via* la mitochondrie. Elle se produit bien avant l'exposition des phosphatidylsérines au niveau de la membrane cellulaire, la fragmentation de l'ADN, l'activation de la cascade des caspases et l'activation des endonucléases (Kroemer *et al.*, 1997). A la suite de la chute du  $\Delta\Psi_m$ , la mitochondrie libère des protéines apoptogènes séquestrées dans l'espace intermembranaire mitochondrial, parmi lesquelles la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor), le Cyt-c (cytochrome c), Smac/Diablo (Second Mitochondrial Activator of Caspases or Direct IAP Binding Protein with Low pI), Omi/HtrA2, les procaspases-2, -3, -8 et -9, et l'Endo G (endonucléase G) (Parone *et al.*, 2002 ; Antonsson, 2004) (Figure 15B).

#### **IV.1.2.2.2. Perméabilisation des membranes mitochondriales**

De nombreuses études concernant les mécanismes de relargage des protéines mitochondriales apoptogènes se sont surtout focalisées sur le relargage du Cyt-c (Parone *et al.*, 2002). Le mécanisme exact de ce relargage n'est pas encore tout à fait connu mais plusieurs hypothèses sont proposées. On sait aujourd'hui que les membres de la famille de protéines Bcl-2 sont capables de former des canaux dans les membranes lipidiques : ils ont donc été les premiers candidats désignés pour la formation de pores dans la membrane externe (ME) mitochondriale afin de permettre la libération du Cyt-c. Plusieurs études ont montré que les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak pouvaient s'insérer dans la membrane mitochondriale et former des oligomères avec des pores assez larges pour permettre le passage du Cyt-c (Korsmeyer *et al.*, 2000). Ceci a été démontré sur des liposomes et des mitochondries isolées, où l'incubation avec les protéines pro-apoptotiques Bax, Bad, Bim ou Bid déclenche une perméabilisation des membranes mitochondriales. Bax et Bid s'associent pour former des pores au niveau de la ME mitochondriale, tout comme Bad avec Bim. D'autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bcl-2, sont capables d'empêcher le relargage du Cyt-c en interférant avec Bax et Bak dans la formation des pores (Borner, 2003).



**Figure 15 :** La mitochondrie au cours du processus apoptotique

**A :** Chute du potentiel transmembranaire et mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales

**B :** Libération des molécules apoptogènes

En ce qui concerne, le déclenchement de la perméabilité membranaire mitochondriale, plusieurs mécanismes pourraient coexister faisant intervenir, pour la plupart, la protéine pro-apoptotique Bax :

- La protéine Bax s'ancre dans la ME mitochondriale induisant la formation d'un pore assez large pour permettre la sortie du Cyt-c (Figure 15A-1). Cet ancrage pourrait s'effectuer par liaison directe avec un lipide ou une protéine membranaire, ou bien par un changement conformationnel lui permettant d'une part son ancrage à la membrane mitochondriale et d'autre part la formation d'un pore assez large pour autoriser la sortie du Cyt-c (Borner, 2003).

- Une autre hypothèse décrit une oligomérisation de Bax dans la ME mitochondriale (Borner, 2003) (Figure 15A-2). En effet, une mutation au niveau du domaine d'oligomérisation de Bax ou de Bak inhiberait leur fonction pro-apoptotique (Antonsson & Martinou, 2000). Ainsi, la multimérisation de Bax pourrait favoriser son changement conformationnel et favoriser la sortie du Cyt-c.

- Bax pourrait également se lier à des canaux déjà présents à la surface de la ME mitochondriale (Figure 15A-4). Le pore de transition de perméabilité ou PTPC (Permeability Transition Pore Complex) est un complexe polyprotéique localisé au point de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe (Loeffler & Kroemer, 2000). Les principaux composants de ce complexe, qui pourraient varier en fonction du type cellulaire ou de l'état physiologique, sont le translocateur ANT, la porine ou VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), protéine la plus abondante de la ME mitochondriale, une hexokinase (HK) et la cyclophiline D (Cyp D) (Zamzami & Kroemer, 2001). La chute du  $\Delta\Psi_m$  serait la conséquence de l'ouverture du PTPC ; en effet la liaison de Bax avec PTPC régulerait la taille du pore pour permettre la sortie de molécules d'un poids moléculaire supérieur à 1,5 KDa comme le Cyt-c (15 KDa), l'AIF (57 KDa), Smac/Diablo (29 KDa) et Omi/HtrA2 (49 KDa) (Borner, 2003).

- Le VDAC pourrait former un pore lipidique sous l'influence de la protéine Bax fixée à VDAC, et ainsi favoriser la sortie du Cyt-c. Ce pore indépendant s'apparente au PTPC et conduit à la dissipation du gradient de proton et au gonflement de la matrice (Fig. 15A-5).

- La fermeture de VDAC permettrait l'altération de l'échange ATP/ADP (Vander Heiden *et al.*, 1999) (15A-3). Dans les conditions normales, les protons qui accèdent à l'espace intermembranaire (grâce au couplage chimio-osmotique) retournent dans la matrice *via*  $F_1F_0$  ATPase. Lorsque le VDAC se ferme, l'ADP n'entre plus dans la mitochondrie ; la  $F_1F_0$  ATPase ne fonctionne plus et les protons s'accumulent dans l'espace intermembranaire. Cela entraîne une perturbation générale du métabolisme mitochondrial qui déclenche le gonflement de la matrice et la production de ROS. La protéine Bcl-X<sub>L</sub> pourrait interagir avec le VDAC et le maintenir ouvert prévenant ainsi le dysfonctionnement mitochondrial et l'apoptose (Vander Heiden *et al.*, 1999).

- La sortie du Cyt-c pourrait être aussi due à la rupture des membranes mitochondriales laissant sortir également les molécules apoptogènes (Figure 15A-6).

Même si les mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales ne sont pas encore clairement définis, les molécules mitochondriales apoptogènes s'échappent de la mitochondrie à la suite de la chute du potentiel transmembranaire.

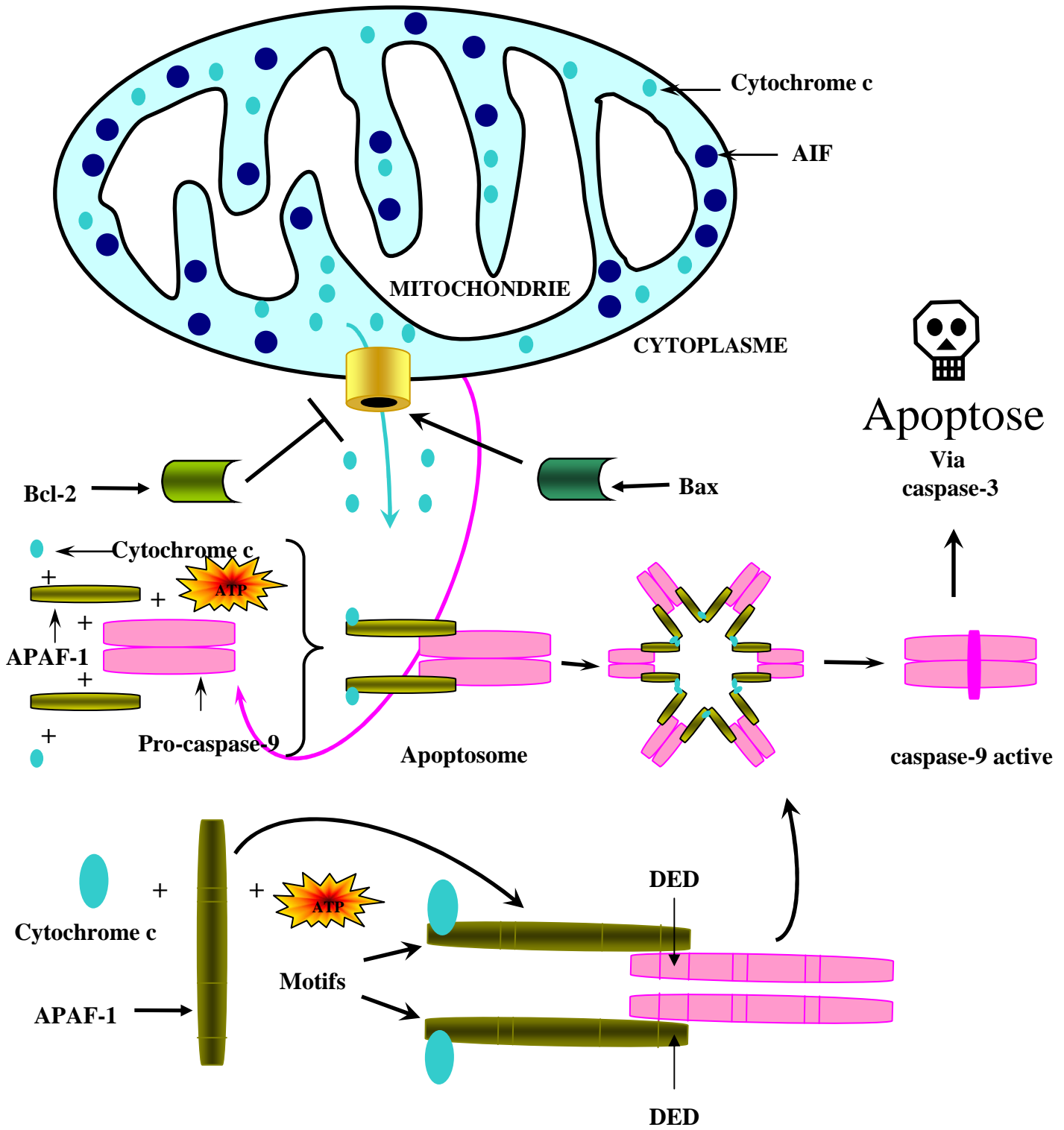
#### IV.1.2.2.3. Libération des molécules apoptogènes

Selon Kroemer, la mitochondrie est comparable à la boîte de Pandore, où, suite au déséquilibre ionique et à la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, la mitochondrie libère les protéines apoptogènes (ou sIMPs) qui ont pour fonction d'induire la mort cellulaire (Figure 15B).

Le **cytochrome c** est codé par un gène nucléaire qui est transcrit puis traduit dans le cytoplasme en un précurseur, l'apo-cytochrome c, incapable de participer au processus apoptotique. Ce précurseur est ensuite transporté dans la mitochondrie où il est transformé en une protéine globulaire par une cytochrome c lyase, qui catalyse l'attachement du précurseur à un noyau hème par des liaisons covalentes. On l'appelle alors holo-cytochrome c ; celui-ci est séquestré dans l'espace intermembranaire mitochondrial où il permet le transport d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ravagnan *et al.*, 2002) (Figure 11). En 1996, Liu *et al.* ont observé que l'holo-cytochrome c est indispensable à l'activation de la caspase-3 dans un système a-cellulaire. D'autres équipes ont démontré ensuite que le relargage du Cyt-c et l'activation de la caspase-3 sont bloqués par la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Kluck *et al.*, 1997 ; Yang *et al.*, 1997). Aujourd'hui, il est clairement établi qu'à la suite d'un stimulus apoptotique, Bax stimule la sortie du Cyt-c par un pore de la mitochondrie. Ainsi le Cyt-c transloque de la mitochondrie vers le cytoplasme de la cellule, où il s'associe à l'APAF-1 (Apoptosis-Protease Activating Factor-1) pour former un complexe protéique : l'apoptosome (Figure 16). Le cytochrome-c se lie au domaine C-terminal de l'APAF-1 dans une région riche en motifs répétés WD (W=tryptophane et D=acide aspartique), connus pour être impliqués dans les interactions protéines-protéines (Neer *et al.*, 1994). Ces interactions facilitent la fixation de l'ATP par l'APAF-1 qui se dimérise par attachement de ces domaines N-terminaux. La fixation du Cyt-c et de l'ATP provoque l'oligomérisation et un changement conformationnel de l'APAF-1 qui s'accompagne du recrutement de la pro-caspase-9 ; cette dernière est aussi libérée par la mitochondrie (Figure 16) (Ravagnan *et al.*, 2002). La pro-caspase-9 se lie aux domaines CARD (CAspase Recruitment Domain) de l'APAF-1, ce qui provoque l'activation de la caspase-9 (Figure 16). L'importance de ce complexe chez les mammifères a été montrée par des études génétiques chez la souris où des animaux déficients en Cyt-c ont une surproduction de cellules neurales, due à un déficit d'apoptose, se traduisant alors par une mort prénatale ou périnatale. Les cellules dérivées de ces animaux déficients en Cyt-c ont une activité caspase-3 réduite. Dans ce cas, la formation de l'apoptosome ne semble pas indispensable ni à la

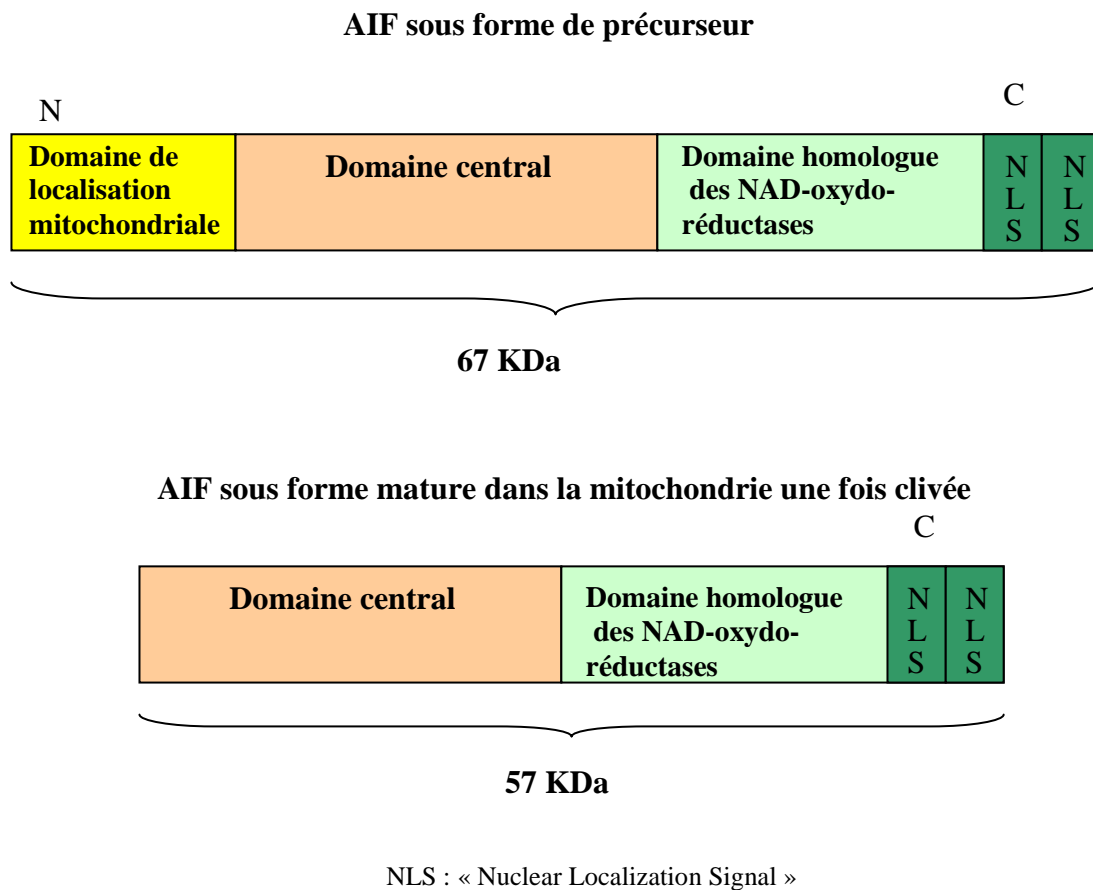


formation du système immunitaire ni à l'activation des caspases, mais il peut constituer une boucle d'amplification (c'est-à-dire un effet feed-back) de la cascade apoptotique (van Gurp *et al.*, 2003).



**Figure 16 :** Formation de l'apoptosome suite à la libération du cytochrome c

L'Apoptosis Inducing Factor (AIF) a été identifié en 1996 par 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, un domaine central et un domaine C-terminal homologue à celui des NAD-oxydo-réductases bactériennes, portant deux domaines de localisation nucléaire (Figure 17). 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 a une fonction duale de NAD(P)H oxydase et monodéhydroascorbate réductase mitochondriale, ce qui lui confère le rôle de facteur apoptogène. Son activité oxydo-réductase n'est pas essentielle à sa fonction apoptotique (Ye *et al.*, 2002).



**Figure 17 :** Structure schématique du précurseur de la protéine AIF et de sa forme mature dans la mitochondrie

Après un stimulus apoptotique, l'AIF est libéré par la mitochondrie (Figure 18), transloque dans le noyau des cellules en apoptose, induit une condensation de la chromatine et segmente l'ADN en fragments de hauts poids moléculaires (50 Kpb) (Ravagnan *et al.*, 2002). En 2002, Ye a déterminé par cristallographie, la structure de l'AIF et a mis en évidence une région fortement positive à sa surface, suggérant une interaction directe de l'AIF avec l'ADN. Le mécanisme d'action de l'AIF est encore mal connu mais sa liaison à l'ADN pourrait, d'une part entraîner un changement conformationnel de la chromatine, dont la désorganisation aboutirait à des cassures, et pourrait d'autre part augmenter sa sensibilité aux nucléases induisant ainsi, *via* un mécanisme indépendant des caspases, la dégradation partielle de la chromatine. L'interaction de l'AIF avec l'ADN est indispensable à sa fonction apoptotique. Au cours du processus apoptotique, la translocation de l'AIF, de la mitochondrie au noyau, est une action essentielle observée dans les cellules humaines ou de souris.

La surexpression de Bcl-2 empêche la redistribution de l'AIF dans des lignées cellulaires de mammifères (Susin *et al.*, 1997). Effectivement, la protéine Bcl-2 contrôle l'ouverture des pores mitochondriaux, qui se fait en présence de Bax (dimère Bax/Bcl-2).

Il a été démontré que lorsque AIF est micro-injecté dans le cytoplasme de cellules intactes, il induit la chute du potentiel mitochondrial membranaire, l'exposition des phosphatidylsérines à la surface de la membrane plasmique et des modifications nucléaires (Ferri *et al.*, 2000). Ces mêmes effets sont obtenus dans des cellules transfectées par un mutant AIF accumulé dans le noyau des cellules qui ne possède pas de signal de localisation mitochondriale. En revanche, dans ce cas, ces effets ne sont pas inhibés par une surexpression de Bcl-2 ou des inhibiteurs de caspases. Le fait, que AIF micro-injecté dans le cytoplasme de cellules intactes induise la chute du potentiel mitochondrial membranaire, exprime un effet amplificateur apoptotique de l'AIF sur la mitochondrie.

L'AIF provoque l'apoptose dans les cellules déficientes en APAF-1 ou en caspase-3 (Loeffler *et al.*, 2001).

La protéine Hsp 70 (Heat Shock Protein) a été décrite récemment comme un inhibiteur endogène de l'AIF, *in vitro* et *in vivo* (Ravagnan *et al.*, 2002).

**Smac/Diablo** : Smac (Du *et al.*, 2000) et Diablo (Verhagen *et al.*, 2000) sont une même protéine mitochondriale libérée lors de l'apoptose (Figures 15B et 18). La libération du Cyt-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, est transloquée du cytoplasme vers la mitochondrie grâce à son domaine N-terminal qui

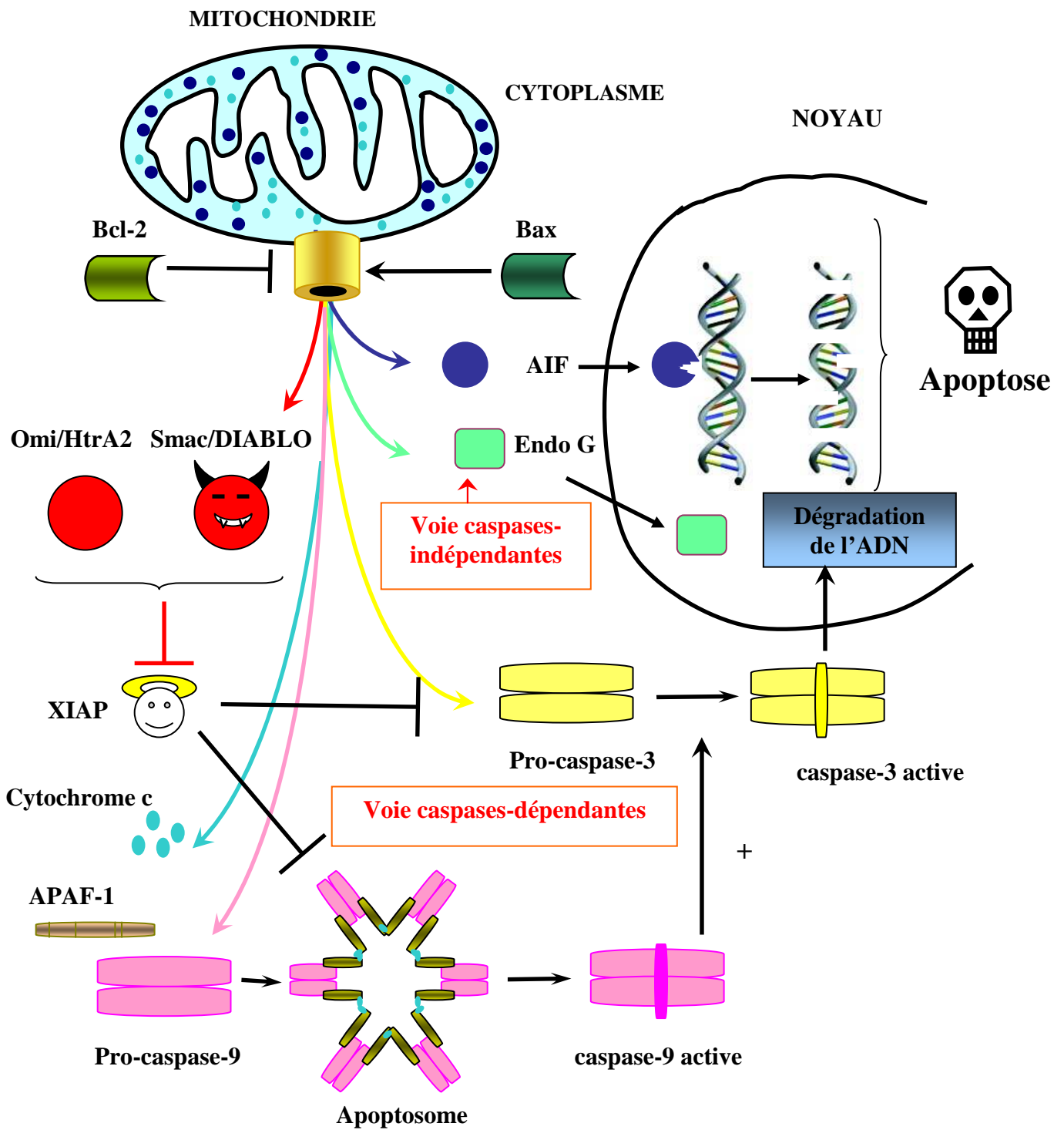


Figure 18 : La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

possède un signal de localisation mitochondriale. Ce précurseur 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 fonction de bloquer l'activation des pro-caspases et ainsi d'inhiber l'activité des caspases matures. En effet, Smac/Diablo forme un dimère en se liant à XIAP (membre de la famille des IAPs) ; ce dimère empêche la liaison de XIAP aux caspases et ainsi leur inactivation (Ravagnan *et al.*, 2002). La famille des IAPs est caractérisée par la présence d'un ou plusieurs domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat), motifs de 70 acides aminés très conservés que ce soit chez la levure ou chez l'homme. Ce domaine leur permet de se lier sur la séquence d'acides aminés spécifiques (Ala-Thr-Pro-Phe) des caspases-3 et -9 et sur celle (Ala-Val-Pro-Ile) de Smac/Diablo. Par exemple, la liaison de Smac/Diablo au domaine BIR2 de XIAP empêche la protéine XIAP d'inhiber l'activation des caspases-3 et -7 (Figure 18) (§ IV.4.4.2.). En revanche, la fonction physiologique mitochondriale de Smac/Diablo est inconnue (Van Gurp *et al.*, 2003).

La protéine **Omi/HtrA2** a été identifiée comme un nouvel inhibiteur des IAPs. Cette protéine est un précurseur de 49 KDa. Comme pour les autres facteurs apoptogènes, elle migre vers la mitochondrie où son signal de localisation mitochondriale est clivé pour donner naissance à une protéine mature de 37 KDa. Omi/HtrA2 fait partie de la famille des protéases à sérine et est confinée dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Sous l'action de facteurs comme la staurosporine, TRAIL ou les UV, Omi/HtrA2 est relarguée dans le cytoplasme, où elle se lie à la protéine IAP, comme Smac/Diablo, pour l'inhiber, facilitant ainsi l'activation des caspases (Ravagnan *et al.*, 2002) (Figure 18). Sa fonction n'est pas clairement connue mais elle pourrait être surexprimée dans des conditions de stress cellulaires, notamment au niveau du réticulum endoplasmique. La protéine Omi/HtrA2 pourrait être impliquée dans l'apoptose dépendante et indépendante des caspases (van Loo *et al.*, 2002). Cette protéine Omi/HtrA2 montre de grandes similitudes avec la protéine Smac/Diablo, mais toutes les deux seraient exprimées différemment en fonction des tissus.

**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 pour cliver l'ADN. C'est une molécule caspase-indépendante. En 2001, Widlak

a démontré que l'Endo G est responsable d'une part du clivage internucléosomal aboutissant à la formation des « ladders » (fragment de petit poids moléculaire) dans des noyaux isolés, et d'autre part de l'obtention de fragments nucléiques de hauts poids moléculaires (Figure 18). Dans le noyau, elle pourrait agir de concert avec la DNase I ou l'hexonucléase. Ainsi l'action combinée de l'Endo G et de l'AIF, toutes deux relarguées par la mitochondrie, est un mécanisme totalement indépendant des caspases (van Gurp *et al.*, 2003).

Les **caspases-2, -3, -8 et -9** (Susin *et al.*, 1999a) sont aussi reconnues comme étant des protéines apoptogènes relarguées par la mitochondrie durant le processus apoptotique (Figures 15B et 18).

Les molécules apoptogènes citées précédemment semblent les seules connues à l'heure actuelle ; cependant, il n'est pas exclu que d'autres protéines soient identifiées dans les années à venir.

La voie apoptotique mettant en jeu la mitochondrie ou voie apoptotique intrinsèque comprend (Figure 18) :

- ❖ une voie mitochondriale dépendante des caspases faisant intervenir les caspases-3, -9 et le Cyt-c,
- ❖ une voie mitochondriale indépendante des caspases faisant intervenir l'AIF et l'Endo G.

Ces deux voies aboutissent aux modifications morphologiques nucléaires terminales de l'apoptose.

En ce qui concerne la chronologie des événements moléculaires, les travaux publiés sont contradictoires. En effet le cytochrome c ou l'AIF, acteurs clé de chacune de ces deux voies mitochondriales, seraient relargués de la mitochondrie à la suite de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et de l'ouverture des pores. D'autres auteurs proposent que ces deux protéines, une fois libérées, seraient par rétro-contrôle les déclencheurs de la chute du  $\Delta\Psi_m$  (van Gurp *et al.*, 2003). Les avis des chercheurs divergent aussi sur l'ordre de relargage du Cyt-c et de l'AIF (Candé *et al.*, 2002a,b). En effet pour certains, le relargage du Cyt-c précède celui de l'AIF alors que pour d'autres, l'AIF serait libéré de la mitochondrie bien avant le relargage du Cyt-c. Par exemple, lors de l'apoptose induite par la staurosporine (Susin *et al.*, 1999b) ou lors de l'infection de cellules Hela par le HIV-1 (Ferri *et al.*, 2000), le relargage de l'AIF précède celui du Cyt-c.

## IV.2. Phase de régulation des voies intrinsèque et extrinsèque, par les protéines membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 ont une importance dans la phase de régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire : voie intrinsèque et voie extrinsèque. Le plus souvent, les signaux inducteurs d'apoptose semblent être modulés par les gènes de cette famille. Cette modulation se situe en amont de l'activation de la phase exécutive faisant intervenir les caspases. La famille de protéines Bcl-2 comprend aussi bien des protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bcl-X<sub>S</sub>, etc ...), qu'anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Bcl-B, etc ...) (Figure 19). Le proto-oncogène Bcl-2 a été le premier membre découvert dans les lymphomes folliculaires de type B (Tsujimoto & Croce, 1986). Il est capable de bloquer l'apoptose induite par un grand nombre de facteurs ; c'est un régulateur négatif de l'apoptose.

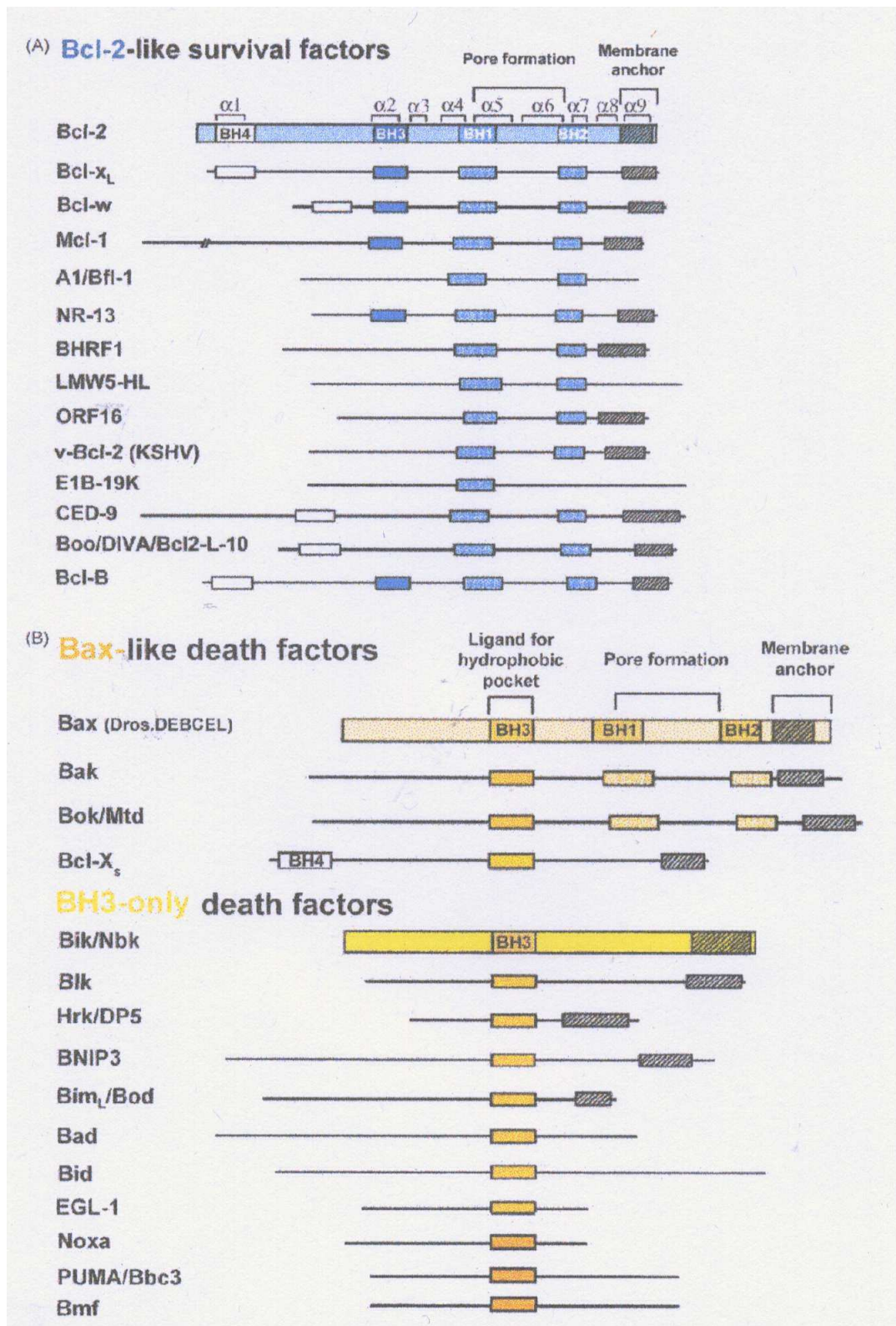
La fonction majeure des membres de la famille Bcl-2 est de moduler directement la perméabilité membranaire mitochondriale et de réguler la libération des molécules apoptogènes (ou Intermembrane Mitochondrial Protein = sIMPs). Les membres anti-apoptotiques contrôlent la fermeture des pores et séquestrent les sIMPs, alors que les membres pro-apoptotiques font l'inverse.

### IV.2.1. Structure des protéines membres de la famille Bcl-2

L'alignement des séquences protéiques des membres de la famille Bcl-2 a permis de définir quatre régions de "forte conservation" appelées domaines BH (Bcl-2 Homology) de 1 à 4. Ces membres sont classés en deux groupes, l'un anti-apoptotique et l'autre pro-apoptotique qui se scinde lui-même en deux sous-groupes (Tsujimoto, 2003 ; Borner, 2003) :

- ❖ Le groupe anti-apoptotique ou « **Bcl-2-like survival factors** », (Figure 19A) : les membres de ce premier groupe contiennent 4 domaines BH, dont le domaine BH4 spécifique à la survie, et absolument essentiel à cette fonction de survie. Ce groupe comprend les membres anti-apoptotiques A1, Bcl-2, Bcl-W, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1...
- ❖ Le groupe pro-apoptotique comporte deux sous-groupes (Figure 19B) :
  - Le 1<sup>er</sup> sous-groupe « **Bax-like death factors** » comporte un multidomaine BH. L'absence du domaine BH4 peut expliquer leur fonction pro-apoptotique, mais

ce n'est pas le seul critère. En effet, le domaine BH-3 est, en absence de BH4, spécifique de l'apoptose. Ce groupe comprend entre autre Bax, Bak, Bok...



**Figure 19 :** Classification des membres de la famille Bcl-2

D'après Borner *et al.*, 2003.



- Le 2<sup>ème</sup> sous-groupe « **BH3-only death factors** » comprend des membres possédant tous un domaine BH3 considéré comme un signal de mort. Nous pouvons citer comme exemple Bik, Bad, Bid et Bim.

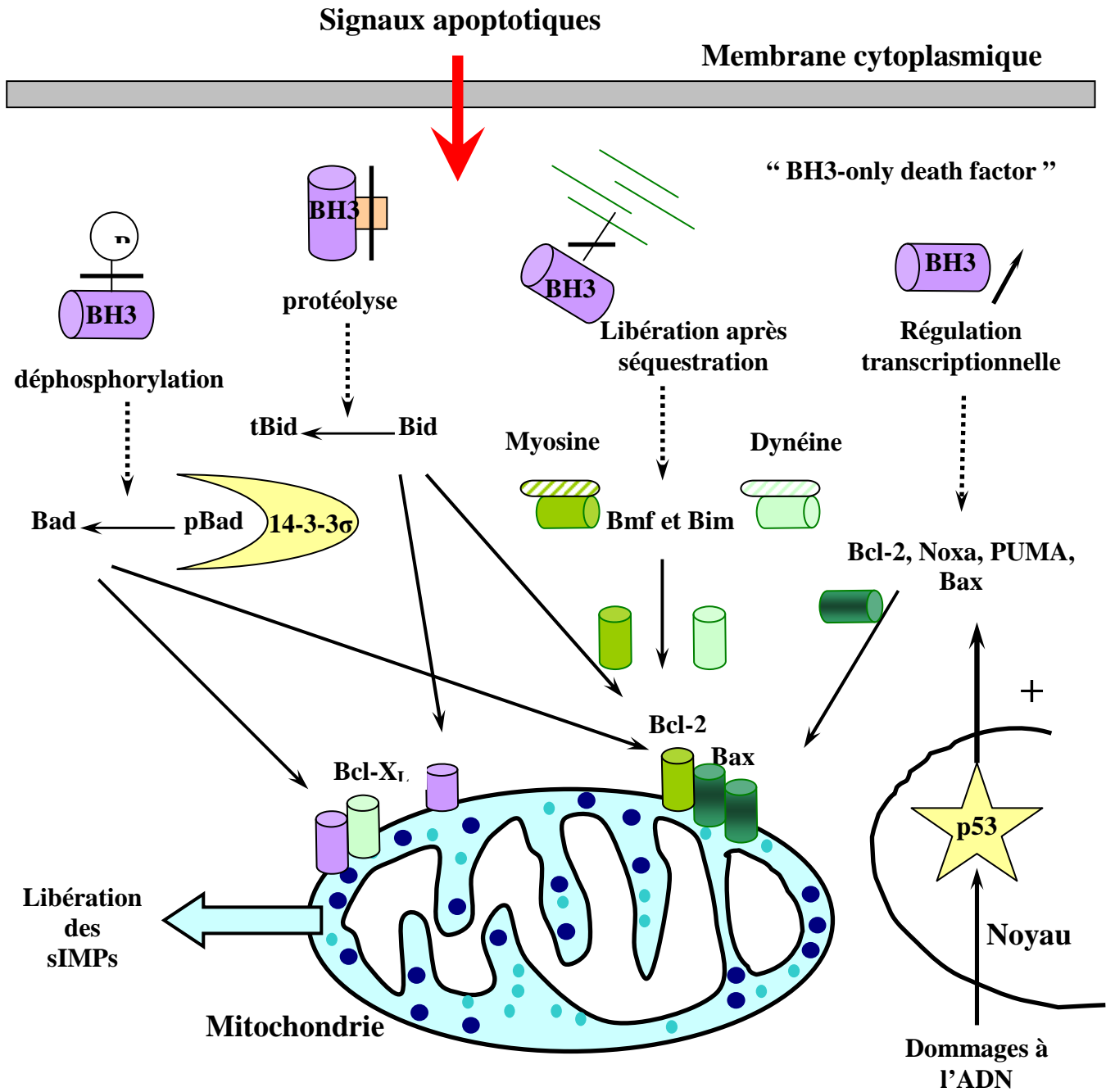
#### **IV.2.2. Mécanismes d'action des protéines membres de la famille Bcl-2**

Les protéines membres de la famille Bcl-2 interagissent entre elles, formant des homodimères ou des hétérodimères. La quantité relative de chaque protéine dans la cellule détermine la sensibilité à un signal de mort (Adams & Cory, 1998). Les membres anti- et pro-apoptotiques semblent avoir des localisations sub-cellulaires différentes. Les membres anti-apoptotiques siègent au niveau des membranes cellulaires des mitochondries, du noyau et du réticulum endoplasmique (RE), alors que les protéines pro-apoptotiques auraient une localisation cytosolique ou près des microtubules. Une grande majorité des protéines de cette famille contient une partie carboxy-terminale hydrophobe qui leur permet de s'ancrer au niveau de la membrane externe mitochondriale, mais également au niveau du RE et du noyau. Par exemple, Bax est soit cytosolique, soit ancré à la membrane externe (ME) mitochondriale ; à l'inverse, la protéine Bcl-2 est toujours localisée au niveau de la mitochondrie. A la suite d'un signal apoptotique, les membres pro-apoptotiques s'insèreraient dans la membrane mitochondriale pour induire la perméabilité membranaire mitochondriale (Crompton, 2000). Bax mais aussi Bak seraient responsables de l'ouverture des pores mitochondriaux entraînant la chute de  $\Delta\Psi_m$ . En revanche, Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> assureraient le fonctionnement des pores et empêcheraient le relargage du Cyt-c, favorisant ainsi la survie cellulaire. Les membres anti-apoptotiques pourraient contrôler l'ouverture du pore membranaire mitochondrial ou séquestrer la molécule APAF-1 et ainsi inhiber l'activation des caspases (Tsujimoto, 2003). La capacité d'insertion dans la membrane mitochondriale des protéines Bcl-2, Bax, Bid et Bcl-X<sub>L</sub>, serait due à leur analogie structurale avec les toxines bactériennes qui sont capables de former des pores ou des canaux transmembranaires (Gross *et al.*, 1999) modulant ainsi la libération des sIMPs (Mather & Rottenberg, 2001). D'autres auteurs suggèrent que ces protéines anti-apoptotiques pourraient aussi être liées à l'interaction avec VDAC (Vander Heiden *et al.*, 1999 ; Zamzami & Kroemer, 2001 ; Borner, 2003).

Les fonctions des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont régulées par des modifications post-traductionnelles comme les phosphorylations-déphosphorylations, le

clivage, la séquestration dans le cytoplasme, mais aussi la protéolyse (Gross *et al.*, 1999 ; Borner, 2003) (Figure 20).

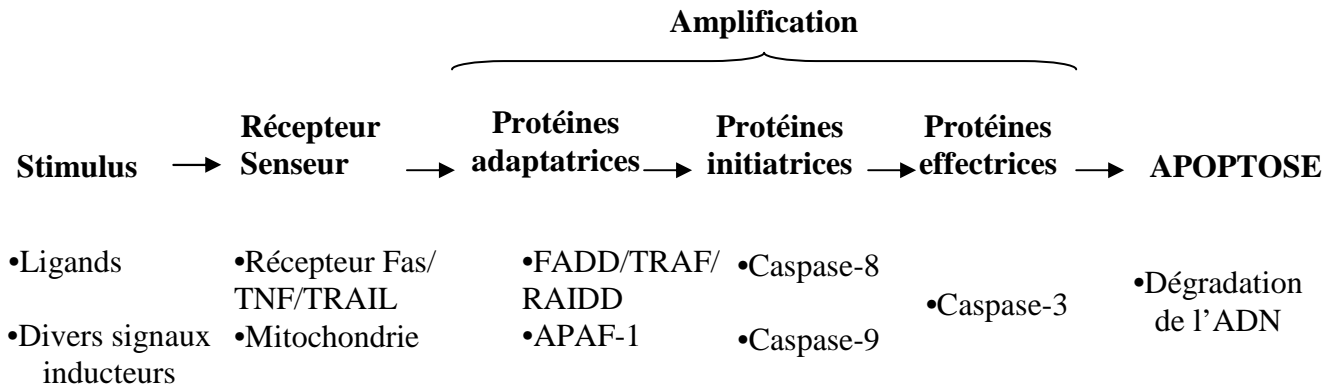
- ❖ **Bad** est une protéine phosphorylée en présence de facteurs de croissance, ce qui provoque sa séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 $\sigma$ . A la suite de signaux apoptotiques, comme la privation en cytokines ou en facteurs de croissance, ou comme la liaison d'un ligand à un récepteur de mort, Bad est déphosphorylée pour former des hétérodimères avec **Bcl-X<sub>L</sub>** ou **Bcl-2** par liaison avec son domaine BH3. Seule la forme non phosphorylée de Bad est capable de lier Bcl-X<sub>L</sub> (Fang *et al.*, 1999).
- ❖ A la suite de l'action du TNF- $\alpha$  ou du traitement par le ligand FasL/CD95L, à la surface de la cellule, le domaine N-terminal de la protéine pro-apoptotique **Bid** est clivé par la caspase-8, générant une protéine tronquée (tBid) de 15 KDa qui transloque et s'ancree dans la mitochondrie. Cette forme tronquée pourrait être indispensable au relargage du Cyt-c. On suppose que la forme tronquée de Bid s'associerait à Bax par son domaine BH3 pour entraîner un changement conformationnel (Desagher *et al.*, 1999 ; Wei *et al.*, 2001) et ainsi le dysfonctionnement de la mitochondrie. En effet, à la suite d'un signal apoptotique, les protéines pro-apoptotiques telles que Bax, changent de conformation pour s'ancrer sous forme d'homodimère au niveau de la ME mitochondriale, et induisent sa perméabilisation, modulant ainsi la libération des facteurs apoptogènes. Il est décrit que Bid pourrait servir de chaperon à **Bax** (Desagher *et al.*, 1999).
- ❖ D'autres membres pro-apoptotiques sont séquestrés dans le cytoplasme. La molécule pro-apoptotique **Bim** est essentielle à l'apoptose durant l'embryogénèse. Son inactivation est provoquée par sa séquestration par une protéine du cytosquelette, la dynéine. A la suite d'une privation en facteurs de croissance, ou de dommages causés par des irradiations UV, Bim, par exemple, est libéré de la dynéine et relargué dans le cytosol ; il se lie alors aux membres pro-apoptotiques. Récemment il a été démontré que **Bmf** est aussi séquestrée par une autre protéine du cytosquelette, la myosine (Borner, 2003).
- ❖ L'expression des gènes **Bax**, **Bcl-2**, **PUMA** (P53-Upregulated Modulator of Apoptosis) (Nakano *et al.*, 2001 ; Yu *et al.*, 2003) et **Noxa** (BH3-only member of the Bcl-2 family) (Oda *et al.*, 2000) est régulée au niveau transcriptionnel par la protéine suppresseur de tumeur p53. L'expression des protéines Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub> et A-1, seraient aussi régulées. Ainsi, certains membres de la famille Bcl-2 subiraient une régulation transcriptionnelle (Miyashita *et al.*, 1994 ; Schuler & Green, 2001).



**Figure 20 :** Les différentes régulations des membres de la famille Bcl-2 au cours du processus apoptotique.

### IV.3. Phase d'exécution par les caspases

La phase d'exécution se caractérise par un phénomène en cascade d'évènements enzymatiques qui va amplifier la réponse de la cellule par rapport au stimulus initial (Figure 21).



**Figure 21** : Représentation de la cascade apoptotique  
exemples la voie du récepteur de mort et la voie mitochondriale

La plupart des modifications morphologiques observées dans les cellules apoptotiques résulte de l'activation de la cascade des caspases. Ces dernières ont un rôle primordial dans l'étape d'exécution du processus apoptotique. Elles ont chacune une fonction déterminante lors du déroulement de la phase d'exécution qui précède la dégradation et la fragmentation de l'ADN, stade ultime de l'apoptose. Les caspases sont hautement conservées au cours de l'évolution ; elles sont retrouvées chez les hommes, les mammifères, ainsi que les insectes et chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Budihardjo *et al.*, 1999 ; Earnshaw *et al.*, 1999).

#### IV.3.1. Classification et structure des caspases

Les caspases sont des protéases à cystéine et ont deux caractéristiques communes quelles que soient la caspase : leur site catalytique contient un résidu cystéine, et elles possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu aspartate (Margolin *et al.*, 1997). Les seules protéases eucaryotes connues avec cette spécificité de clivage sont les caspases et le granzyme B (Thornberry *et al.*, 1997a).

#### IV.3.1.1. Classification

Les caspases ont été impliquées dans l'apoptose avec la découverte du gène *ced-3* à partir du nématode *Caenorhabditis elegans* et l'identification d'un analogue, puis de son produit (CED-3) chez les mammifères : la protéase à cystéine ICE (Interleukin1 $\beta$ -Converting Enzyme) (Miura *et al.*, 1993). Ces travaux précurseurs ont conduit à l'identification d'un nombre croissant de protéases à cystéine, présentant des homologies de séquences avec la protéine CED-3. Ces protéases présentent une spécificité stricte de clivage de leur substrat après un résidu acide aspartique. En 1996, Alnemri et coll. propose une nomenclature qui regroupe les protéases à cystéine sous le nom de **caspase** pour "cysteine **asp**artate-specific protease", où « **c** » désigne le résidu cystéine du centre catalytique (QACXG où X = un acide aminé quelconque) (Figure 23), « **asp** » définit la spécificité stricte de clivage des substrats après un résidu acide aspartique et « **ase** » désigne une enzyme. L'ICE, qui fut la première caspase identifiée, a été rebaptisée caspase-1.

Il existe aujourd'hui plusieurs classifications de ces protéases (Figure 22) :

- (1) La 1<sup>ère</sup> classification se base sur l'analyse phylogénétique des caspases et a permis de définir trois sous familles : la famille de la caspase-1 (les caspases-1, -4, -5, -11), la famille de la caspase-2 (les caspases-2, -9) et la famille de la caspase-3 (les caspases-3, -6, -7, -8, -10) (Alnemri *et al.*, 1996).
- (2) La 2<sup>ème</sup> classification est basée sur la spécificité de substrat des caspases ; ces dernières sont classées en trois sous groupes : les caspases du groupe I dont le substrat préférentiel est [W/L]EHD, les caspases du groupe II qui exigent un résidu aspartate à la fois en position -1 et en -4 du site de clivage protéolytique (DXXD), et les caspases du groupe III qui sont moins restrictives vis-à-vis du résidu amino-acide en position -4 (XE[I/T/H/V]D) (Thornberry *et al.*, 1997b).
- (3) La 3<sup>ème</sup> classification s'appuie sur les fonctions des différentes caspases. Deux grands groupes ont été ainsi définis : les caspases impliquées dans l'inflammation, responsables de l'activation des cytokines, et les caspases apoptogènes activées au cours de la transduction d'un signal de mort.

Les caspases apoptogènes se répartissent en deux groupes en fonction de leur rôle dans la voie de signalisation de l'apoptose :

- Les **caspases initiatrices (ou régulatrices)** sont des caspases possédant des pro-domaines longs, activées au cours de la phase d'initiation de l'apoptose ; ces caspases comprennent les caspases-2, -8, -10 pour la voie des récepteurs de mort, et la caspase-9 pour la voie des mitochondries ;

- Les **caspases effectrices (ou exécutrices)** sont des caspases à pro-domaines courts, activées en cascade par des caspases initiatrices et impliquées dans la phase d'exécution de l'apoptose. Ce sont les caspases-3, -6, -7 (Alnemri, 1999).

	Caspase	Groupe	Substrat préférentiel		
Famille de la caspase-1	<b>caspase-1</b>	I	(W/L)EHD-X / YVAD-X	Activation de cytokines	Inflammation
	<b>caspase-4</b>	I	(W/L)EHD-X		
	<b>caspase-5</b>	I	WEHD-X		
	<b>caspase-11</b>	I	?		
Famille de la caspase-3	<b>caspase-3</b>	II	DEVD-X	Caspases effectrices	Apoptose
	<b>caspase-7</b>	II	DEVD-X		
	<b>caspase-6</b>	III	VEHD-X / VEID-X	Caspases initiatrices	
	<b>caspase-8</b>	III	LETD-X		
	<b>caspase-10</b>	III	IEXD-X / LEXD-X		
Famille de la caspase-2	<b>caspase-9</b>	III	LEHD-X	Caspases initiatrices	
	<b>caspase-2</b>	II	VDVAD-X / DEHD-X		

**Figure 22 :** Classification des caspases

(D'après Alnemri *et al.*, 1996 ; Thornberry *et al.*, 1997b ; Alnemri, 1999 ; Zimmermann *et al.*, 2001)

D=aspartate, E=glutamate, H=histidine, I=isoleucine, L=leucine, T=thréonine, V=valine, W=tryptophane, Y=Lysine

A ce jour 14 caspases différentes, dont le poids moléculaire varie de 32 à 55 KDa, ont été identifiées chez l'Homme, à l'exception des caspases-11 et -13 (Leblanc, 2003) (Tableau 4).

Nom	Espèce	Site de clivage dans le zymogène	Séquence cible	Pro-domaine	Fonction (voie)	Protéine adaptatrice	Chromosome
<b>Caspase -1</b>	Humain Souris	TTPLD/S FEDD/A AVQD/N	YVAD↓X YEVD↓X WEHD↓X	Long	Inflammation	(CARD)	11q22
<b>Caspase -2</b>	Humain Souris	DQQD/G EESD/A DNKD/G	VDVAD↓X DEHD↓X	Long	Initiatrice (Apoptose) Extrinsèque	RAIDD (CARD)	7q35
<b>Caspase -3</b>	Humain Souris	IETD/S	DEVD↓X DMQD↓X	Court	Effectrice (Apoptose)		4q34
<b>Caspase -4</b>	Humain	WVRD/S LEED/A	LEVD↓X (W/L)EHD↓ X	Long	Inflammation Apoptose	(CARD)	11q22
<b>Caspase -5</b>	Humain	WVRDS/S LEAD/S	(W/L)EHD↓ X	Long	Inflammation Apoptose		11q22
<b>Caspase -6</b>	Humain Souris	DVVD/N TEVD/A TETD/A	VEHD↓X VEID↓X	Court	Effectrice (Apoptose)		4q25
<b>Caspase -7</b>	Humain Souris	IQAD/S	DEVD↓X	Court	Effectrice (Apoptose)		10q25
<b>Caspase -8</b>	Humain Souris	VETD/S LEMD/L REQD/S	IETD↓X LETD↓X	Long	Initiatrice (Apoptose) Extrinsèque	FADD (DED)	2q33
<b>Caspase -9</b>	Humain	PEPD/A DQLD/A	LEHD↓X	Long	Initiatrice (Apoptose) Intrinsèque	APAF-1 (CARD)	1q34
<b>Caspase -10</b>	Humain	IEAD/A	IEAD↓X	Long	Initiatrice (Apoptose) Extrinsèque	FADD (DED)	2q33
<b>Caspase -11</b>	Souris (-4 et -5 ? Humain)	?		Long	Inflammation (?-) Apoptose ?		?
<b>Caspase -12</b>	Humain Souris	?		Long	Inflammation ? Apoptose (?+)		11q22
<b>Caspase -13</b>	Humain ? Bovin	?		Long			?
<b>Caspase -14</b>	Humain Souris	?		Court	Effectrice ?		19p13

**Tableau 4 :** La famille des caspases

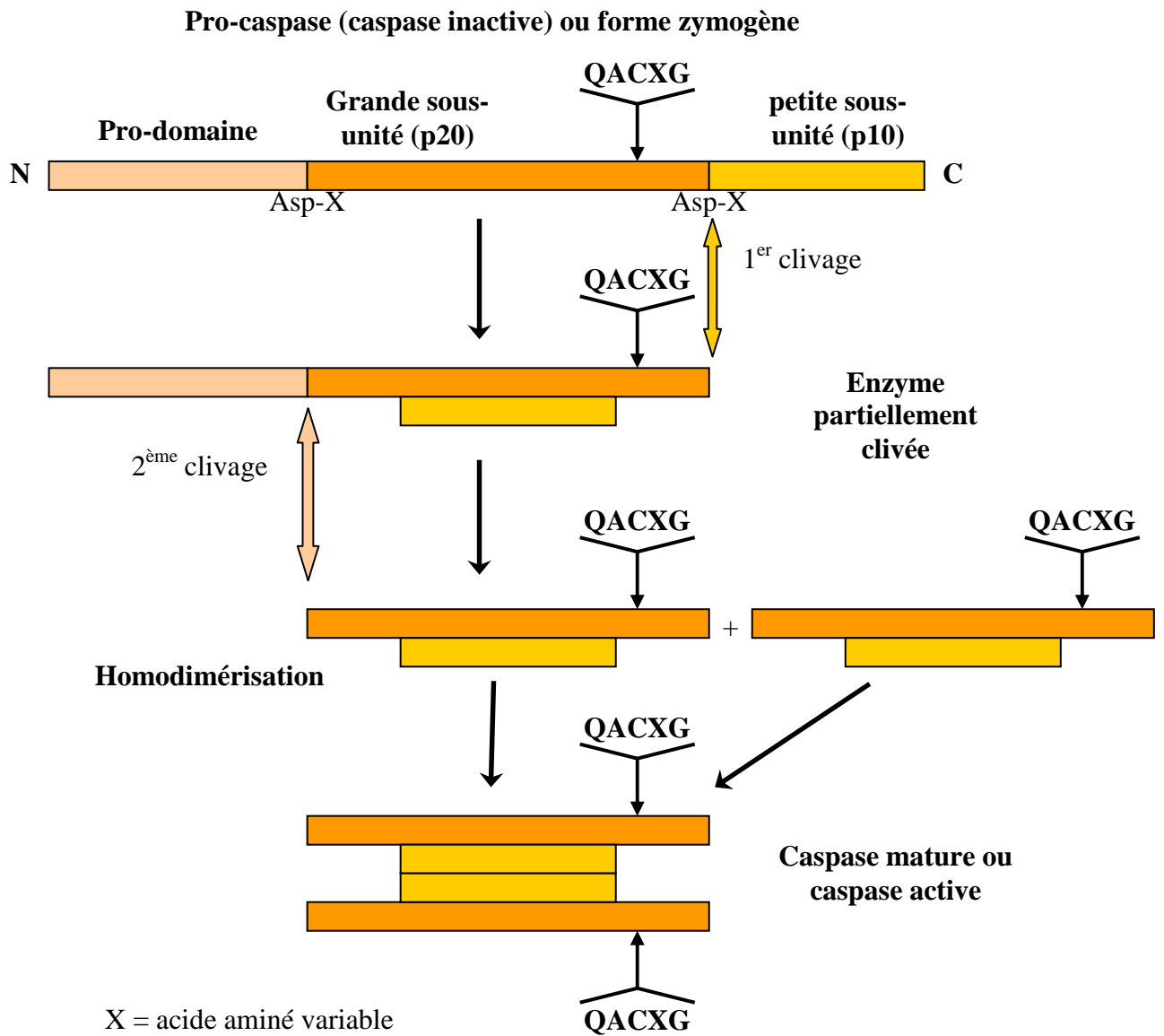
### IV.3.1.2. Structure

Les caspases sont synthétisées sous une forme inactive appelée zymogène (pro-enzyme de 30 à 50 KDa). Elles ont une structure très conservée, constituée de trois parties (Figure 23) :

- 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 (Thornberry *et al.*, 1997b) ;
- 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.

La maturation de chaque précurseur de caspase en enzyme fonctionnelle, nécessite au moins deux clivages : le premier entre la grande sous-unité (p20) et la petite sous-unité (p10), le deuxième entre le pro-domaine et la grande sous-unité. Ces clivages se font toujours au niveau d'une liaison Asp-X (où X est un amino-acide variable), par l'intermédiaire d'autres caspases ou par la caspase elle-même (voir § IV.4.2.1.). Ce clivage génère deux fragments (Nicholson & Thornberry, 1997), c'est à dire deux hétérodimères composés chacun de l'association des deux sous-unités, et comprenant donc deux sites catalytiques QACXG (Budihardjo *et al.*, 1999). La caspase active possède donc une structure tétramérique composée de deux grandes sous-unités (p20)<sub>x2</sub> et de deux petites sous-unités (p10)<sub>x2</sub>.





**Figure 23 :** Structure et mécanisme d'activation des caspases

### IV.3.1.3. Caspases initiatrices / caspases effectrices

Les caspases ont été classées d'après la spécificité de leur substrat ou la taille de leur pro-domaine (Zimmermann *et al.*, 2001 ; Leblanc, 2003) (Tableau 4).

Selon la taille de leur pro-domaine, deux classes de caspases se distinguent (Figure 24) :

- les caspases à pro-domaine long : les caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12 et -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 pro-domaine, 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 et les domaines CARD/CARD :

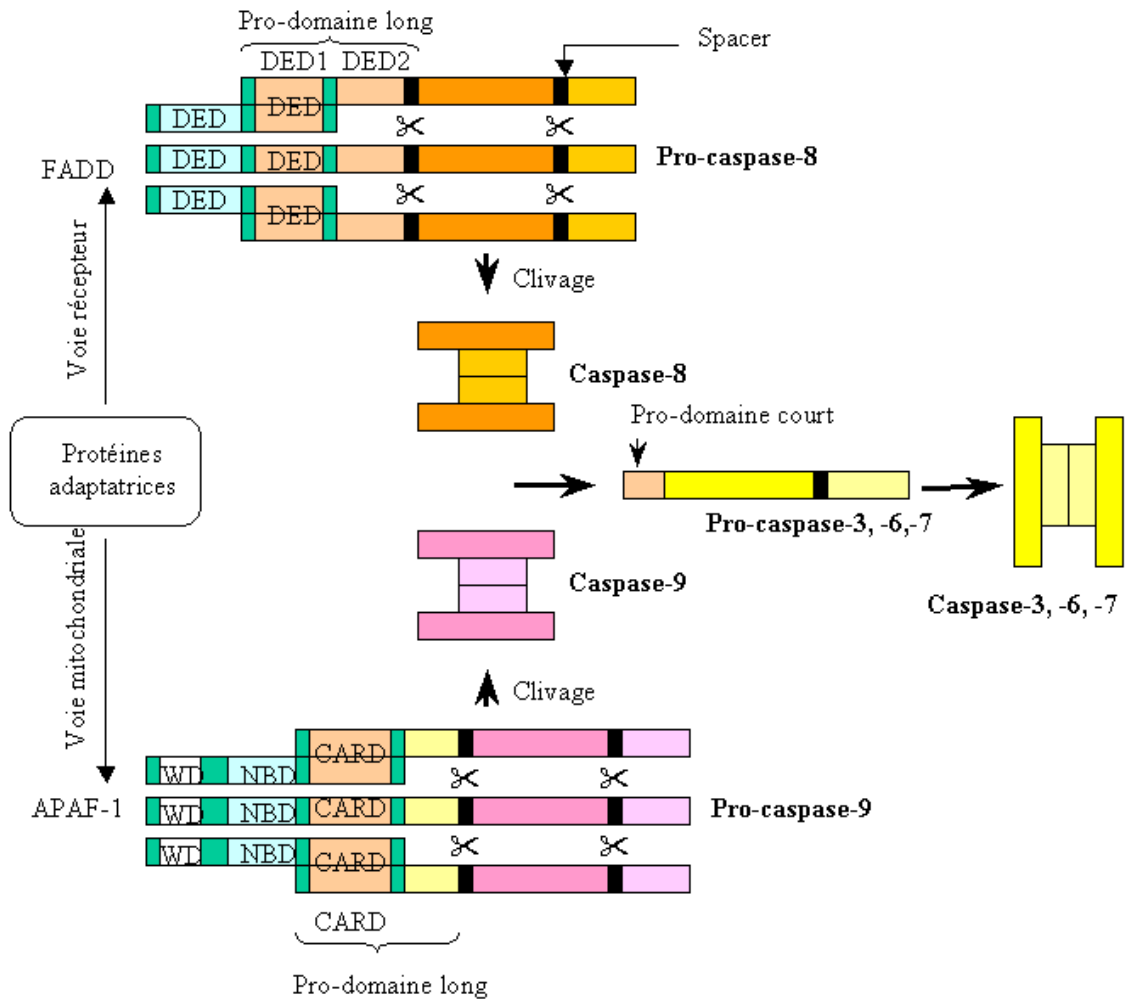
- Les caspases-8 et -10 intervenant au cours de la voie extrinsèque possèdent des domaines DED et se fixent à la protéine adaptatrice FADD par son DED, avant activation.

- 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 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 pro-inflammatoires comme l'IL1 et l'IL8 (Amarande-Mendes & Green, 1999).



DED : Death Effector Domain ; CARD : Caspase Recruitment Domain  
 WD : 40 répétitions tryptophane / acide aspartique ; NBD : Nucleotide Binding Domain

**Figure 24 :** Activation séquentielle des caspases

### IV.3.2. Activation et régulation des caspases

Etant donné l'importance des caspases dans le processus apoptotique, leur activation est bien entendu extrêmement régulée.

#### IV.3.2.1. Mécanismes d'activation

Trois mécanismes d'activation ont été identifiés (Hengartner, 2000) (Figure 25) :

❖ Le 1<sup>er</sup> mécanisme est l'activation par une caspase ou activation en cascade (Figure 25A).

Cette stratégie d'activation en cascade est utilisée pour l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7. Elle est très efficace pour amplifier les signaux pro-apoptotiques mais elle ne permet pas d'expliquer l'initiation du mécanisme en amont de la cascade.

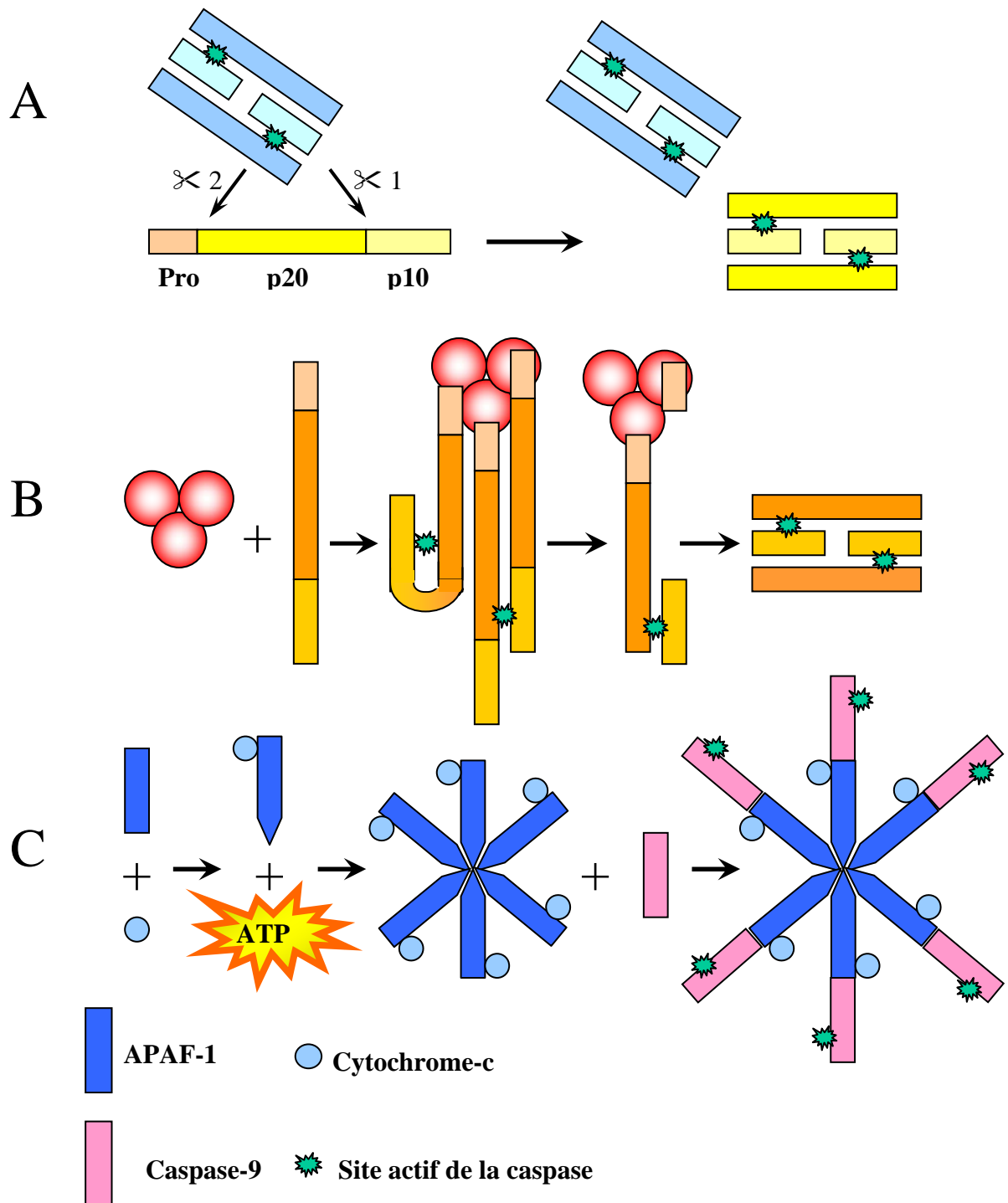
❖ Le 2<sup>ème</sup> mécanisme est l'activation par proximité induite ou auto-activation (Figure 25B).

La caspase-8 est la caspase la plus en amont dans la cascade apoptotique induite par les récepteurs de mort cellulaire. Lorsque ces récepteurs fixent leur ligand, ils se regroupent pour former des complexes membranaires. Leurs domaines intracellulaires recrutent, grâce à des protéines adaptatrices telles que FADD, plusieurs pro-caspase-8. Ceci se traduit par une grande concentration locale en zymogène. Dans ces conditions, l'activité intrinsèque de la pro-caspase-8 est suffisante pour que les pro-enzymes se clivent mutuellement et ainsi s'auto-activent les unes les autres (Figures 24 et 25B).

❖ Le 3<sup>ème</sup> mécanisme est l'association avec une sous-unité activatrice (Figure 25C).

Le mécanisme d'activation de la caspase-9 est très différent de ceux décrits précédemment. Le clivage protéolytique de cette caspase n'a que peu d'effet sur son activité enzymatique. L'activation de la caspase-9 passe par son association avec deux co-facteurs protéiques l'APAF-1 et le cytochrome c (Figure 16). Cette association stable représente l'enzyme active. L'APAF-1 et le cytochrome c constituent donc des sous-unités régulatrices de l'holoenzyme et cet ensemble s'appelle apoptosome (Figure 25C). Ce dernier est un très gros complexe protéique dont la structure a été déterminée par cryomicroscopie électronique (Shi, 2002).

Les caspases effectrices sont généralement activées par clivage par une autre caspase située en amont de la cascade alors que les caspases initiatrices sont plutôt activées par des interactions protéine-protéine.



**Figure 25** : Les différents mécanismes d'activation des caspases.

#### IV.3.2.2. Mécanismes de régulation

La cascade des caspases (ou l'intervention des caspases) au cours du processus apoptotique est une étape hautement régulée notamment au niveau de l'activation, de l'activité et de la production de ces protéases.

##### ❖ Régulation transcriptionnelle des caspases :

Bien que l'apoptose puisse être déclenchée dans un grand nombre de cellules, même en absence de transcription ou de synthèse protéique (Kaufmann *et al.*, 1993; Weil *et al.*, 1996), la régulation de l'expression des gènes de pro-caspases reste cruciale sous certaines conditions. Les ARNm des pro-caspases sont facilement détectables dans un grand nombre de types cellulaires, mais en quantité variable (Earnshaw, 1999; Thornberry *et al.*, 1997a). Les niveaux de zymogènes sont très différents d'un type cellulaire à l'autre. L'ARNm de la pro-caspase-3, par exemple, est fortement exprimé dans de nombreuses cellules lymphoïdes et myéloïdes matures alors qu'il n'est que faiblement présent dans l'épithélium mammaire et dans les neurones normaux (Krajewska *et al.*, 1997). Ainsi, le niveau d'expression de ces enzymes varie. Des études ont décrit qu'au cours de l'apoptose, des neurones en culture *in vitro*, ainsi que des cerveaux de souris *in vivo*, expriment des niveaux plus élevés d'ARNm de la caspase 3. Lorsque des cellules leucémiques humaines sont incubées en présence d'étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II), le niveau d'expression de plusieurs messagers de pro-caspases (-3, -4 et -6) croît significativement (Droin *et al.*, 1998).

##### ❖ Régulation par phosphorylation :

De nombreuses études ont rapporté que les protéines intervenant dans l'apoptose pouvaient être régulées par des protéines kinases (phosphorylation) et des protéines phosphatases (déphosphorylation) (Anderson, 1997 ; Martins *et al.*, 1998). En 1998, Martins et coll. a montré que sur des cellules leucémiques, les caspases peuvent être phosphorylées *in vivo*. Ils ont démontré que la déphosphorylation des caspases était corrélée à une augmentation de leur capacité à cliver PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase), dont le rôle se limite à la détection des cassures simple brin de l'ADN et au recrutement des protéines nécessaires à leur réparation (Fernet *et al.*, 2000). Il semble que, *in vitro*, cette phosphorylation diminue leur activité enzymatique.

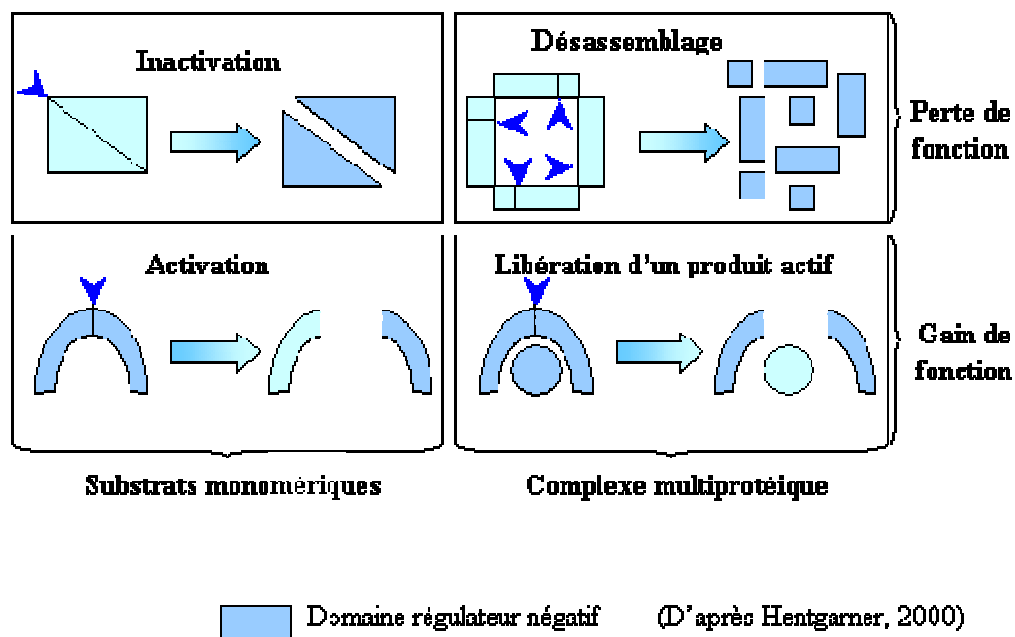
Une autre étude démontre que la kinase Akt phosphoryle la pro-caspase 9 humaine, ce qui inhibe son activation (Cardone *et al.*, 1998), mais elle est incapable de phosphoryler les caspases -3, -6 ou -7. A ce jour, la nature de la (ou des) kinase(s) responsable(s) de la phosphorylation des caspases effectrices, ainsi que le rôle physiologique de cette modification post-traductionnelle, ne sont pas encore démontrés.

La grande famille des protéines homologues à Bcl-2 joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose. Cette régulation passe par la modulation de l'activité de certaines caspases, principalement la caspase 9. Ainsi, en empêchant la libération du cytochrome c par la mitochondrie, Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> par exemple, inhibent la formation du complexe APAF-1/cytochrome c/pro-caspase-9 qui est nécessaire à l'apoptose.

### IV.3.3. Substrats des caspases

#### IV.3.3.1. Substrats cellulaires naturels

Toutes les caspases possèdent un site actif à cystéine, qui reconnaît un motif de 4 acides aminés dans le substrat, et le clivent toujours après un résidu aspartate. La spécificité de reconnaissance et de clivage du substrat est déterminée par la nature des 4 acides aminés du site de clivage (Thornberry *et al.*, 1997b). Ce clivage induit soit l'inactivation du substrat cible, soit son activation directement par élimination du domaine régulateur négatif ou indirectement en inactivant une sous unité régulatrice (Figure 26).



**Figure 26 :** Les diverses formes de clivage sur les substrats, par les caspases effectrices.

Un grand nombre de substrats des caspases a été rapporté ces dernières années (Tableau 5). Il s'agit de protéines cytoplasmiques ou nucléaires, de protéines impliquées dans le métabolisme, mais aussi dans la réparation de l'ADN. Les protéines kinases, les protéines de régulation de l'apoptose et les protéines impliquées dans la transduction du signal, dans l'expression de gènes, dans la régulation du cycle cellulaire ou dans la prolifération sont également des substrats des caspases, mais cette liste n'est pas exhaustive (Earnshaw *et al.*, 1999 ; Nicholson, 1998).

A ce jour, il n'y a pas de substrats naturels décrits pour la caspase-13.

<b><u>Caspases</u></b>	<b><u>Substrats</u></b>
<b>Caspase-1</b>	Pré-Interleukine-1b ; Interleukine-18 ; Lamines
<b>Caspase-2</b>	Golgin-160; Lamines (?)
<b>Caspase-3</b>	Caspase-6 ; Caspase-7 ; Caspase-9 ; ADN-pk ; MDM2 ; Gas2 ; Gelsoline ; Fodrine ; b-Caténine ; Lamines ; NuMA ; Protéines de HnRNP ; topoisomerase I ; FAK ; Calpastatin ; p21 <sup>Waf1</sup> ; PAK-2 ; Présénéline ; PARP ; SREBs ; CACI
<b>Caspase-4</b>	Caspase-1
<b>Caspase-5</b>	Max ; Périphiline
<b>Caspase-6</b>	PAK-2 ; PARP ; Lamines ; NuMA ; FAK ; Caspase-3 ; Kératine-18
<b>Caspase-7</b>	PARP ; Gas2 ; SREBI ; EMAPII ; FAK ; Calpastatine ; p21 <sup>Waf1</sup>
<b>Caspase-8</b>	Caspase-3 ; Caspase-4 ; Caspase-6 ; Caspase-7 ; Caspase-10 ; Caspase-13 ; PARP ; Offre
<b>Caspase-9</b>	Caspase-3 ; Pro-caspase-9 ; Caspase-7 ; PARP
<b>Caspase-10</b>	Caspase-3 ; Caspase-4 ; Caspase-6 ; Caspase-8 ; Caspase-9
<b>Caspase-11</b>	Caspase-1 ; Caspase-3
<b>Caspase-12</b>	Caspase-9 ;
<b>Caspase-14</b>	Caspase-8 ; Caspase-9

**Tableau 5** : Substrats des caspases.



Nous pouvons citer quelques exemples de substrats des caspases dont le rôle est bien décrit lors du processus apoptotique :

- La nucléase DFF (DNA Fragmentation Factor) (Liu X *et al.*, 1998) ou CAD (Enari *et al.*, 1998 ; Sakahira *et al.*, 1998 ; Sakahira *et al.*, 1999 ; Wyllie A, 1998) est présente au niveau des cellules sous la forme d'un complexe inactif ; elle est associée à sa sous unité inhibitrice nommée ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase) (Enari *et al.*, 1998 ; Sakahira *et al.*, 1998 ; Sakahira *et al.*, 1999 ; Wyllie A, 1998). Le clivage de la sous unité inhibitrice ICAD par la caspase-3 aboutit à la libération et à l'activation de la sous unité catalytique CAD. Cette activation est responsable des « ladder d'ADN », décrits pour la première fois par Wyllie H en 1980. En effet, cette nucléase découpe l'ADN génomique entre les nucléosomes, générant ainsi des fragments d'ADN de 180-200 pb mais aussi des oligonucléosomes donnant après migration sur gel d'agarose un profil en échelle appelé «ladder».

- Le clivage des lamines nucléaires par la caspase-3 est responsable du rétrécissement et du bourgeonnement cellulaire (Rao *et al.*, 1996 ; Buendia *et al.*, 1999) (Tableau 5).

- De même, le clivage de la PAK-2 (P21 Activated Kinase-2, membre de la famille des kinases activées par la protéine p21 ras (Tableau 5)) par la caspase-3 serait aussi responsable du bourgeonnement observé dans les cellules apoptotiques (Rudel & Bokoch, 1997 ; Zimmermann *et al.*, 2001). L'activation de la protéine PAK-2 a lieu après le clivage entre la sous-unité inhibitrice et la sous-unité catalytique.

- La perte de la forme générale de la cellule est due au clivage des protéines du cytosquelette par la caspase-3. Les protéines du cytosquelette sont la fodrine (dissociation de la membrane plasmique et du cytosquelette) et la gelsoline (formation des corps apoptotiques) (Kothakota *et al.*, 1997 ; Zimmermann *et al.*, 2001) (Tableau 5).

- La PARP est constitutive du réseau de surveillance du génome développé par les cellules eucaryotes. Son activation est produite par la reconnaissance des cassures simple-brin de l'ADN, aboutissant à la poly (ADP-ribo)sylation d'un certain nombre de protéines chromatiniennes, dont les histones et la PARP elle-même. Cette propriété joue un rôle essentiel dans la réparation par excision des bases (Fernet *et al.*, 2000). La PARP est clivée par les caspases -3, -6 et -7, lors de l'apoptose ; ce clivage la rend ainsi inactive et elle ne peut donc pas remplir ses fonctions de réparation de l'ADN (Kaufmann, 1989 ; Lazebnik *et al.*, 1994 ; Tewari *et al.*, 1995) (Tableau 5).

### IV.3.3.2. Substrats de synthèse

Les études portant sur la spécificité des caspases indiquent qu'il existe deux particularités très conservées pour ces enzymes : un acide aspartique (D) en position -1, et la présence de 4 résidus d'acides aminés en amont du site de clivage. En déterminant les séquences térapeptidiques reconnues pour une caspase considérée, il a été alors possible de déterminer des séquences consensus et de construire des substrats de synthèse pour étudier l'activation d'une caspase donnée. De petite taille, les peptides synthétiques miment les sites de clivage des caspases. Pour identifier ou découvrir de nouvelles protéases, divers essais ont utilisé de nouveaux substrats peptidiques de synthèse qui ont été construits pour s'adapter spécifiquement aux sites actifs de l'enzyme. Ces substrats ont généralement une structure de type Ac-XXXD-AMC, et en fonction de leur séquence ils sont efficacement reconnus et clivés par une caspase déterminée. Par exemple, la séquence -LEHD- est reconnue par la caspase-9, tandis que la séquence -IETD- est reconnue par la caspase-8. Mais certaines séquences ont des spécificités plus ou moins grandes en fonction des activités caspases considérées. Le substrat le plus utilisé est Ac-DEVD-AMC, actuellement décrit comme spécifique de la caspase-3. La séquence -DEVD- est issue des recherches faites sur la PARP (Poly-ADP-Ribose Polymerase) et sur la DNA-PK (DNA-Protein Kinase) qui sont toutes deux des substrats de la caspase-3 (Thornberry *et al.*, 2000). Cependant, il semblerait que la séquence DEVD ne soit pas uniquement reconnue par la caspase-3. C'est pourquoi cette séquence est parfois décrite comme spécifique des caspases « caspase-3 like », la caspase-3 étant la plus affine (Stennicke & Salvesen, 2000).

Les substrats contiennent aussi :

- en N-terminal un groupement « bloquant » qui empêche la digestion des caspases par les aminopeptidases. Les groupements « bloquant » sont z (benzoxycarbonyl-) ou Ac (acétyl-).

- en C-terminal un groupement « rapporteur », adjacent au peptide en position 1 (P1) qui est libéré après clivage par la protéase active. Ce groupement est un fluorochrome qui permet de doser par fluorimétrie l'activité enzymatique des caspases. Les groupements rapporteurs les plus fréquemment utilisés sont le 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC,  $\lambda_{ex}$  380 nm  $\lambda_{ém}$  460 nm) ou le 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine (AFC,  $\lambda_{ex}$  405 nm  $\lambda_{ém}$  500 nm) en fluorimétrie et le *p*-nitroanilide (pNa, Abs : 405-410) en colorimétrie.

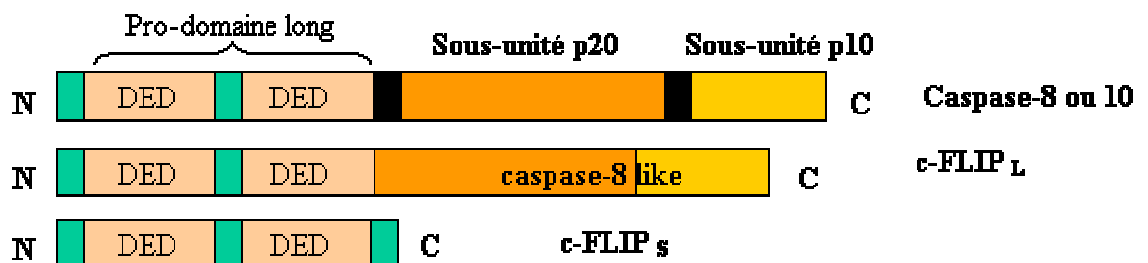
## IV.3.4. Inhibiteurs des caspases

### IV.3.4.1. Inhibiteurs cellulaires naturels

Les inhibiteurs naturels de caspase dans les cellules de mammifères se regroupent en trois famille : les protéines anti-apoptotiques membres de la famille Bcl-2, FLIP et IAP.

- La protéine **FLIP** (FLICE Inhibitory Protein) régule le recrutement de la caspase-8 par les récepteurs de mort (Irmeler *et al.*, 1997). Cette protéine contient deux domaines effecteurs de mort cellulaire (DEDs) qui vont lui permettre de se lier aux pro-domaines des caspases - 8 ou -10 et ainsi empêcher leur recrutement aux récepteurs de mort, notamment les récepteurs TNF-R1 et Fas/CD95 (Okano *et al.*, 2003) (Figure 27). FLIP a été décrit comme pouvant protéger de l'apoptose (Hu *et al.*, 1997; Irmeler *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1997; Rasper *et al.*, 1998) ou induire l'apoptose (Han *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997; Shu *et al.*, 1997) selon le type cellulaire considéré. Cependant, dans des conditions physiologiques, FLIP semble fonctionner comme un inhibiteur de la pro-caspase-8 (Figure 10) et serait un important médiateur de NF- $\kappa$ B, protéine contrôlée par des signaux anti-apoptotiques (Micheau *et al.*, 2001).

La protéine p53 dégrade FLIP *via* la voie ubiquitine-protéasome (Fukazawa *et al.*, 2001).



**Figure 27** : Structure schématique de la protéine FLIP.

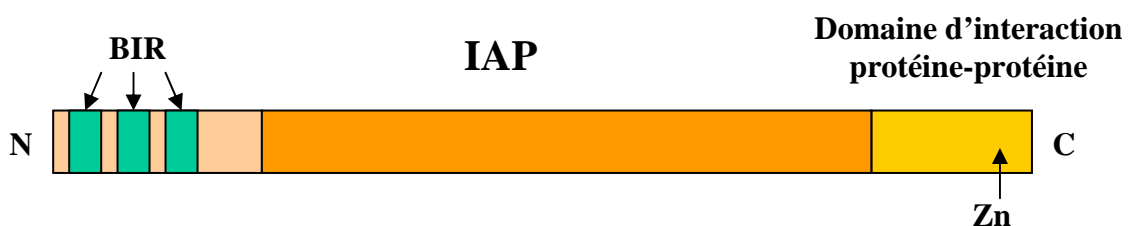
c-FLIP long a un domaine, homologue à celui des caspases-8 ou -10, nommé "caspase-like domain" et deux domaines DED.

c-FLIP short a une homologie proche du virus FLIP, c'est-à-dire deux domaines DED uniquement.

- La protéine **IAP** (Inhibitor of Apoptosis Proteins) représentent la seule famille d'inhibiteurs de caspases endogènes connus chez les mammifères (Figure 28). Les produits des gènes *iap* de mammifères, cIAP-1 et cIAP-2, interagissent avec le TNF-R et bloquent l'apoptose (Liston *et al.*, 1996). Cinq protéines humaines apparentées à la famille IAP ont été identifiées :

- NAIP (Liston *et al.*, 1996)
- cIAP-1 (Rothe *et al.*, 1995) ou HIAP-2 (Liston *et al.*, 1996)
- cIAP-2 (Rothe *et al.*, 1995) ou HIAP-1 (Liston *et al.*, 1996)
- XIAP (Liston *et al.*, 1996) ou hILP (Duckett *et al.*, 1996)
- Survivine (Liston *et al.*, 1996)

Les protéines cIAP-1 et cIAP- 2 (cellular-IAP), XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) peuvent lier et inhiber efficacement des caspases spécifiques telles que les caspases-3, -7 et -9, mais pas les caspases-1, -6, -8 et -10 (Deveraux *et al.*, 1998). NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein), pour sa part, est incapable d'inhiber la caspase-9 (Roy *et al.*, 1997), mais peut inhiber la caspase-3 (Mercer *et al.*, 2000). Les IAPs, à l'exception de la survivine, sont caractérisées par 3 domaines BIRs (Baculovirus IAP Repeats) dans leur partie N-terminale et une partie C-terminale contenant un domaine de doigt de zinc (RING finger) permettant les interactions protéine-protéine. Il semblerait que cIAP-1 et cIAP-2 puissent se lier à TRAF-1 et TRAF -2 grâce à leur motif BIR (Rothe *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1997). Ceci implique que les cIAPs puissent exercer des effets inhibiteurs sur l'activation des caspases en aval des récepteurs de mort (Wang *et al.*, 1998). Par ailleurs cIAP-1, cIAP-2 et XIAP ont été décrits comme des inducteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B (Chu *et al.*, 1997) : cette activation pourrait notamment contribuer à l'effet protecteur de NF- $\kappa$ B dans l'apoptose induite par le ligand TNF $\alpha$  (Wang *et al.*, 1998). Dans la voie mitochondriale, les IAP cellulaires se lient directement à la pro-caspase-9, empêchant son activation et la formation de l'apoptosome avec le cytochrome c et l'APAF-1 (Deveraux *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 2004) (Figure 18).



**Figure 28** : Structure schématique de la protéine IAP

Il est à noter que la protéine Smac/Diablo est un inhibiteur des IAPs. Au cours de l'apoptose, la protéine Smac/Diablo est libérée de la mitochondrie et se lie aux IAPs qui ont pour rôle d'empêcher l'activation de la caspase-9. Cette fixation de Smac/Diablo sur IAP permet le bon déroulement de l'apoptose avec l'activation de la caspase-9 (Ravagnan *et al.*, 2002) (Figure 18).

#### IV.3.4.2. Inhibiteurs de synthèse

La première démarche a été de remplacer au niveau des substrats existants le groupement « rapporteur » (-AMC, etc...) par un groupement -CHO (aldéhyde) qui réagit avec le site catalytique de la protéase et bloque l'activité protéasique de l'enzyme. Les inhibiteurs Ac-XXXD-CHO ainsi obtenus, ont une action inhibitrice réversible. Le blocage de l'apoptose *via* l'inhibition des caspases avec ce type de composé, est donc très limité dans le temps. Le groupement -CHO a alors été remplacé par le groupement -FMK (FluoroMethylKetone) qui forment des liaisons covalentes irréversibles avec la caspase fixée (Duval *et al.*, 2002 ; Bellet *et al.*, 2004). Les composés de type z-XXXD-FMK sont des inhibiteurs irréversibles des caspases. En utilisant ce type d'inhibiteur on peut rechercher dans un système d'étude de l'apoptose si une augmentation d'activité caspase enregistrée est la conséquence (i) soit d'une augmentation de l'activité protéasique intrinsèque de l'enzyme (ii) soit d'une augmentation du nombre d'enzymes activées (Stennicke & Salvesen, 2000).

Les inhibiteurs de type Ac-XXXD-CHO sont plutôt utilisés dans le dosage d'activité caspases au niveau d'extraits cellulaires, c'est-à-dire de protéines issues de cellules lysées ; alors que l'inhibiteur de type z-XXXD-FMK est plutôt utilisé pour bloquer *in situ* l'activation des caspases sur des cellules vivantes.

Il existe actuellement un inhibiteur de type z-XXXD-FMK pour chaque activité caspase de mammifères décrite à ce jour. Ainsi, il est maintenant possible d'inhiber spécifiquement une activité caspase, sur des cellules en culture, sans avoir recours à des lignées génétiquement modifiées (Schlesinger *et al.*, 2000).

## IV.4. Autres mécanismes régulant l'apoptose

### IV.4.1. Apoptose caspase indépendante

Ces dernières années, plusieurs mécanismes de mort cellulaire indépendants de la voie des caspases ont été proposés. L'utilisation d'inhibiteurs aspécifiques des caspases, comme z-VAD-FMK (Deas *et al.*, 1998 ; Susin *et al.*, 1999a), a permis de démontrer que l'apoptose se produit par des mécanismes dépendants des caspases, mais aussi par des mécanismes indépendants des caspases (Figure 29).

L'équipe de Kroemer a mis en évidence un nouveau facteur, l'**AIF** (Apoptosis Inducing Factor) et a montré que cette protéine est une molécule apoptogène libérée par la mitochondrie ; son clonage date seulement de 1999 (Susin *et al.*, 1999a). L'AIF a une double fonction d'oxydoréductase et de facteur apoptogène. Cette protéine est séquestrée au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial, puis sous l'influence d'un stimulus apoptotique, elle est relarguée dans le cytosol (Figure 15). L'AIF est ensuite acheminée vers le noyau (Figure 18) où elle est capable d'induire, à elle seule, les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose, telles que la condensation cytoplasmique et nucléaire, la fragmentation nucléaire de haut poids moléculaire en absence d'activation des caspases (Susin *et al.*, 1999a). Ces auteurs ont montré que les deux voies, celle dépendante de l'activation des caspases et celle de l'AIF, peuvent coexister dans certains modèles cellulaires. La voie de l'AIF a donc été qualifiée de voie caspase-indépendante. Cependant, depuis quelques années, deux théories s'opposent et instaurent un débat qui remet en question l'unicité de cette voie caspase-indépendante pour l'AIF. Effectivement, si il est majoritairement admis que la voie de l'AIF a un effet caspase-indépendant suite à son relargage par la mitochondrie après un stimulus direct (ou stress) sur cette dernière (Figure 29), l'AIF peut aussi être relarguée dans le cytosol par la mitochondrie à la suite de la fixation sur la mitochondrie de la protéine Bid tronquée. Cette dernière a été préalablement activée après clivage par la caspase-2 ou la caspase-8 provenant de la voie des récepteurs (Susin *et al.*, 1999b) (Figure 29).

Ainsi, certains auteurs émettent aujourd'hui l'idée que le relargage de l'AIF puisse être aussi provoqué par l'activation d'une voie caspase-dépendante (Arnoult *et al.*, 2003).

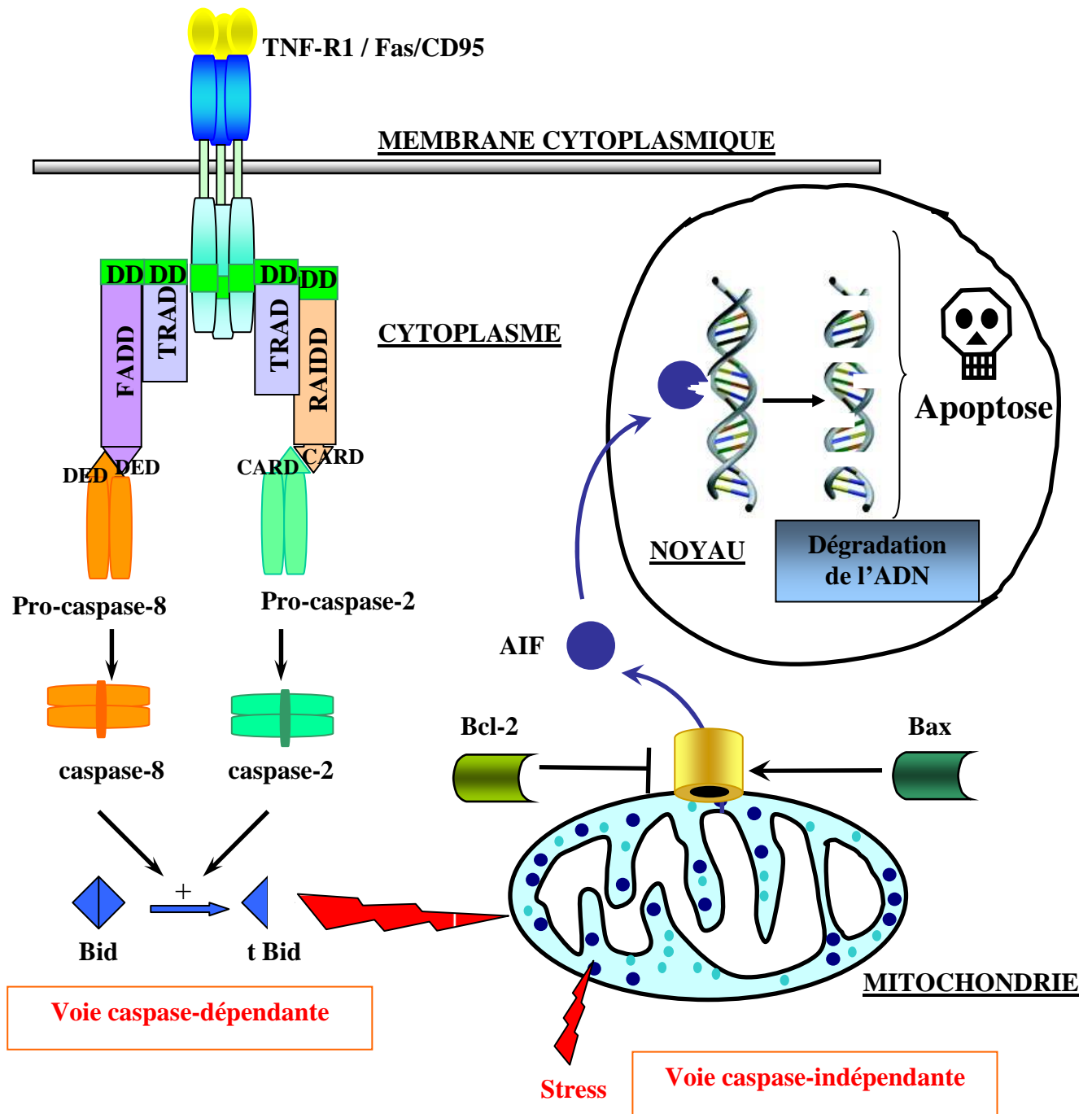


Figure 29 : Apoptose via AIF : voies caspase-dépendante et indépendante.

#### IV.4.2. Implication du réticulum endoplasmique dans l'apoptose

La mitochondrie n'est pas le seul organite intracellulaire impliqué dans l'apoptose. Le **réticulum endoplasmique** (RE) intervient dans la rétention du calcium intracellulaire et le maintien de l'homéostasie calcique (Sambrook, 1990) : il est considéré comme une réserve de calcium intracellulaire. Le RE est essentiel à la survie de la cellule et toute perturbation de sa fonction induit un relargage de calcium conduisant à l'apoptose (Diaz-Horta *et al.*, 2002). Les facteurs capables de perturber le fonctionnement du RE sont rassemblés sous le terme « ER stress ». Ces stress incluent l'inhibition de la glycosylation des protéines, la réduction de la formation des ponts di-sulfures protéiques, la chute du calcium intra-RE, le blocage du transport des protéines du RE à l'appareil de Golgi (Oyadomari *et al.*, 2002). Ces stress inhibent toutes les fonctions cellulaires du RE.

Les mécanismes déclencheurs de l'apoptose dépendante du RE ne sont pas clairement identifiés mais ils impliqueraient le calcium (Hajnoczky *et al.*, 2003), ainsi que trois mécanismes d'induction de l'apoptose par le RE tels que CHOP, c-JUN NH2-terminal kinase (JUNK) et caspase-12 (Nakagawa *et al.*, 2000 ; Oyadomari *et al.*, 2002).

Le relargage du **calcium** du RE à l'intérieur du cytosol est un facteur déclenchant l'apoptose (Breckenridge *et al.*, 2003 ; Hajnoczky *et al.*, 2003). De nombreuses enzymes cytoplasmiques impliquées dans l'apoptose sont calcium-dépendantes, comme par exemple les endonucléases, la calpain (cytosolic calcium-activated neutral cysteine endopeptidase) et la calcineurin. En plus du clivage de la caspase-12 et de Bcl-X<sub>L</sub>, la calpain serait également responsable du clivage de Bid et de Bcl-2. La calcineurin aurait pour rôle de déphosphoryler Bad qui migre alors vers la mitochondrie pour s'associer à Bcl-X<sub>L</sub>. La propagation du calcium vers la mitochondrie stimule la production d'ATP par l'activation des déshydrogénases calcium-dépendantes ; cependant une quantité excessive de calcium au niveau de la mitochondrie provoque l'apoptose en stimulant le relargage des protéines apoptogènes, et la production de ROS (Ajamieh *et al.*, 2002). L'apoptose induite par le calcium est régulée par les membres de la famille de protéines Bcl-2. La protéine Bcl-2 aurait pour rôle de réguler la perméabilité des membranes du RE et la concentration calcique à l'intérieur de celui-ci (Rizzuto *et al.*, 2003). La surexpression de Bcl-2 empêche un relargage trop important du calcium du RE.



Le premier mécanisme d'induction de l'apoptose par le RE implique le facteur de transcription **CHOP** (C/EBP homologous protein)/GADD153 (Growth Arrest Damage DNA induced gene *p53*) qui est un membre de la famille C/EBP (Element Binding Protein). Ce facteur de transcription n'est pas ou peu exprimé dans les conditions physiologiques, mais à la suite d'un stress au niveau du RE (ER stress), il est fortement exprimé (Wang *et al.*, 1996). Cette surexpression provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Barone *et al.*, 1994 ; Forus *et al.*, 1994). Bien que le mécanisme précis ne soit pas encore connu, lors du processus apoptotique, CHOP augmente et active l'expression d'un certain nombre de gènes appelés DOCs (Downstream of CHOP) et notamment la carbonic anhydrase VI (Kawahara *et al.*, 2001). Cette dernière activerait elle-même l'apoptose *via* une augmentation intracellulaire de la concentration en protons et une diminution du pH intracellulaire (Sok *et al.*, 1999). L'activité du facteur pro-apoptotique Bax est élevée à pH bas. Des fibroblastes déficients en Bax et Bak sont résistants au stress du RE, ce qui suggère l'implication de Bax et Bak dans l'apoptose *via* le RE (Wei *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que CHOP sous-régule l'ARNm de *bcl-2* dans les cellules M1 (myeloblastic leukemia cells), ce qui favorise le processus apoptotique. Pourtant, CHOP pourrait induire l'apoptose selon un mécanisme indépendant de la protéine *p53* (Matsumoto *et al.*, 1996) et il pourrait agir sur les membres de la famille *Bcl-2*, sans passer par cette protéine *p53*.

Le second mécanisme d'induction de l'apoptose par le RE s'effectue par l'activation de la **kinase c-JUN** (JUNK). Cette enzyme participe à la décision de la cellule de choisir entre la vie et la mort (§ IV.1.1.1.2. - Figure 10), c'est-à-dire qu'elle peut être impliquée dans des réponses cellulaires opposées, comme la différenciation et la prolifération, ou l'apoptose. Son activité dépend fortement du type cellulaire. JUNK a un rôle de régulateur transcriptionnel *via* les facteurs de transcription c-JUN/AP-1. Elle permet l'induction de l'expression des ligands Fas/CD95-L, TNF $\alpha$  ou de la protéine *p53*.

JUNK possède aussi une activité de régulateur post-traductionnel par phosphorylation : cette activité permet l'inactivation de *Bcl-2*, *Bcl-X<sub>L</sub>*. Tous ces mécanismes peuvent fonctionner séparément ou coopérer pour induire l'apoptose. Le rôle de JUNK sur *p53* est controversé : elle serait capable d'une part de favoriser la dégradation de *p53* et d'autre part, par phosphorylation, elle empêcherait sa dégradation. Ainsi, JUNK régulerait la demi-vie de *p53* (Herr & Debatin, 2001).

Le troisième mécanisme met en jeu la **caspase-12** qui est localisée spécifiquement sur la membrane cytosolique du RE (Nakagawa *et al.*, 2000). Cette caspase n'est pas impliquée dans les voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque (Oyadomari *et al.*, 2002). La pro-caspase 12 est activée lorsque les cellules sont traitées avec des agents capables d'induire un stress du RE comme la tunicamycine par exemple (Welihinda *et al.*, 1999). Des souris ne possédant pas de caspase-12 sont résistantes au stress impliquant le RE.

Cette caspase serait activée par la calpain, par IRE1 $\alpha$  (type I transmembrane endonuclease localized in the RE) / TRAF-2 et par la caspase-7 (Nakagawa & Yuan, 2000 ; Yoneda *et al.*, 2001 ; Rao *et al.*, 2001). La calpain activée serait responsable du clivage de la pro-caspase-12 et de Bcl-X<sub>L</sub>, activant ainsi la caspase-12 et inhibant Bcl-X<sub>L</sub>. Une augmentation de calcium cytosolique pourrait donc activer la caspase-12. La protéine TRAF-2 pourrait être responsable du recrutement et de l'activation de la caspase-12 (Yoneda *et al.*, 2001). La translocation de la caspase-7 au niveau du RE est décrite à la suite d'un stress du RE (Rao *et al.*, 2001), et pourrait donc aussi activer par clivage la caspase-12.

En 2003, Hajnoczky et coll. démontrent que la surexpression de Bak ou Bax induit un relargage de calcium, ce qui indique qu'il pourrait y avoir une redistribution précoce de Bax et Bak au niveau des membranes du RE, lors de l'apoptose. Plus récemment, en 2003, Zong et coll. corroborent ces travaux et démontrent que Bax et Bak sont bien localisés au niveau des membranes du RE et que dans des cellules déficientes en Bax et Bak, la pro-caspase-12 ne peut être clivée et par conséquent activée. Bax et Bak sont responsables de l'activation de la caspase-12 *via* une baisse progressive de calcium intra-RE. Bien que le rôle de la caspase-12 dans l'induction de l'apoptose ne soit pas encore bien établi, ces auteurs concluent que Bax et Bak initient l'activation de cette caspase. Il est à noter que le rôle de Bak est différent en fonction de sa localisation cellulaire : lorsque Bak est localisé au niveau des membranes mitochondriales, il favoriserait l'activation de la caspase-7 et le clivage de la PARP ; lorsque Bak est localisé au niveau des membranes du RE, il induit l'activation de la caspase-12. Nous ne savons pas aujourd'hui pourquoi la caspase-12 est activée uniquement après des stimuli apoptotiques sur le RE ; sa localisation intra-RE est peut-être l'explication. Mais cette caspase semble être essentielle pour l'apoptose RE-dépendante ce qui en fait une cible pharmacologique potentielle.

### IV.4.3. Suppresseur de tumeur p53 et apoptose

Le suppresseur de tumeur p53 est l'une des plus importantes molécules intervenant dans la régulation de la prolifération cellulaire. Elle protège les cellules d'une prolifération tumorale accrue. Elle joue un rôle central dans la réponse cellulaire au stress génotoxique. L'inactivation de p53 est une étape importante de la carcinogénèse. Des mutations inactivatrices de p53 ont été observées dans plus de 50 % des tumeurs humaines (May & May, 1999). La protéine p53 se comporte en suppresseur de tumeur en induisant l'arrêt de la prolifération cellulaire ou l'apoptose, en s'accumulant dans le noyau en réponse à un grand nombre de stress cellulaires (exposition aux agents endommageant l'ADN, hypoxie, déficit en nucléotides, activation oncogénique inappropriée, etc...) (Figure 30). Les réponses à ces stress empêcheraient la propagation des cellules comportant un ADN endommagé et présentant un potentiel oncogénique. Ce rôle de p53 comme « gardien du génome » est probablement la raison pour laquelle p53 est la cible de mutations dans plus de 50% de tous les cancers humains (Levine, 1997).

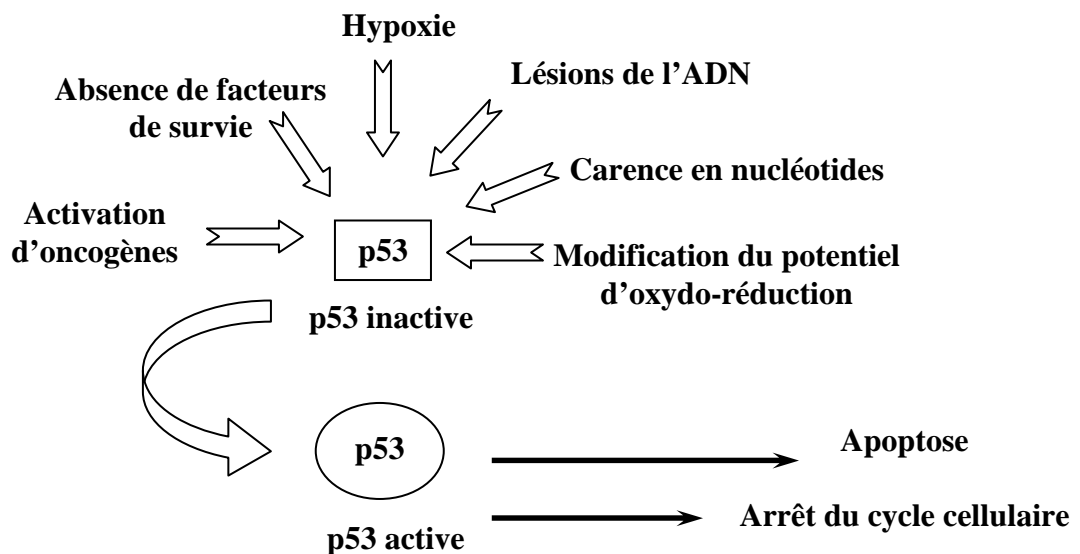


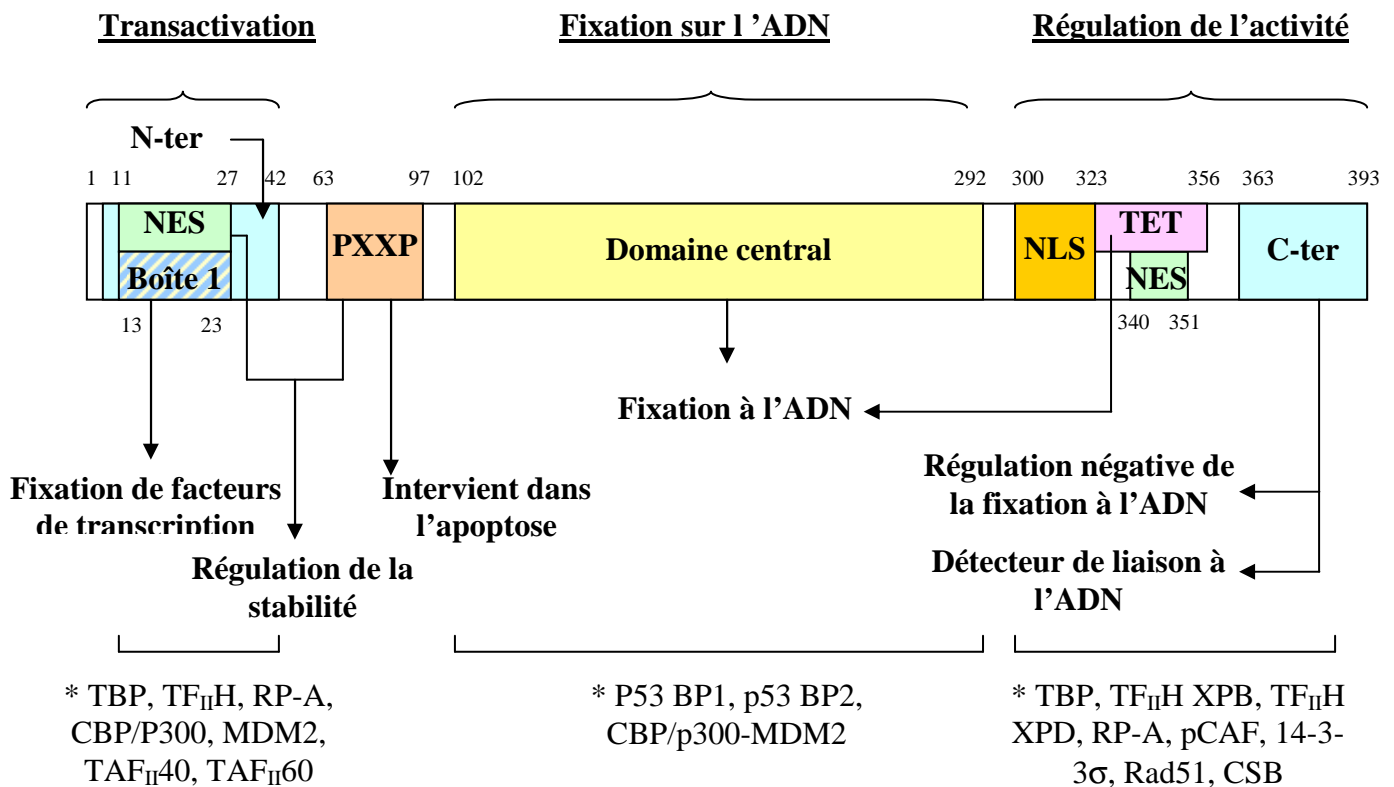
Figure 30 : Activation de la protéine p53

### IV.4.3.1. Généralités

#### IV.4.3.1.1. Structure de la protéine p53

Le gène *p53*, situé sur le bras court du chromosome 17, code une protéine de 53 KDa présente dans toutes les cellules de l'organisme ; cette protéine a une durée de vie très courte (20 minutes en moyenne). Elle est en quantité faible, voir même indétectable dans les cellules ou les tissus normaux, alors que son expression augmente dans les cellules malignes. Chez l'Homme, cette protéine est un facteur de transcription constitué de 393 acides aminés et comportant 5 domaines spécifiques très conservés (May & May, 1999) (Figure 31) :

1. Un domaine N-terminal (résidus 1-42) ou domaine de transactivation, nécessaire à son interaction avec la machinerie transcriptionnelle ; cette dernière est composée des protéines TFIID (Transcription Factor II D), de TBP (Tata Binding Protein-TAFs) et de TFIIDH (Transcription Factor II H). Cette machinerie transcriptionnelle se comporte comme un complexe qui régule positivement l'expression des gènes. Ce domaine N-terminal comprend aussi une zone très conservée, boîte 1 (résidus 13-23) impliquée dans la régulation de la stabilité de p53, et une séquence d'exportation nucléaire ou NES (Nuclear Export Signal) (résidus 11-27).
2. Un domaine riche en résidus proline, contenant plusieurs copies du motif PXXP (résidus 63-97), nécessaire à la stabilisation de p53 ; ce domaine interviendrait aussi dans l'apoptose (Venot *et al.*, 1998).
3. Un domaine central de fixation à l'ADN très conservé (résidus 102-292), où se situent la plupart des mutations, inactivant p53, retrouvées dans différents types de cancers humains.
4. Un domaine de tétramérisation (résidus 323-356) qui facilite la fixation spécifique de p53 à l'ADN. Ce domaine comporte aussi une séquence d'exportation nucléaire ou NES (résidus 340-351) et une séquence de localisation nucléaire ou NLS (Nuclear Localization Signal) (résidus 300-323 (Gottifredi & Prives, 2001)). La protéine p53 active est un tétramère dont l'oligomérisation est essentielle à sa fonction de supresseur de tumeurs (May & May, 1999).
5. Un domaine C-terminal (résidus 363-393) qui inhibe la fixation spécifique de p53 sur l'ADN et où se trouve d'autre NLS.

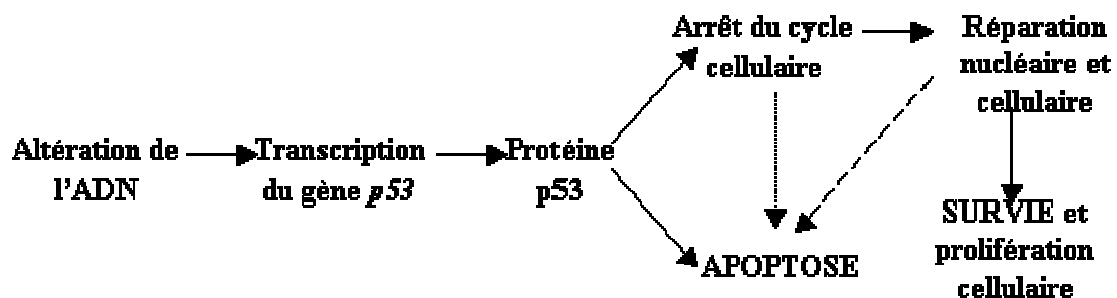


**Figure 31 :** Domaines structuraux et fonctionnels de la protéine p53

\* les principales protéines cellulaires capables de se lier à p53

#### IV.4.3.1.2. Régulation de la protéine p53

En réponse à un dommage de l'ADN, comme l'irradiation aux UV par exemple, p53 subit des modifications post-traductionnelles, comme des phosphorylations ou des acétylations, ayant pour conséquence l'accumulation de cette dernière dans le noyau où elle agit comme facteur de transcription. Il a été démontré que p53 provoque l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Meek, 1997) (Figure 32). Ces deux processus assurent l'intégrité du génome, éliminent les cellules génétiquement altérées et inhibent le développement tumoral, d'où le nom de « gardien du génome ».



**Figure 32 :** Rôle de p53

Les premiers travaux sur p53 ont démontré que, après exposition des cellules à des agents endommageant l'ADN, le taux intracellulaire de celle-ci augmentait. Cette augmentation est due à une stabilisation de p53 par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation) et non à une augmentation de la transcription du gène *p53* (Kastan *et al.*, 1992 ; Zhan *et al.*, 1993 ; Kurosawa *et al.*, 2002). p53 régule la transcription de nombreux gènes impliqués soit dans les mécanismes d'arrêt de la prolifération cellulaire, soit dans la mort cellulaire. Un ensemble croissant de données suggère que la phosphorylation de p53 sur de multiples acides aminés permet son activation, et le choix vers un arrêt du cycle cellulaire ou vers l'apoptose (Meek, 1997). La phosphorylation, mais aussi l'acétylation, sont caractéristiques des modifications post-traductionnelles de p53, conduisant à son activation (Leblanc & May, 2002).

Les sites de phosphorylation se situent dans les régions N-terminale et C-terminale de la protéine. La plupart des sites N-terminaux sont regroupés dans le domaine de transactivation de la protéine (résidus 4, 6, 9, 15 et 37), une région essentielle pour son interaction avec d'autres protéines. Dans la partie C-terminale, deux sites de phosphorylation ont été identifiés en position sérine 315 et 392, et ces phosphorylations permettent la régulation de la liaison de p53 à l'ADN.

Plusieurs protéines kinases sont activées suite à des lésions sur l'ADN et sont capables de phosphoryler p53 *in vitro*. Elles pourraient participer *in vivo* à son activation. Ces kinases sont regroupées en fonction de leur site de phosphorylation sur p53 :

- Phosphorylation activatrice de p53, en N-terminal

- DNA-PK (DNA-activated Protein Kinase) joue un rôle essentiel dans les réparations de l'ADN double brin. Elle phosphoryle de nombreuses protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire dont les sérines 15 et 37 de p53 (Lees-Miller *et al.*, 1992).

- ATM-K (*Ataxia Telanglectasia Mutated Kinase*) est impliquée dans l'induction et la stabilisation de p53 en la phosphorylant sur la sérine 15 (Siliciano *et al.*, 1997).

- Phosphorylation régulant la fixation de p53 à l'ADN, en C-terminal

- PKC (Protein Kinase C) phosphoryle sur les sérines 376 et 378 et augmente ainsi la fixation spécifique de p53 à l'ADN (Meek, 1997).

- CK II (Casein Kinase II) favorise la tétramérisation de p53 par phosphorylation sur la sérine 392 (Sakaguchi *et al.*, 1997).

- Acétylation et rôle dans la fixation spécifique de p53 à l'ADN

- L'acétylation de la lysine 320 par PCAF (p300/CBP Associated Factor) et/ou les lysines 373 et 382 par p300/CBP (CREB Binding Protein) contribue également à

l'activation de p53. Il a été suggéré que la phosphorylation des sérines 15, 33 et 37 permettrait l'acétylation de résidus lysines de la région C-terminale, au moyen d'un recrutement accru de PCAF et p300/CBP (Prives & Manley, 2001). Ceci favoriserait la fixation spécifique de p53 à l'ADN.

Un autre moyen de réguler p53, ainsi que sa stabilité, se fait par la complexation de p53 avec la protéine régulatrice MDM2 (Murine Double Minute 2) (Momand *et al.*, 1992) ou HDM2 (Human Double Minute 2), homologue humain cloné (Chen *et al.*, 1993). Cette protéine a pour fonction, une fois fixée sur p53, de dégrader cette dernière et d'empêcher son expression.

En effet, p53 régule la transcription du gène *mdm2* en se fixant sur le promoteur de ce gène, formant l'ARNm correspondant. Ce dernier migre dans le cytoplasme pour former la protéine MDM2. Cette protéine va dans le noyau pour fixer p53 et former ainsi le complexe MDM2/p53. Une fois formé, ce complexe a pour fonction de diminuer la quantité de p53 :

- il est capable d'inhiber la transcription de p53 (Fuchs *et al.*, 1998) (Figure 33-1) ;
- il permet aussi, après migration dans le cytoplasme, la dégradation protéolytique de p53 grâce au protéasome par la voie de l'ubiquitine (Haupt *et al.*, 1997) (Figure 33-2) .

Ainsi, après association à p53, MDM2 contrôle à la fois l'expression de p53 et son taux intracellulaire (Ryan *et al.*, 2001) (Figure 33).

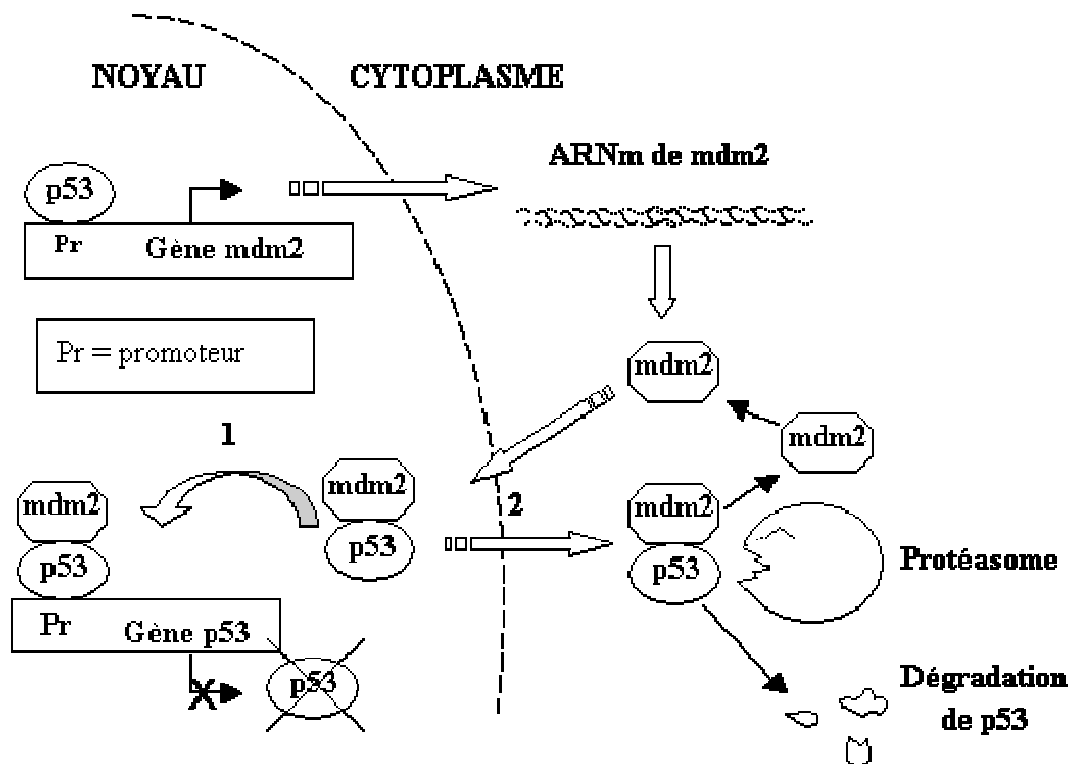


Figure 33 : Régulation de p53 par MDM2

### **IV.4.3.2. Fonctions de p53 : arrêt du cycle cellulaire et/ou apoptose**

Le gène suppresseur de tumeur p53 empêche la réplication de l'ADN endommagé, soit en inhibant la progression des différentes phases du cycle cellulaire, soit en provoquant la mort cellulaire par apoptose.

#### **IV.4.3.2.1. Le cycle cellulaire**

##### **1. Généralités**

Le cycle cellulaire est un ensemble de mécanismes conduisant à la réplication du génome et à la duplication de la cellule. Le terme "cycle" définit la répétabilité de ces mécanismes permettant le maintien d'une information génétique constante en quantité et en qualité, de génération en génération. La progression dans les différentes phases du cycle cellulaire peut s'arrêter à des moments clés en fonction de signaux extérieurs (manque de facteurs mitotiques, présence de facteurs anti-mitotiques) ou intérieurs (niveau énergétique, intégrité du génome). L'arrêt du cycle peut être momentané, durable ou conduire à la destruction de la cellule par apoptose si l'ADN subi des dommages irréversibles.

Le cycle cellulaire est divisé en 4 phases : G1, S, G2 et M. A ces quatre phases s'ajoute la phase G0 ou phase de quiescence qui est un laps de temps, en début de phase G1, pendant lequel la cellule est sensible aux conditions extérieures : elle devient quiescente en attendant des conditions favorables (Figure 34). La régulation de la division cellulaire est d'une grande complexité car il existe des cascades de réactions inter-dépendantes dont il est difficile de situer le point de départ.

La mitose (M), phase pendant laquelle la cellule se divise, est précédée des phases G1, S et G2 au cours desquelles la cellule accumule le matériel nécessaire (protéines, ADN ...) à la naissance de deux cellules-filles. Pendant la phase G1, il y a accumulation de protéines nécessaires à la synthèse de l'ADN et pendant la phase G2, il y a synthèse de protéines qui permettront la séparation et la migration des chromosomes. Au cours de la phase S, l'ADN polymérase III est responsable de la réplication de l'ADN (Lodish *et al.*, 1997).



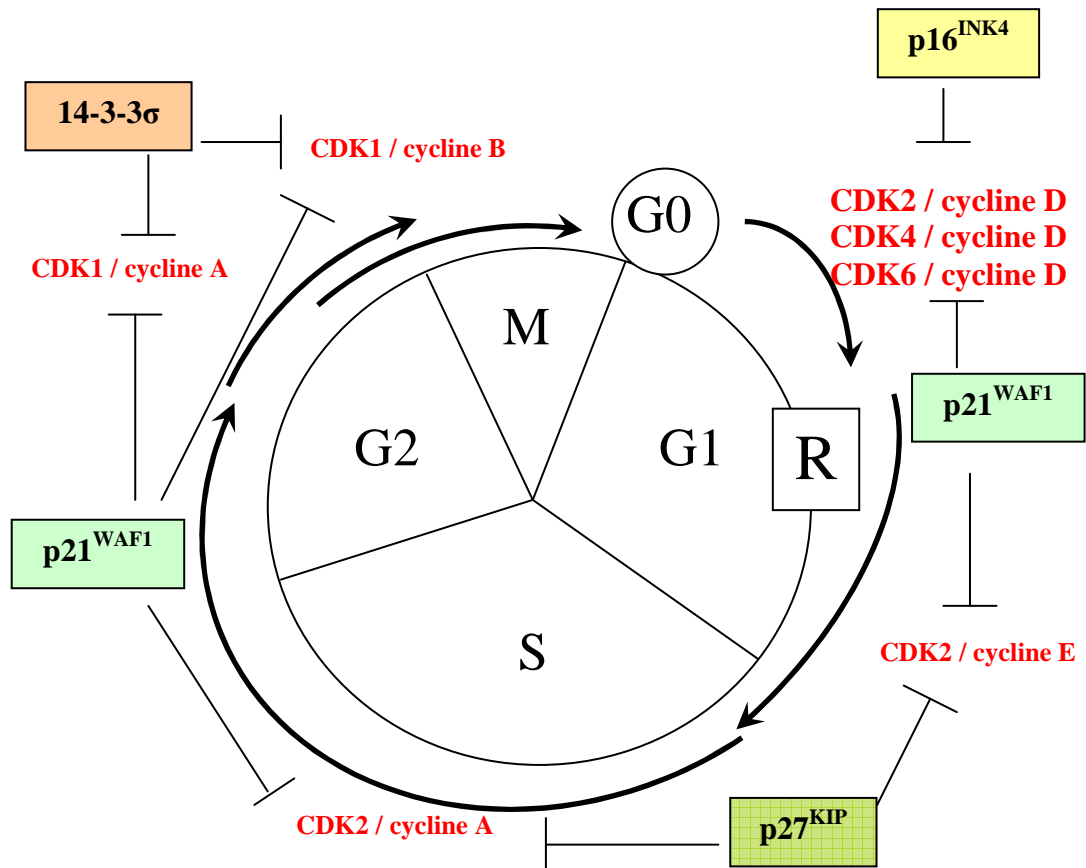
Ces phases sont décrites ci-après :

1. Phase G1 (G = gap ou intervalle) : synthèses protéiques nécessaires à la phase S
2. Phase S ou de synthèse : réplication de l'ADN effectuée grâce à l'ADN polymérase III
3. Phase G2 ou pré-mitotique : synthèses protéiques nécessaires à la séparation et à la migration des chromosomes
4. Phase M ou mitotique : division cellulaire proprement dite comprenant 6 étapes
  - ◆ Prophase : le noyau de la cellule contenant les chromosomes est visible
  - ◆ Prométaphase : rupture de l'enveloppe nucléaire et organisation des microtubules
  - ◆ Métaphase : les chromosomes migrent le long des microtubules pour former la plaque équatoriale
  - ◆ Anaphase : migration des chromosomes le long des microtubules vers les deux pôles de la cellule
  - ◆ Télophase : une enveloppe nucléaire se forme aux deux pôles de la cellule
  - ◆ Cytodiérèse : la cellule mère se divise pour former deux cellules filles ayant le même contenu en ADN.

Le cycle cellulaire est contrôlé au niveau des transitions G1/S, G2/M et M/G1 par des complexes protéiques formés par l'association d'une cycline et d'une protéine kinase cycline-dépendante ou CDK (Cyclin-Dependant protein Kinase). Cette association est constituée de deux sous-unités : une sous-unité catalytique appartenant à la famille des CDK et une sous-unité régulatrice de la famille des cyclines. Ces cyclines sont responsables de la spécificité de substrat des complexes cycline / CDK (Sherr, 1996).

A ce jour, neuf CDK ont été identifiées dans les cellules animales, et seulement quatre participent activement à la régulation du cycle cellulaire (CDK 1, 2, 4, et 6).

De même, il existe neuf cyclines identifiées (cyclines A à I) et seules les cyclines A, B, D et E sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Ce sont des protéines labiles dont la concentration varie au cours du cycle cellulaire. Elles sont donc régulées au niveau de leur transcription et de leur dégradation.



**Figure 34 :** Représentation schématique de la régulation du cycle cellulaire.

Les quatre complexes cycline / CDK, indispensables au bon fonctionnement du cycle cellulaire sont respectivement les suivants (Figure 34) :

- Les complexes **cycline D / CDK4** et **cycline D / CDK6** régulent la transition G1/S. La quantité de cycline D varie très peu au cours du cycle.
- Le complexe **cycline E / CDK2** est essentiel au passage du point de contrôle R et donc à l'entrée dans la phase S. Il induit la synthèse des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN. La cycline E augmente en début de phase G1 et diminue à l'entrée de la phase S.
- Le complexe **cycline A / CDK2** initie la réplication de l'ADN. La cycline A apparaît en fin de phase G1 et son expression diminue en début de phase M.
- Le complexe **cycline B / CDK1** initie les modifications cellulaires nécessaires à l'accollement des chromatides au fuseau mitotique et permet la division cellulaire. La cycline B augmente en fin de phase G2, atteint son maximum en métaphase, et chute en fin de mitose lors de la cytotéiérèse (Teyssier *et al.*, 1999).

Pour être actifs, les complexes cycline / CDK doivent être phosphorylés par le complexe CAK (CDK Activating Kinase) : cette phosphorylation se fait sur une thréonine, proche du site actif de la sous-unité catalytique (CDK). A l'inverse, les complexes sont inactivés par une nouvelle phosphorylation des CDKs par les kinases WEE1 et MYT1, ou par déphosphorylation par des phosphatases (CDC25 par exemple). Leur régulation, par phosphorylation et par déphosphorylation, permet l'accumulation de complexes inactifs qui peuvent être activés très rapidement à des moments clés du cycle.

Les inhibiteurs de CDK ou CKI (Cyclin Kinase Inhibitor) exercent un contrôle négatif réversible sur certains complexes cycline / CDK (Sherr & Roberts, 1999). Ils sont répartis en deux familles :

- Les membres de la famille INK4 (p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup> et p19<sup>INK4d</sup> = p19<sup>ARF</sup>) qui inhibent spécifiquement CDK4 et CDK6 en empêchant leur liaison avec la cycline D.
- Les membres de la famille Cip/Kip (p21<sup>WAF/CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> et p57<sup>KIP2</sup>) qui inhibent les complexes cycline E/CDK2 et cycline A/CDK2 par simple liaison.

## 2. p53 : arrêt du cycle cellulaire et molécules impliquées

La protéine p53 peut conduire à l'arrêt du cycle cellulaire aux points de transition entre G2 et M et entre G1 et S (North & Hainaut, 2000).

❖ **Arrêt en G2/M** : p53 régule la transcription du gène *14-3-3σ*. La synthèse de la protéine **14-3-3σ** est en partie responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Hermeking *et al.*, 1997) (Figure 34).

❖ **Arrêt en G1/S** : la protéine p53 active, stoppe la progression du cycle cellulaire à la transition G1/S suivant deux mécanismes distincts :

- le premier mode d'action de p53 implique une interaction directe avec d'autres protéines jouant un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN telles que RPA (Replicon Protein A), ce qui empêche l'initiation de la réplication de l'ADN (Dutta *et al.*, 1993). Ces interactions protéines-protéines sont responsables d'un arrêt du cycle cellulaire très rapidement après que l'ADN soit endommagé.

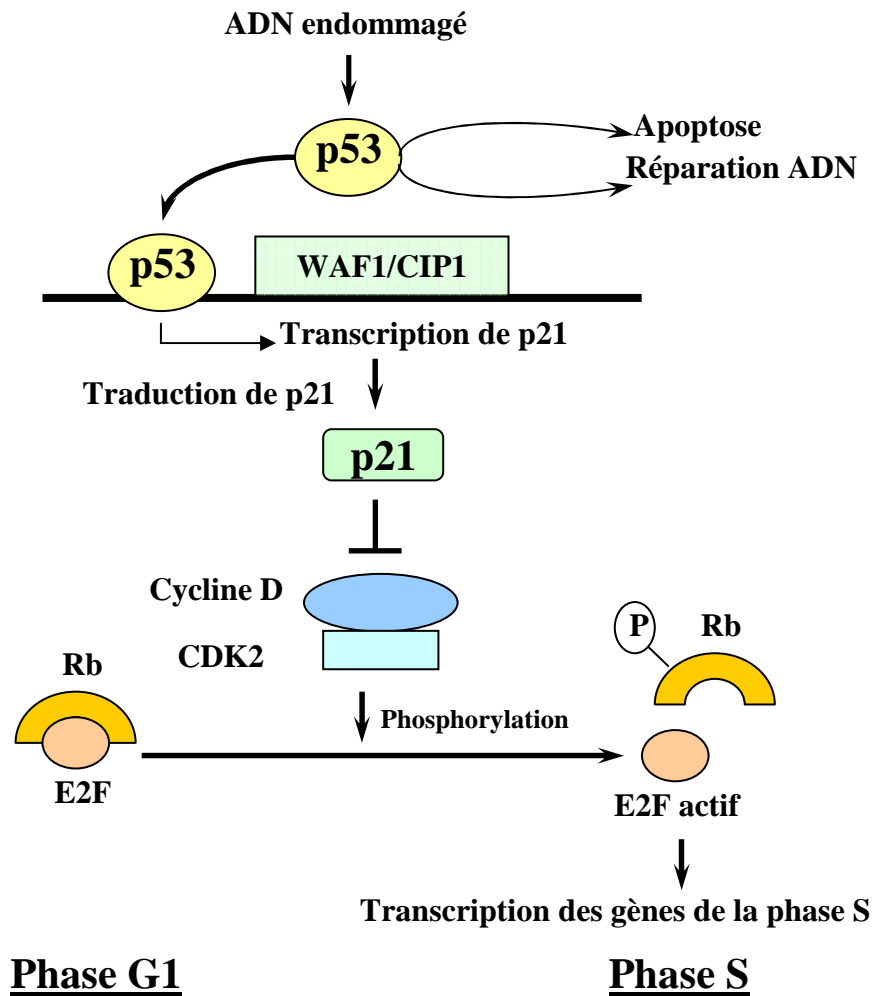
- dans le deuxième mode d'action, une fois p53 phosphorylée, elle régule la transcription de nombreux gènes cibles, qui deviennent des partenaires de p53 dans l'arrêt du

cycle cellulaire. Parmi ces gènes, on distingue le gène *WAF1/CIP1* codant pour la protéine p21, le gène *gadd45* (Growth-Arrest DNA-Damage), ainsi que le régulateur négatif *mdm2*.

- **p21** : la protéine p21, nommée aussi WAF1, CAP20, Cip1 et Sdi1, fait partie de la famille des CKIs qui comprend aussi les protéines p27 et p57. Ces trois CKIs contiennent un domaine de liaison à PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) dans la région C-terminale. Les CKIs possèdent aussi une région N-terminale conservée qui est indispensable et suffisante à l'inhibition des complexes cyclines / CDK. Les CKIs se lient aux complexes cycline / CDK afin d'inhiber leur activité, et empêcher la progression dans les différentes phases du cycle cellulaire.

La protéine p21 est nécessaire pour la réplication et la réparation de l'ADN. Dès que l'ADN est endommagé, p53 exprime le gène *p21*. La protéine p21 a pour fonction d'inhiber le complexe cycline D/CDK2, permettant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et favorisant la réparation de l'ADN. Le complexe cycline D/CDK2 a pour rôle, quand il n'est pas inhibé par p21, de phosphoryler les membres de la famille de protéines Rb (rétinoblastome). Ces membres sont des régulateurs négatifs de la transition de la phases G1 à la phase S du cycle cellulaire. Une fois phosphorylé, Rb se détache de la protéine E2F qui devient alors active. Ce dernier peut alors transcrire des gènes régulant le passage de la phase G1 à la phase S, et permettre ainsi le bon déroulement du cycle cellulaire (Coats *et al.*, 1999) (Figure 35).

- **GADD45** : comme p21, GADD45 est régulée par p53 (Figure 37) ; GADD45 est capable de se complexer avec des protéines CDK et PCNA, inhibant ainsi la synthèse d'ADN, mais aussi activant la réparation par excision de nucléotides (Smith *et al.*, 1996).
- **MDM2** : la protéine MDM2 stimule la libération du facteur de transcription E2F en se complexant à Rb. Elle peut aussi s'associer avec E2F libérée, et permettre l'activation des gènes cibles de E2F. MDM2 a donc la capacité de supprimer le blocage en G1 en agissant simultanément sur p53 et Rb/E2F (Haines, 1997).
- **NB** : **p19** : la fixation de la protéine p19<sup>ARF</sup> (Alternate Reading Frame) sur p53 stabilise et active le facteur de transcription de p53. p19 se complexe avec MDM2 et induit la dégradation de MDM2 favorisant ainsi l'arrêt en G1 (Pomerantz *et al.*, 1998).

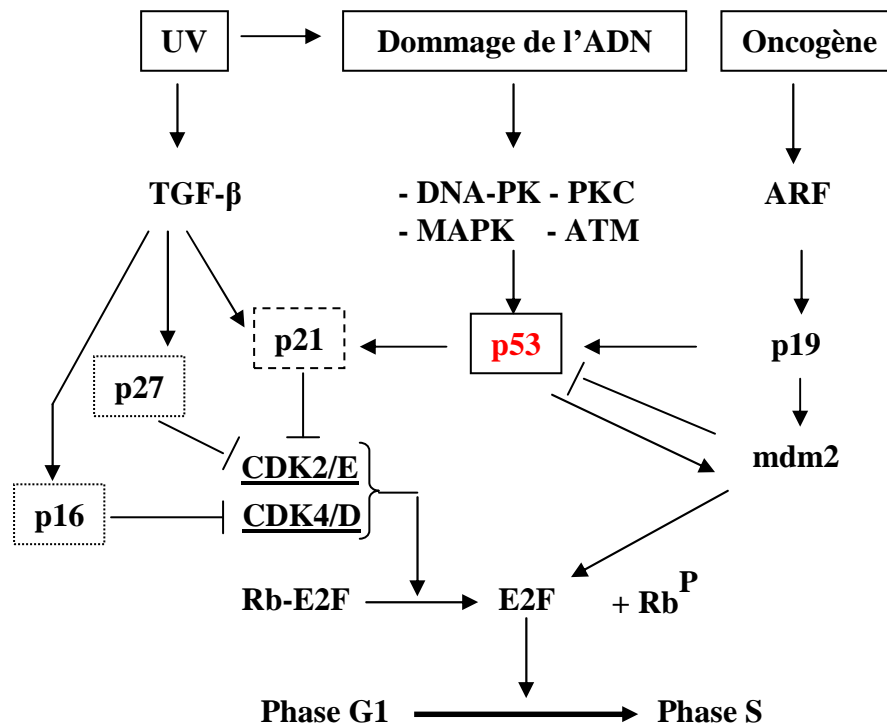


**Figure 35** : Représentation schématique de l'arrêt du cycle en G1 par p53 *via* p21

Il existe toutefois un mécanisme indépendant de p53 qui induit l'arrêt du cycle en G1 : TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor). Ce dernier est un puissant inhibiteur de la prolifération cellulaire et agit en induisant une surexpression des CKIs comme p16, p21, p27 et p15 (Reynisdottir *et al.*, 1995). TGF- $\beta$  réprime également l'expression de CDK4, de la cycline A et de la CDC25 A (phosphatase régulant la division du cycle cellulaire par le contrôle de l'activité des CDK) (Iavarone & Massague, 1997). La protéine p16<sup>INK4</sup> n'est pas régulée par p53, mais par TGF- $\beta$ , et se fixe sur le complexe cycline D/CDK4 pour inhiber la phosphorylation de Rb.

Ces différents effecteurs CKIs concourent tous à induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

La figure 36 regroupe toutes les étapes en amont et en aval de l'implication de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.



**Figure 36 :** Implication de p53 et de TGF-  $\beta$  dans l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire.

### 3. p21 et apoptose

En plus de son rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire, la protéine p21 pourrait induire aussi l'apoptose. Mais, son intervention exacte est aujourd'hui controversée. Le rôle de p21 varie en fonction du type cellulaire et des stimuli apoptotiques. Certains auteurs lui attribuent des propriétés pro-apoptotiques (Lincet *et al.*, 2000 ; Kang *et al.*, 1999 ; Lu *et al.*, 1998) alors que d'autres décrivent p21 comme un inhibiteur de l'apoptose, soit dépendant de p53 en réponse aux irradiations ou à des traitements chimiques, soit indépendant de p53 en réponse à des signaux tels que le TGF- $\beta$ , le TNF $\alpha$  ou l'IFN $\gamma$  (Interferon) (Gartel & Tyner, 2002).

Dans des lignées cancéreuses traitées par des agents endommageants l'ADN, p21 provoque l'arrêt du cycle cellulaire suivi de l'apoptose induite par l'activation de la caspase-3 ; cette dernière clive p21 (Zhang *et al.*, 1999). Dans des thymocytes subissant des radiations ionisantes, mais aussi dans des cellules de tumeurs mammaires déficientes en p53, la sur-

expression de p21 engendrerait une fonction apoptotique. Dans des lignées hépatiques humaines Hep3B déficientes en p53, la sur-expression de p21 provoque l'induction de Bax, modulant ainsi le rapport Bax/Bcl-2 dans ces cellules (Gartel & Tyner, 2002). L'expression de p21 indépendante de p53 est observée après la liaison de Fas sur son récepteur dans des lymphocytes T alors que dans des thymocytes déficients en p21, une baisse de l'apoptose Fas-dépendante est observée (Gartel & Tyner, 2002).

Tous les auteurs, précédemment cités, présentent la sur-expression de p21 comme étant responsable du processus apoptotique. Néanmoins, le mécanisme par lequel p21 pourrait induire l'apoptose est encore méconnu ; en revanche, les cellules utilisées n'ont pas toujours de protéines p53 fonctionnelles.

De même, une diminution de l'apoptose est observée dans certaines cellules déficientes en p21. Ainsi il est suggéré que p21 pourrait agir avec des protéines composant la machinerie de réparation de l'ADN.

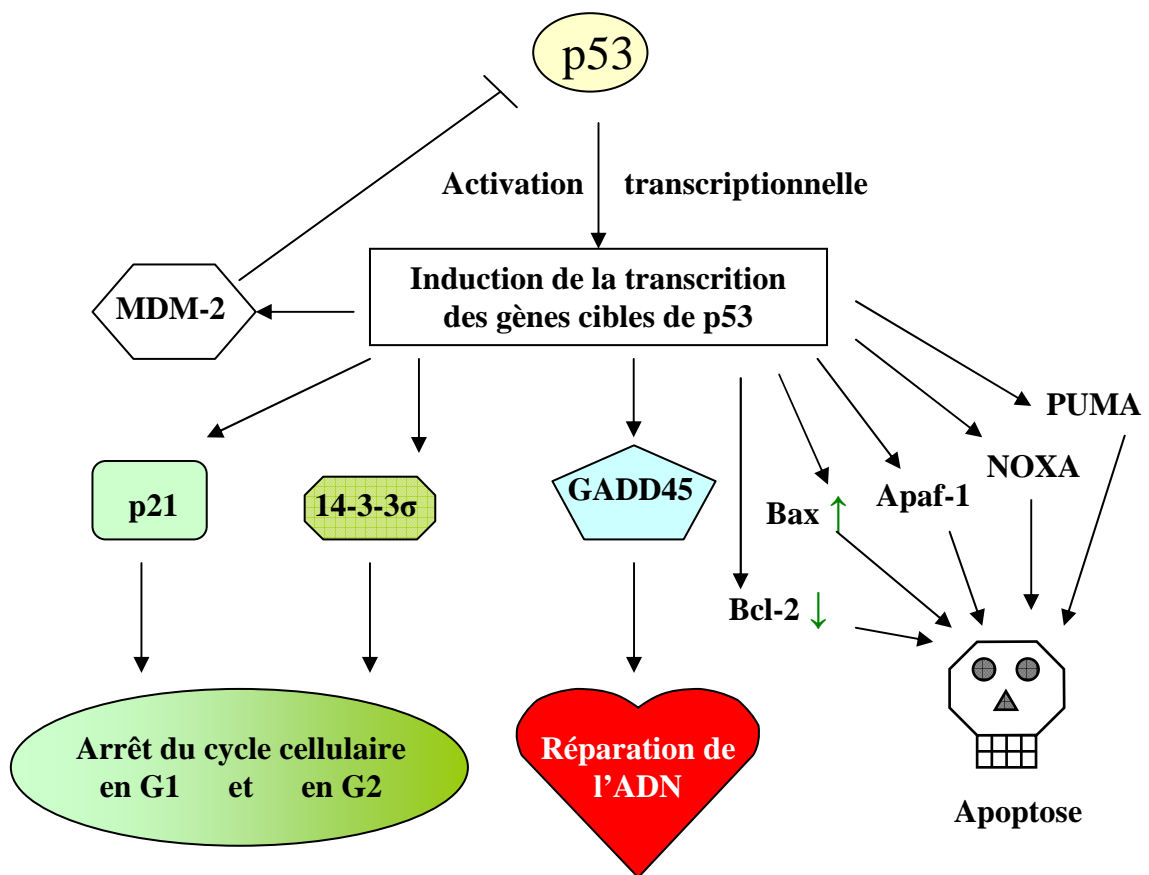
Il est à noter que les études décrivant les propriétés pro-apoptotiques de p21 sont encore peu nombreuses par rapport à celles décrivant p21 comme une molécule anti-apoptotique (Gartel & Tyner, 2002).

#### **IV.4.3.2.2. p53 et apoptose**

La protéine p53 régule une grande variété de gènes dont les produits protéiques sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose (Bargonetti & Manfredi, 2002) (Figure 37). Comme nous l'avons préalablement décrit, elle peut conduire à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par activation de la protéine p21, ou en phase G2 par le cofacteur 14-3-3 $\sigma$ .

La protéine p53 est aussi impliquée dans la réparation de l'ADN *via* GADD45.

Cette protéine p53 peut également réguler la transcription des gènes tels que Bax, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, TGF $\alpha$ , Fas, FasL, DR5, Apaf-1, NOXA (ou APR (ATL-derived PMA-responsive peptide)) (Oda *et al.*, 2000) et PUMA (P53-Upregulated Modulator of Apoptosis) (Nakano & Vousden, 2001), tous impliqués dans le processus apoptotique.



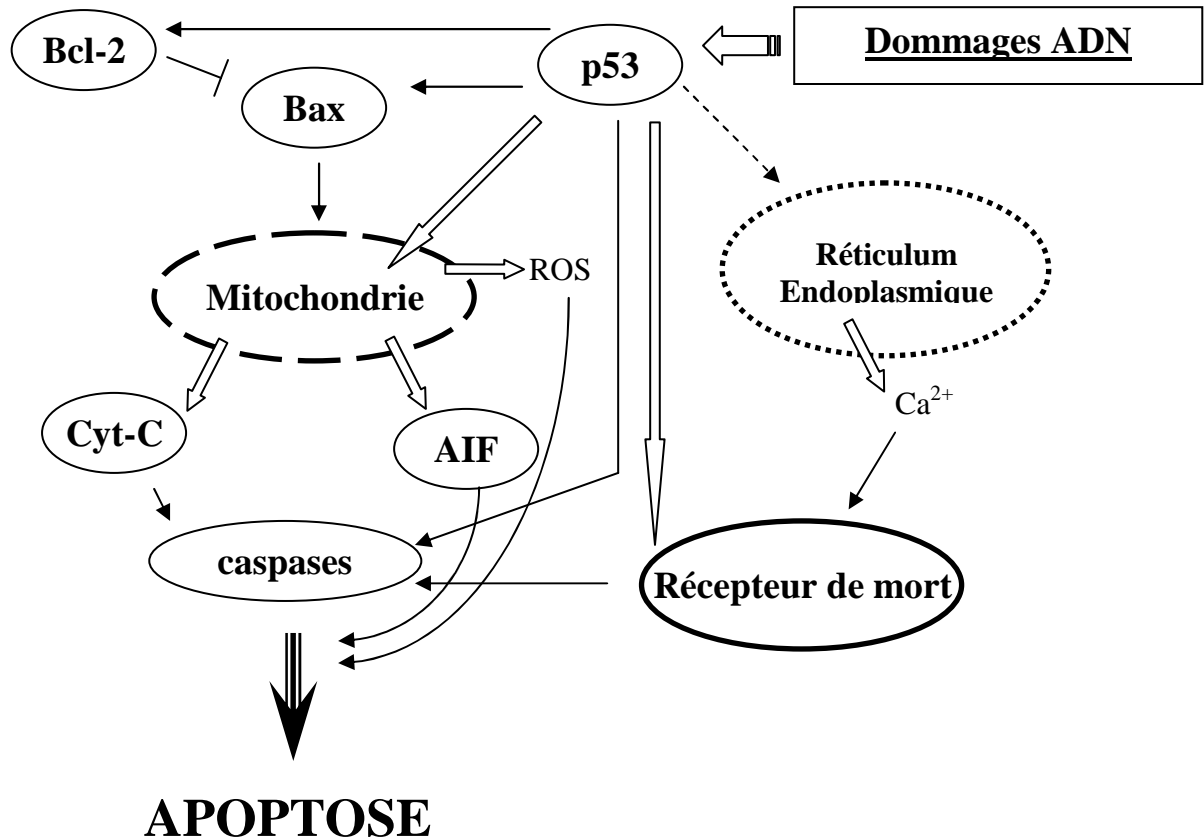
**Figure 37 :** Exemples de gènes régulés par p53

La protéine p53 possède des fonctions pro-apoptotiques indépendantes de sa fonction transcriptionnelle, comme le laisse penser sa relocalisation sur les récepteurs de mort à la surface de la cellule et son rôle direct sur la mitochondrie (Ryan *et al.*, 2001) ; toutefois, ces mécanismes d'action sont mal connus aujourd'hui.

L'induction de l'apoptose par p53 se fait *via* la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale :

- La protéine p53 pourrait provoquer la re-localisation de ces récepteurs à la surface des cellules (Bennett *et al.*, 1998) et agir ainsi sur la voie extrinsèque par régulation des gènes *Fas* (Owen-Schaub *et al.*, 1995) et *DR5* (Récepteur de mort) (Sheikh *et al.*, 1998) (Figure 32).
- La protéine p53 induit également l'apoptose en sur-régulant des gènes impliqués dans la voie mitochondriale. Elle sur-exprime Bax et sous-régulerait Bcl-2 (Miyashita *et al.*, 1994 ; Chipuk *et al.*, 2004) et aurait alors un rôle direct sur la mitochondrie (Marchenko *et al.*, 2000) où elle pourrait réguler la transcription des gènes par liaison directe avec l'extrémité 5' non transcrites des ARNm (Miller *et al.*, 2000) (Figure 38).





**Figure 38** : Représentation schématique des voies apoptotiques induites par p53

Il est à noter que la protéine p53 peut également induire l'apoptose en augmentant la production de radicaux libres (ROS) après s'être ancrée au niveau de la mitochondrie (Johnson *et al.*, 1996), ce qui précéderait la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-3 (Sansome *et al.*, 2001).

Le relargage du calcium du RE, induit par p53, pourrait sensibiliser la mitochondrie et initier l'activation de la voie apoptotique des récepteurs p53-dépendant (Breckenridge *et al.*, 2003) (Figure 38).

L'apoptose est un phénomène complexe aboutissant à la mort cellulaire. Pour y parvenir, ce processus emprunte plusieurs voies comme la voie extrinsèque des récepteurs de mort ou encore la voie intrinsèque mitochondriale. Nous étudierons ces voies au cours de l'apoptose induite par l'acide ursolique sur les deux lignées cellulaires de la peau HaCaT et M4Beu.

Nous allons au préalable décrire les différentes techniques utilisées au cours de cette étude.

# **MATERIEL & METHODES**

## **I. Acide Ursolique**

L'acide ursolique, conditionné sous forme de poudre blanche (Sigma, référence : U-6753), est conservé à 4°C.

Une solution mère d'acide ursolique est préparée à la concentration  $10^{-2}$  M dans du diméthylsulfoxyde stérile (DMSO, Sigma), puis stockée à température ambiante et à l'obscurité. Cette solution mère est utilisée pour la réalisation des différentes dilutions pour nos expérimentations.

## **II. Culture cellulaire**

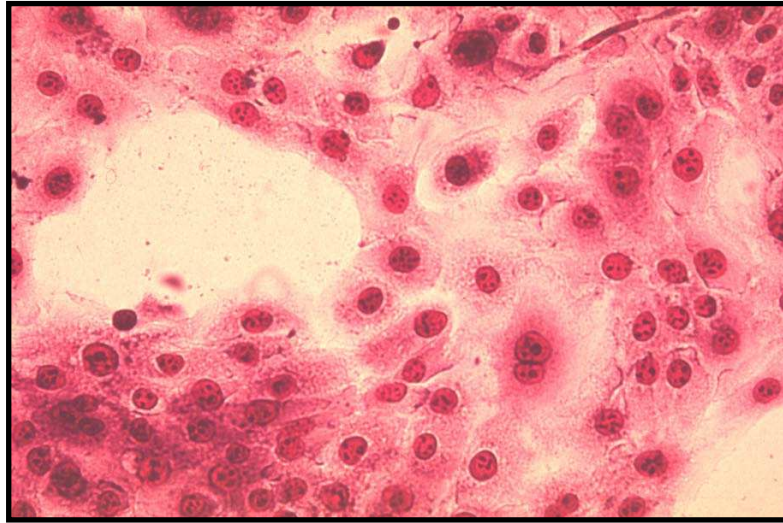
### **II.1. Lignées cellulaires**

Nous avons étudié les effets pro-apoptotique de l'acide ursolique sur deux types de cellules :

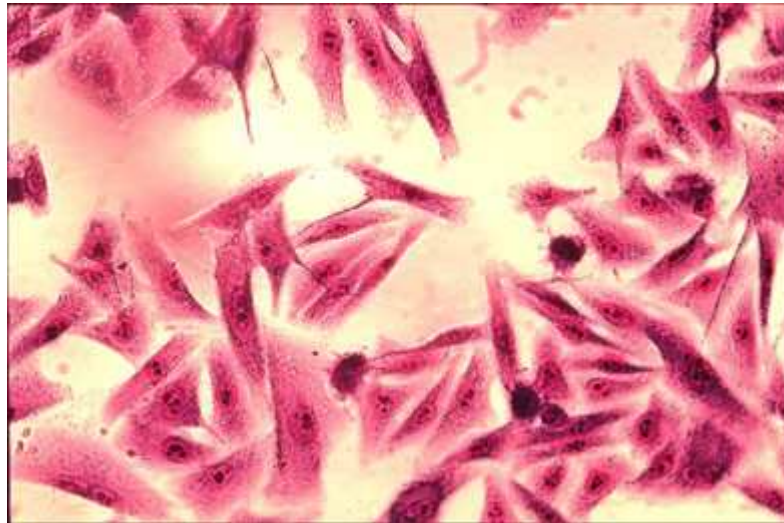
- les cellules HaCaT dérivées de kératinocytes humains ;
- les cellules M4Beu issues d'un mélanome humain.

#### **II.1.1. Lignée cellulaire HaCaT**

Les cellules HaCaT nous ont été fournies par le Professeur N.E. Fusenig (DKFZ, Heidelberg, Allemagne). Cette lignée cellulaire a été développée à partir de kératinocytes humains : ceux-ci ont été immortalisés après avoir été "cultivés" pendant plusieurs semaines à 38,5°C avec un milieu de culture appauvri en ions calcium. Ces cellules ont une morphologie de type kératinocyte de l'épiderme (Figure 39) et correspondent à un modèle de lignée cellulaire *in vitro* significatif pour étudier les cancers humains de la peau, sans être pour autant considérées comme carcinogène (Fusenig *et al.*, 1998).



**Figure 39** : Photographie de cellules HaCaT en culture.  
Coloration au Giemsa (noyau) et au May-Grünwald (cytoplasme).  
Grossissement x 400.



**Figure 40** : Photographie de cellules M4Beu en culture.  
Coloration au Giemsa (noyau) et au May-Grünwald (cytoplasme).  
Grossissement x 400.

### **II.1.2. Lignée cellulaire M4Beu**

Les cellules M4Beu nous ont été fournies par le Docteur J.C. Maurizis (INSERM UMR 484, Clermont-Ferrand, France). Ces cellules de l'épiderme sont issues d'une lignée cellulaire obtenue à partir d'une métastase ganglionnaire d'un mélanome humain. Elles sont de morphologie fibroblastique, et montrent une pigmentation cytoplasmique (Figure 40). Les cellules de la lignée M4Beu représentent un modèle de lignée maligne que nous pouvons qualifier de lignée cancéreuse (Dore *et al.*, 1987).

Bien que les lignées cellulaires HaCaT et M4Beu soient de structure, de taille et de morphologie différentes, elles présentent des analogies intéressantes pour nos expérimentations : elles se cultivent en monocouche et sont adhérentes. Leurs conditions d'entretien et leurs milieux de culture respectifs sont sensiblement identiques.

## **II.2. Conditions de culture des lignées cellulaires étudiées**

### **II.2.1. Matériel**

Les cultures cellulaires sont effectuées dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire (Flux France, France). Les boîtes de culture sont contrôlées quotidiennement sous un microscope inversé à contraste de phase (Nikon, France). Lors des manipulations, les pipettes et les cônes (Sarstedt, Allemagne) utilisés sont stériles et à usage unique. Les cultures et les différentes expérimentations sont effectuées dans des boîtes de culture (Sarstedt) de 80 cm<sup>2</sup>, et dans des plaques de 96 puits (Nunc, Danemark) ; elles sont placées dans un incubateur à 37°C, avec une atmosphère humide saturée en eau, et avec 5% de CO<sub>2</sub>.

### **II.2.2. Milieux de culture**

Pour faciliter leur prolifération, les cellules sont entretenues à l'aide d'un milieu de culture complet, spécifique de la lignée étudiée.

Pour la culture des cellules HaCaT, nous préparons un milieu complet constitué d'une solution Dulbecco's modified Eagle's medium, 25 mM HEPES (D-MEM, réf : 42430025, Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France).

Pour la culture des cellules M4Beu, nous préparons un milieu complet constitué d'une solution Eagle's minimum essential medium, 25 mM HEPES (MEM, réf : 32360026, Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France).

A chacun des deux milieux, sont ajoutés les mêmes constituants :

- 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco BRL) préalablement décomplémenté à 60°C pendant 30 minutes et contenant des facteurs de croissance,
- 1% d'acides aminés non essentiels (100X, Gibco BRL),
- 1% de L-glutamine (200 mM, Gibco BRL),
- 1% de vitamines (100X, Gibco BRL),
- 0,2% de pénicilline (100 U/ml, Gibco BRL),
- 0,2% de streptomycine (100 µg/ml, Gibco BRL).

Une fois réalisé, le milieu complet est stocké à 4°C.

### **II.2.3. Ensemencement cellulaire**

Les cellules des lignées HaCaT et M4Beu sont adhérentes et cultivées en monocouche dans des boîtes de culture de 80 cm<sup>2</sup> contenant 10 ml de milieu de complet. Ce milieu doit être renouvelé tous les deux jours, afin de permettre une meilleure prolifération et un bon développement cellulaire par assimilation des nutriments essentiels.

Les cellules sontensemencées avec une densité de  $1,5 \times 10^6$  de cellules par boîte de culture. Cette densité nous permet d'obtenir la confluence, c'est-à-dire un recouvrement total du support par les cellules en culture (ou tapis cellulaire), en trois ou quatre jours.

La viabilité cellulaire est contrôlée, lors de l'ensemencement, par un comptage des cellules vivantes à l'aide de la technique d'exclusion du bleu trypan, sur un hémocytomètre de Malassez.

### **II.2.4. Entretien cellulaire**

Quand les cellules sont à confluence, leur prolifération s'atténue et elles doivent être de nouveauensemencées dans de nouvelles boîtes de culture. Pour cela, il est nécessaire de les détacher de leur support :

- Le tapis cellulaire est « lavé » par une solution tampon PBS (\*) pour éliminer toute trace de milieu de culture.
- Une solution de HBSS-EDTA (\*\*) est ajoutée de façon à recouvrir le tapis cellulaire, pendant 1 minute. Cette solution "chélate" les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  indispensables à l'adhésion intercellulaire, et favorise ainsi le décollement des cellules.
- Puis, le surnageant HBSS-EDTA est retiré et remplacé par 2 ml de trypsine-EDTA 1X (\*\*\*) pour une boîte de culture de 80 cm<sup>2</sup>.

(\*) Solution tampon PBS : Phosphate Buffer Salin (PBS, pH 7.4, Gibco BRL)

(\*\*) Solution HBSS-EDTA : Hank's Balanced Salt solution – Ethylenediaminetetraacetic acid (50 mg EDTA (Sigma) dans 50 ml HBSS (Gibco BRL)

(\*\*\*) Solution Trypsine EDTA 1X : 0,5 g de trypsine porcine et de 0,2 g d'EDTA dans 100 ml de HBSS sans calcium et ni magnésium, Gibco BRL)

Une fois placées dans l'incubateur, les cellules se décollent après deux ou trois minutes de contact avec la trypsine. Elles sont alors comptées sur un hémocytomètre de Malassez par la méthode d'exclusion du bleu trypan. Par boîte de culture, un nombre exact de cellules est à nouveauensemencé avec du milieu complet, ou éventuellement congelées par cryogénéisation dans l'azote pour y être conservées.

Après ensemencement, une période de 24 heures est nécessaire aux cellules pour adhérer complètement sur le fond de la boîte de culture. Après cette période de 24 heures, le surnageant est retiré par aspiration, puis le milieu est renouvelé.

Pour l'ensemble des expérimentations, les cellules seront exposées à la drogue après cette période de 24 heures.

### **III. Techniques d'étude de la prolifération cellulaire**

L'activité antiproliférative de l'acide ursolique sur les lignées cellulaires HaCaT et M4Beu est évaluée par la technique d'exclusion du bleu trypan et par la technique du MTT.

#### **III.1. Technique d'exclusion du bleu trypan**

##### **III.1.1. Principe**

Pour évaluer l'activité antiproliférative de l'acide ursolique, nous avons utilisé la technique d'exclusion du bleu trypan. 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.

##### **III.1.2. Protocole opératoire**

Après décollement des cellules, une dilution de la suspension cellulaire est effectuée avec une solution de bleu trypan (0,2% dans du PBS). Après une homogénéisation au vortex de quelques secondes, la suspension cellulaire est disposée sur un hémocytomètre de Malassez ; les cellules vivantes, non colorées, sont comptées.

#### **III.2. Technique du MTT**

##### **III.2.1. Principe**

Pour évaluer l'activité antiproliférative de l'acide ursolique, nous avons également utilisé la technique du MTT.

Le MTT (bromure de 3-[4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium), ainsi que d'autres sels de tétrazolium, est un colorant pouvant être réduit à différents niveaux de la chaîne respiratoire (Slater *et al.*, 1963). Le MTT a été utilisé notamment pour visualiser et quantifier l'activité des lactate et malate déshydrogénases (Kellen & Krcmery, 1965 ; Laycock *et al.*, 1965), ainsi que l'activité de la succinate déshydrogénase (Schanenstein & Hoffer-Bergthaler, 1972). La réduction du MTT semble dépendre majoritairement de l'activité des



déshydrogénases mitochondriales (Mosmann, 1983), mais aussi des activités des déshydrogénases cytoplasmiques étroitement associées à la glycolyse (Vistica *et al.*, 1991). Ces caractéristiques ont été appliquées à l'étude de la prolifération cellulaire (Green *et al.*, 1984 ; Denizot & Lang, 1986 ; Gerlier & Thomasset 1986; Alley *et al.*, 1988). La réduction du MTT en formazan est habituellement analysée par colorimétrie dans des tests de cytotoxicité (Carmicheal *et al.*, 1987 ; Pieters *et al.*, 1991), en utilisant le protocole utilisé par Mosman en 1983.

La technique du MTT est basée sur la réduction des sels de tétrazolium de couleur jaune, en cristaux de formazan violets, principalement par les déshydrogénases mitochondriales actives : cette conversion se produit uniquement dans les cellules vivantes. Les cristaux formés sont solubilisés dans le sodium dodécyl sulfate (SDS) ; la solution colorée résultante est quantifiée au lecteur ELISA. La quantité de formazan formée, déterminée par absorbance à 550 nm, est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

### **III.2.2. Protocole opératoire**

Le MTT (5 mg/ml), préparé dans le tampon phosphate PBS ou dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) est stable à -20°C et à l'abri de la lumière. Il se conserve aussi à +4°C pendant un mois. La solution solubilisante à pH 7.4 (50 g de SDS dans 500 ml de PBS auquel est ajouté 445 µl de HCl à 0,01M) est stable à la température ambiante.

Lors des études de prolifération, les cellules sontensemencées dans des plaques stériles de 96 puits, avec une densité de 10<sup>4</sup> cellules et un volume final de 100 µl par puits. Après 24 heures d'incubation (durée nécessaire à l'adhérence cellulaire), le surnageant est retiré et différentes concentrations d'acide ursolique sont ajoutées. Les cellules sont laissées au contact de la drogue pendant 24 ou 48 heures, toujours dans les mêmes conditions environnementales (atmosphère humide, 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>). Au terme de chaque durée d'exposition, 10 µl de MTT sont ajoutés dans chaque puits et une première incubation de 4 heures est réalisée. Puis, 100 µl de SDS sont ajoutés dans chacun des puits avant une deuxième incubation de 4 heures. Une agitation est nécessaire pour compléter la solubilisation avant la quantification au lecteur ELISA (550 nm).

## **IV. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux (CMF)**

Nous avons utilisé cette technique pour déterminer quels étaient les effets de l'acide ursolique sur les différentes phases du cycle cellulaire lors de la prolifération des cellules HaCaT et M4Beu au cours des traitements par cette molécule.

### **IV.1. Principe**

La cytométrie de flux (CMF) est une technique d'analyse et de tri d'éléments individuels dans un flux liquide, au rythme de plusieurs centaines par seconde (Goldberg, 1980). Elle est adaptée à l'analyse *in situ* de plusieurs constituants cellulaires (acides nucléiques, lipides, protéines, etc...), et organites (lysosomes, mitochondries, etc...). Les paramètres étudiés sont quantifiés à partir des signaux émis par les organites isolés ou les cellules, après marquage à l'aide de molécules fluorescentes, en réponse à une excitation lumineuse.

Le contenu en ADN des cellules est un paramètre fréquemment étudié en CMF pour estimer la forme et la taille de la cellule. Les analyses mettent en jeu des molécules fluorescentes spécifiques, généralement intercalantes, qui se lient de façon stoechiométrique à l'ADN. Ces analyses permettent ainsi d'obtenir une relation linéaire entre l'intensité de fluorescence émise par la cellule et son contenu en ADN (Kerker, 1982). Cette analyse quantitative de l'ADN a largement contribué à la connaissance du cycle cellulaire : elle permet d'estimer au mieux la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle.

### **IV.2. Protocole opératoire**

#### **IV.2.1. Fixation des cellules**

Les cellules HaCaT et M4Beu sontensemencées selon le protocole décrit précédemment.

Au cours de la culture en présence d'acide ursolique, nous observons une proportion croissante de cellules qui se détachent du tapis cellulaire. Pour nos expérimentations, nous constituons un "pool" cellulaire regroupant les cellules du tapis et celles du surnageant. Les

cellules adhérentes sont décollées à l'aide de la trypsine et ajoutées aux cellules du surnageant, puis la suspension cellulaire est centrifugée à 1000 rpm pendant 10 minutes.

Après avoir enlevé le surnageant, le culot cellulaire est homogénéisé avec 3 ml de PBS froid et de nouveau centrifugé pendant 10 minutes. Dans les mêmes conditions, un second lavage est réalisé avec du PBS, ainsi qu'une deuxième centrifugation.

Après avoir enlevé le surnageant, le culot cellulaire est repris avec 300 µl de PBS, auquel sont ajoutés rapidement 700 µl d'éthanol (conservé à -20°C) afin de perméabiliser la membrane cellulaire et permettre ultérieurement l'incorporation de la Rnase, et de l'iodure de propidium comme marqueur.

Les échantillons sont stockés à une température de -20°C pendant 12 heures.

#### **IV.2.2. Marquage du contenu en ADN de la cellule**

Les échantillons cellulaires sont placés à température ambiante 10 minutes avant la manipulation. Ils sont ensuite centrifugés à 1000 rpm pendant 10 minutes afin de retirer le surnageant. A deux reprises, les cellules sont lavées avec du PBS et centrifugées. Les culots cellulaires obtenus sont repris dans 1 ml de PBS, auquel on ajoute 60 µl de RNase A (\*), afin d'éliminer les ARN et d'éviter toute interaction avec la molécule fluorescente employée. Les cellules sont incubées à température ambiante durant 20 à 30 minutes. Enfin, avant l'analyse en CMF, 50 µl d'iodure de propidium à 1 mg/ml (intercalant de l'ADN qui fluoresce dans le rouge, Molecular Probes, Pays-Bas) sont ajoutés à 1 ml de suspension cellulaire contenant environ  $10^6$  cellules.

(\*) RNase A : 25 mg (50 UI Kunitz, Roche Molecular, France) dans 2,5 ml de tampon Tris. Solution tampon Tris, à pH 7.6 : 0,12 g de Tris et 0,06 g de NaCl pour 10 ml d'eau stérile

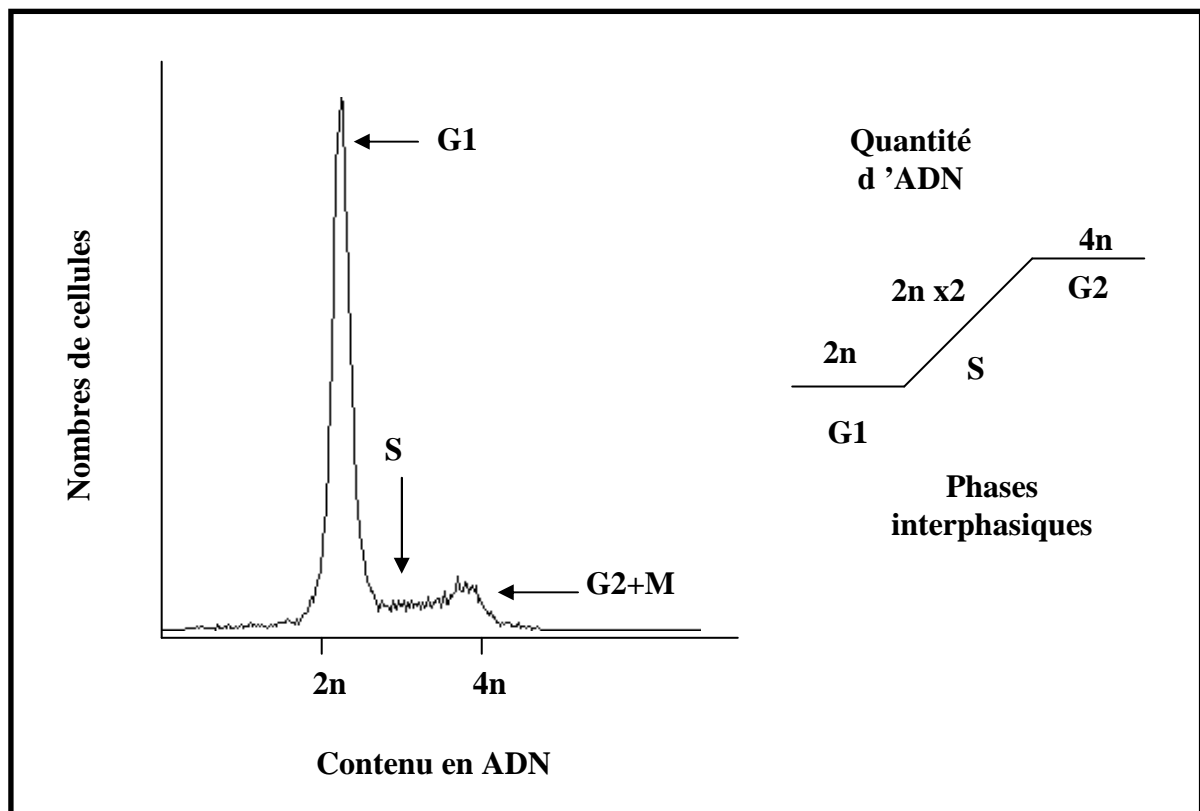
#### **IV.2.3. Analyse**

L'analyse par CMF est réalisée au service commun de cytométrie de l'Université de Limoges à l'aide d'un analyseur-trieur Facs Vantage (Becton-Dickinson, USA) équipé d'un laser argon émettant à 488 nm et du logiciel Cell Quest (Becton-Dickinson, USA).

Pour chaque échantillon, une analyse conditionnelle a été effectuée à l'aide d'un cytogramme FSC (Forward SCatter) versus SSC (Side SCatter), afin d'exclure les événements correspondants aux débris de petite taille et aux agrégats. Un minimum de  $2 \times 10^4$  cellules est

analysé par le logiciel Cell Quest (Becton-Dickinson, USA) en utilisant une amplification linéaire pour la fluorescence rouge émise par l'iodure de propidium. Cette dernière est recueillie à l'aide d'un filtre d'absorbance « passe-haut » de 600 nm (600 nm et au-delà). L'analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est réalisée par le logiciel ModFit LT (Verity Software House, Inc., USA), qui permet également l'exclusion des doublets cellulaires (ou cellules accolées) (Wersto *et al.*, 2001). Il est primordial d'éliminer ces derniers lors de l'analyse : un doublet de deux cellules en G1 serait comptabilisé en phase G2 ou M de part son contenu global en ADN, ce qui fausserait l'interprétation des résultats.

Les résultats de l'analyse du cycle cellulaire sont classiquement représentés comme indiqué sur la figure 41.



**Figure 41 :** Représentation théorique de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de leur contenu en ADN.

Abréviations :

G1 : phase "gap 1" ; S : phase de synthèse ; G2 : phase "gap 2" ; M : mitose

2n : quantité d'ADN dans la phase G1 ; 2n x2 : quantité d'ADN lors de la duplication en phase S ; 4n : quantité d'ADN doublée en phase G2.

## V. Etude de l'expression des ARN messagers par la technique de RétroTranscription - Réaction de Polymérisation en Chaîne (RT-PCR)

Sur des cellules HaCat et M4Beu traitées avec l'acide ursolique, nous avons utilisé la technique RT-PCR pour mettre en évidence l'expression des ARNm de différents gènes codant pour les protéines intervenant dans le cycle cellulaire et/ou dans l'apoptose.

### V.1. Principe

La Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ou RétroTranscription – Réaction de Polymérisation en Chaîne est une technique semi quantitative permettant de déterminer et d'analyser la quantité relative de transcrits ou acides ribonucléiques messagers (ARNm) dans les cellules étudiées. Cette technique RT-PCR est une alternative à la technique de clonage pour amplifier l'ADN. Effectivement, elle permet d'obtenir *in vitro*, par répliation successive d'une matrice double brin d'ADN, de multiples copies d'un petit fragment d'ADN, à partir du moment où l'on peut disposer d'oligonucléotides complémentaires de ses extrémités pouvant servir d'amorces pour la répliation.

La technique de RT-PCR peut se décomposer en quatre étapes : (i) l'extraction et le dosage des acides ribonucléiques totaux (ARN totaux) contenant les ARNm, (ii) la rétrotranscription de ces ARNm en acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc), (iii) la réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN en présence de polymérase, (iiii) la visualisation par électrophorèse de l'ADN amplifié.

- L'extraction et le dosage des ARN totaux se fait par séparation des ARN totaux des protéines et de l'ADN à l'aide d'agents spécifiques après la lyse cellulaire.

- La rétrotranscription (RT) permet de transcrire les ARNm en ADNc grâce à la transcriptase inverse ("reverse transcriptase"). Cette étape est essentielle à la technique de RT-PCR car la PCR ne peut se faire sans ADNc (Wang, 1989 ; Gilliland, 1990 ; Murphy, 1990). Une fois les ARNm obtenus, la reverse transcriptase catalyse la réaction de synthèse du brin d'ADNc à chaque molécule d'ARNm de l'extrait cellulaire. Cette enzyme utilise les quatre acides désoxyribonucléiques triphosphates ( $dNTP = dATP + dTTP + dCTP + dGTP$ ) pour former une chaîne d'ADNc à partir de la chaîne d'ARNm servant de matrice. Comme toutes les autres ADN polymérases, cette enzyme ne peut ajouter des dNTP qu'à l'extrémité 3'

d'une amorce déjà appariée à la matrice. L'amorce oligo-dT ou poly-dT est une amorce possédant une longue série de nucléotides thymine qui va s'hybrider à la queue poly-A 3' des matrices d'ARNm. Cette queue poly-A 3' est une série de nucléotides adénines où se lient les thymines de l'amorce poly-dT en formant ainsi des doubles liaisons covalentes.

- La PCR, mise au point en 1985 par Saiki *et al*, est basée sur la répétition de cycle de réplication d'ADN, *in vitro*, à partir d'amorces spécifiques et permet d'obtenir de multiples copies d'un petit fragment d'ADN. Le principe en est le suivant : la réaction PCR nécessite l'ADN cible (sous forme d'ADNc obtenu par RT) auquel sont ajoutées deux amorces constituées d'oligonucléotides synthétiques complémentaires des extrémités 3' des brins de ce fragment d'ADNc à amplifier. Une fois hybridés sur ces extrémités 3' des brins d'ADNc, ces oligonucléotides servent d'amorces à la synthèse de la chaîne d'ADN qui s'enclenche par l'ajout des quatre désoxyribonucléotides triphosphates ; ils forment le nouveau brin d'ADN à l'aide d'une ADN polymérase thermostable (ex : la polymérase Taq est extraite de la bactérie abyssale *Thermus aquaticus*). Cette Taq polymérase allonge les amorces à une température optimum de 72°C. Une fois la synthèse terminée, la température est élevée à 95°C afin de dénaturer les duplex d'ADN néoformés. Puis, la température est abaissée et la synthèse d'ADN repart pour un nouveau cycle. Les cycles sont courts, de l'ordre de quelques minutes, comportant des séquences de dénaturation de l'ADN, d'hybridation des amorces et d'élongation de l'ADN à partir des amorces. Nous obtenons ainsi à chaque cycle la synthèse d'une copie de chaque molécule d'ADN correspondant à la séquence comprise entre les deux amorces. La production est donc en principe exponentielle, et en n cycles,  $2^n$  copies d'une molécule sont obtenues. Après 30 cycles, l'ADN original est amplifié un milliard de fois en moins de deux heures. La plus grande majorité des produits est identique du fait que l'ADN amplifié correspond à celui qui est situé entre les sites de liaison des deux amorces et ne s'étend pas au-delà des sites. En réalité, le rendement n'est pas de 100% et le nombre de copies à rendement constant R n'est que de  $(1+R)^n$ .

- La migration par électrophorèse permet de visualiser l'ADN sur gel d'agarose. Elle se fait à l'aide d'un tampon de charge permettant la sédimentation des bandes. Ce tampon de couleur bleue, évite le refoulement de l'ADN dans la solution de migration et permet d'observer la migration sous l'influence d'un champ électrique.

## **V.2. Protocole opératoire**

Le protocole suivant est destiné à l'étude de l'expression des ARNm à partir d'un pool cellulaire de 5 à  $10 \cdot 10^6$  de cellules. Au cours de la culture en présence d'acide ursolique, nous observons une proportion croissante de cellules qui se détachent du tapis cellulaire. Pour chaque point expérimental, nous constituons un pool cellulaire regroupant les cellules du tapis cellulaire décollées à l'aide de trypsine et les cellules du surnageant. Les suspensions cellulaires sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes et les différents culots cellulaires obtenus sont congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

### **V.2.1. Extraction et dosage des ARN totaux au TRIzol**

Avant de procéder aux étapes de RT-PCR, il faut extraire, puis doser les acides ribonucléiques totaux (ARN totaux) contenant les ARNm nécessaires à l'étape de RT.

#### **V.2.1.1. Principe d'extraction**

Les ARN totaux se composent d'ARN messager (ARNm), d'ARN de transfert (ARNt) et d'ARN ribosomiaux (ARNr). Seuls les ARNm sont nécessaires pour réaliser la RT, mais ils ne peuvent être séparés des ARNt et des ARNr au cours de cette technique d'extraction ; les ARNm (représentant 1% des ARN totaux) sont donc extraits en même temps que les deux autres fractions d'ARN totaux.

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide du TRIzol® Reagent (Gibco BRL). Ce réactif est composé d'une solution monophasique de phénol de guanidine isothiocyanate et d'eau selon la méthode développée en 1987 par Chomczynski et Sacchi. Le TRIzol® permet de lyser les membranes cytoplasmiques et de dissocier les complexes nucléoprotéiques. Il a pour fonction avec l'aide du chloroforme, d'extraire les ARN totaux en les séparant des autres constituants principaux de la cellule. Effectivement, le mélange TRIzol® - chloroforme forme deux phases : l'une aqueuse comprenant les ARN totaux et l'autre organique (chloroforme et phénol) comprenant les protéines cellulaires et l'ADN. Ces deux phases sont séparées par une fine membrane de protéines phospholipidiques provenant de la membrane cytoplasmique et des membranes des organites cellulaires.

### V.2.1.2. Technique d'extraction

Le culot cellulaire de chaque échantillon est homogénéisé avec 1 ml de TRIzol® durant 5 minutes à température ambiante pour permettre la lyse cellulaire et une complète dissociation des complexes nucléoprotéiques. Puis on ajoute 200 µl de chloroforme et on homogénéise au vortex avant de centrifuger 15 minutes à 12000 rpm (4°C). Cette opération sépare la phase chloro-phénolique inférieure contenant l'ADN et les protéines, de la phase aqueuse supérieure contenant les ARN totaux. Ces derniers sont ensuite précipités en mélangeant la phase aqueuse à 500 µl d'isopropanol (10 minutes à température ambiante). Le culot d'ARN totaux est récupéré par centrifugation (10 minutes à 12000 rpm à 4°C), lavé avec de l'éthanol à 75% pour enlever toute trace d'isopropanol, séché sous vide, et homogénéisé dans 30 à 40 µl (selon la taille du culot) d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC ou Nuclease Free Water : eau bi-distillée stérile permettant l'inhibition des RNases et protégeant ainsi les ARN totaux). Enfin, les ARN totaux sont incubés durant 10 minutes à 55-60°C dans un thermocycleur (Tpersonal Biometra, Biolabo, Archamps, France) afin de dénaturer les appariements des ARN totaux.

### V.2.1.3. Dosage des ARN totaux

Pour déterminer le volume d'extraction contenant 2 µg d'ARN totaux nécessaire à la RT, les ARN totaux sont dosés par spectrophotométrie UV à 260 et à 280 nm d'absorbance (Abs). Le rapport Abs 260 / Abs 280 donne un ratio exprimant la pureté des ARN totaux (1,85 équivaut à une pureté des ARN totaux proche de 100%, alors que 1,55 indique la présence de protéines et donc une pureté des ARN totaux critiquable).

La concentration en ARN totaux (µg/µl) est calculée selon la formule suivante avec un facteur de dilution de 1/250<sup>ème</sup> et 40 µg/µl correspond au coefficient d'extinction molaire des ARN.

$$[\text{ARN totaux}] = \left( \frac{\text{Abs}_{260} \times \text{dilution} \times 40}{1000} \right) \text{ en } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Les ARN totaux étant très fragiles, la qualité de ceux-ci est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2%. Les échantillons d'ARN sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.



### V.2.2. Transcription inversée ou Rétrotranscription (RT)

La RT est réalisée à l'aide du kit « Omniscript kit™ RT Kit » (Qiagen, France) et à partir des ARNm provenant des échantillons cellulaires. La séparation des ARNm des ARN de transfert et ribosomaux étant impossible, le volume d'ARNm prélevé pour réaliser la RT correspond en réalité au volume des ARN totaux.

Le mélange suivant est préparé pour chaque tube (n+1 tubes) :

10X Buffer RT (ou tampon de transcription)	2 µl
dNTP (5 mM)	2 µl
Oligo-dT primer (10µM) / (0,5µg/µl) ou Amorce poly-dT	1 µl
Inhibiteur de RNase (10 unités/µl) ou RNase OUT	1 µl
Omniscript kit™ Reverse Transcriptase	1 µl

Deux microgrammes des ARN totaux de chaque échantillon sont incubés avec ce mélange, et chaque tube est complété avec de l'eau traitée au DEPC pour obtenir un volume final de 20 µl par tube. Pour activer la RT, les tubes sont incubés dans un thermocycleur à 37°C durant une heure. Au cours de cette rétrotranscription, l'inhibiteur de RNase (ou RNase OUT) protège les ARNm fragiles des RNases, afin qu'ils puissent être rétrotranscrits en ADNc plusieurs fois, sans être abîmés par ces enzymes. Quand la RT est réalisée, les ARN totaux restants sont détruits par un chauffage de 93°C durant 5 minutes. Cette dernière opération permet d'obtenir uniquement l'ADNc, contenu dans le volume final (20 µl) qui sera stocké à -20°C.

### V.2.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Afin de détecter l'expression des ARNm (p53, p21, bax, bcl-2) des cellules traitées avec différentes concentrations d'acide ursolique, il a fallu déterminer le choix des amorces en fonction de leur position sur la séquence correspondante de l'ADNc recherché. Pour cela, la recherche est faite grâce à la banque de données GenBank sur le site NCBI. C'est ainsi que nous avons pu déterminer la taille, la température d'hybridation (T<sub>m</sub>), et le nombre de cycles

de PCR nécessaires pour chaque amorce. Ces cycles réalisés dans un thermocycleur comportent 3 phases :

- une dénaturation des brins d'ADN par la chaleur,
- une hybridation spécifique des extrémités par les deux amorces complémentaires,
- une synthèse des brins d'ADNc ou élongation de l'ADN par la Taq Polymérase.

Le tableau 6 regroupe les positions des amorces sur la séquence correspondante de l'ADNc recherché (N° d'accèsion à la banque de gènes NCBI) et la taille des fragments de PCR.

ADN	N°d'accèsion (« GenBank, NCBI »)	Position de l'oligonucléotide5'	Position de l'oligonucléotide3'	Taille du produit de PCR (pb)
caspase-1	4502572	252-275	688-711	460
caspase-3	475911	68-69	499-521	454
caspase-8	15718703	651-671	879-899	249
caspase-9	AB020979	378-400	676-695	318
$\beta$ -actine	XM_00414	590-611	1132-1158	569
p53	AH002918	129-151	609-632	504
p21 <sup>WAF1/Cip1</sup>	AF265443	430-454	849-873	444
Bax	L22473	90-110	541-563	474
Bcl-2	M14745	1386-1405	1829-1848	463

**Tableau 6 :** Oligonucléotides et taille des fragments de PCR (pb : paire de bases)

Le tableau 7 présente le nombre de cycles utilisés pour la PCR et les températures d'hybridation (T<sub>m</sub>) correspondant aux amorces spécifiques de chaque ADNc.

ADN	Nombre de cycles de PCR	Tm (°C) des oligonucléotides spécifiques
caspase-1	30	64
caspase-3	30	61
caspase-8	33	57,8
caspase-9	33	59
β-actine	27	58,3
p53	30	61
p21 <sup>WAF1/Cip1</sup>	30	63
Bax	40	66
Bcl-2	40	58

**Tableau 7 :** Caractéristiques de chaque PCR (Tm : Melting temperature)

La PCR est réalisée à l'aide du kit « HotStarTaq DNA Polymerase Mix kit » (Qiagen) et à partir des ADNc provenant de la RT.

Le mélange suivant est préparé pour chaque tube (n+1 tubes) :

10X Buffer PCR (ou tampon d'amplification)	30	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)		1,5 µl
dNTP Mix (10 mM)		1 µl
Amorce 5' (20 µM) (ou Primer Direct)		1 µl
Amorce 3' (20 µM) (ou Primer Reverse)		1 µl
HotStarTaq ADN Polymérase		0,25 µl
Eau distillée et stérile		38,25 µl
	Volume total	48,00 µl
Produit de RT (20 µl) ou ADNc		2 µl
	Volume final	50 µl

Deux microlitres d'ADNc de chaque échantillon sont incubés avec ce mélange pour obtenir un volume final de 50 µl. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur et l'amplification des ADNc a lieu dans les conditions suivantes :

•Couvercle du thermocycleur à 100°C			- Chaleur autour de l'échantillon
•95°C 15 minutes	1 cycle		- Scission de la Taq et de son anticorps = Activation de la Taq
•94°C 45 secondes	} Y cycles		- Dénaturation de l'ADN
•X °C 45 secondes			- Hybridation des amorces
•72°C 60 secondes			- Elongation de l'ADN par la Taq
•72°C 10 minutes	1 cycle		- Formation des terminaisons de l'ADN
•4°C 10 minutes			- Maintien en stase des ADN amplifiés

Remarque : X °C correspond à la température de fusion ou d'hybridation suivant l'amorce choisie. Effectivement la température d'hybridation, déterminée selon la formule de Suggs [ $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$ ] (<http://www.gazettelabo.tm.fr/2002archives/1996/6PCR.htm>), est dépendante des quatre bases composant l'ADN.

Y cycles correspond au nombre de cycles obligatoires pour amplifier l'ADN en fonction de l'amorce choisie.

#### V.2.4. Visualisation de l'ADN par électrophorèse

Les ADN (produits de PCR) sont visualisés et analysés après électrophorèse sur gel d'agarose (Gibco) entre 1,2% et 1,5% dans une solution tampon TAE 0,5X (\*) et contenant du bromure d'éthidium (BET, Sigma) qui est un intercalant de l'ADN. Un tampon de charge (ou Gel Loading Solution) de haut poids moléculaire de couleur bleu est ajouté aux ADN qui sont déposés dans les puits du gel préalablement préparés à l'aide d'un peigne. Le tampon de charge permet la sédimentation des bandes, évitant ainsi le refoulement des ADN lors de leur dépôt sur le gel dans la solution tampon TAE ; il permet aussi, par sa coloration, de suivre la migration des bandes dans la cuve à électrophorèse. Puis ces bandes sont placées sous lampe UVB (312 nm), où le BET fluoresce et permet de localiser les ADN sur le gel révélant l'amplification PCR. La détermination de l'intensité relative de chaque bande (par le logiciel "Kodak 1 D Image Analysis Software") permet de calculer la taille et le poids moléculaire des échantillons à partir d'un contrôle standard (Low DNA Ladder, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Puis les tailles et poids de chacun d'eux sont ensuite comparés à ceux théoriquement attendus (Tableau 1).

(\*) Solution tampon TAE 0,5X (ou Tris-Acétate-EDTA 0,5X), pH 7.4 : Tris-HCl 10 mM ; Acétate de sodium anhydre 1 mM ; EDTA 1 mM ; Sigma)

## **VI. Etude *in situ* de l'expression des protéines par la technique d'immunofluorescence indirecte**

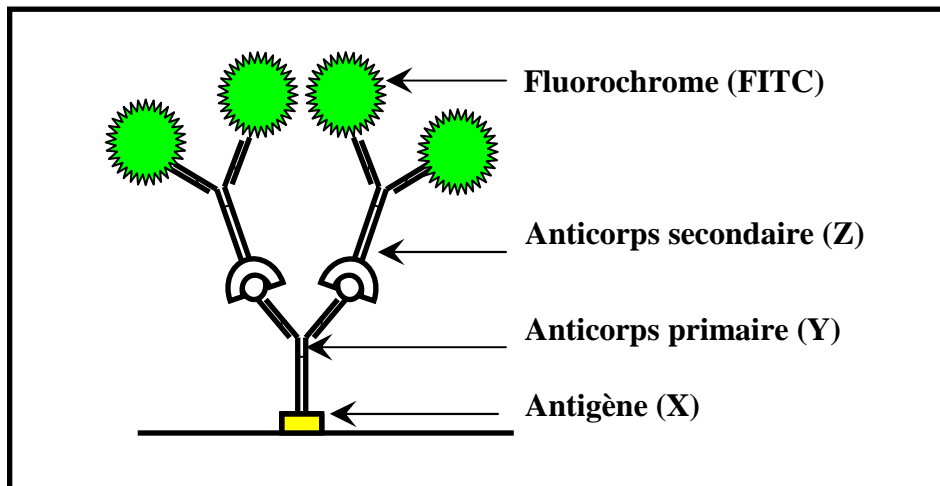
Afin d'étudier l'expression *in situ* des protéines (p53 phosphorylé, p21, Bax, Bcl-2, cytochrome c, AIF) liées au cycle cellulaire et/ou au processus apoptotique après traitement des cellules avec l'acide ursolique, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte.

Cette dernière consiste à un marquage de l'antigène étudié par un anticorps primaire, qui sera lui même marqué à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (la fluorescéine isothiocyanate ou FITC de fluorescence verte). Ce double marquage permet d'amplifier le signal de fluorescence.

Cette technique nous permet de visualiser qualitativement l'expression *in situ* des protéines étudiées.

### **VI.1. Principe**

La préparation comportant la protéine (antigène) à mettre en évidence est plongée dans une solution contenant l'anticorps dit primaire. Ce dernier reconnaît l'épitope de l'antigène (ou site de fixation de l'anticorps sur l'antigène) et s'y fixe de façon spécifique. Après rinçage, l'excès d'anticorps est évacué, et il ne reste que le complexe antigène-anticorps. Cet anticorps primaire n'étant pas porteur du marqueur de fluorescence, un anticorps dit secondaire, couplé au fluorochrome FITC, est ajouté. Ce dernier se fixera sur l'anticorps primaire qui se comportera comme un antigène pour le secondaire (Figure 42). Sachant que l'anticorps primaire Y (anticorps anti-antigène X) est produit dans un animal Y et que l'anticorps secondaire Z (anti-anticorps Y) est produit dans un animal Z, l'anticorps primaire se comporte comme un antigène pour l'anticorps secondaire.



**Figure 42 :** Marquage d'un antigène par immunofluorescence indirecte.

## VI.2. Protocole opératoire

L'ensemencement des cellules HaCat et M4Beu s'effectue dans des lames avec 8 puits démontables (Lab-Tek chamber slide I, Nunc) selon le protocole de culture cellulaire préalablement décrit, avec une densité cellulaire de  $2,5 \times 10^4$  cellules et 300  $\mu$ l de milieu complet par puits.

Les étapes suivantes sont identiques pour tous les anticorps utilisés au cours de cette étude (Tableau 8 et 9).

NB : Pour réaliser le marquage immunofluorescent indirect avec l'anticorps anti-p53 phosphorylé, toutes les solutions de chaque étape du protocole sont réalisées avec du TBS (Tris-Buffered Salt) à la place du PBS, afin d'éliminer toute présence de phosphate extra-cellulaire.

### V.2.1. Fixation des cellules

Les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (PAF) à 4% dans du PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Puis elles sont rincées 3 fois avec du PBS durant 5 minutes. La fixation des cellules permet de travailler sur un support fixe et immuable.

### **V.2.2. Perméabilisation des cellules**

Une fois les cellules fixées au support, elles sont perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0,1% sodium-citrate-0,1% triton X100, pendant 20 minutes à température ambiante. La perméabilisation des cellules au triton facilitera l'entrée des anticorps dans la cellule. La solution de sodium-citrate permet une perméabilisation douce qui n'entraîne pas la lyse totale des cellules comme cela pourrait être le cas avec l'utilisation du triton, même dilué.

### **V.2.3. Blocage des sites antigéniques des protéines**

Après lavage avec du PBS, les cellules sont incubées avec une solution de blocage PBS-0,1% de sérum d'albumine bovine (BSA, Sigma) pendant 45 minutes à température ambiante. La solution de 0,1% BSA permet une saturation des sites antigéniques ou épitopes des protéines de la cellule.

### **V.2.4. Immunomarquage avec anticorps primaire**

Les cellules adhérentes à leur support sont incubées avec l'anticorps primaire (p21, p53 phosphorylé, Bax, Bcl-2, cytochrome c, AIF) dilué dans une solution de PBS-0,1% BSA, durant 12 heures à une température de 4 °C (Tableau 8).

### **V.2.5. Immunomarquage avec anticorps secondaire**

Après trois rinçages du tapis cellulaire avec du PBS sous agitation, l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome FITC, est dilué avec du PBS-0,1% BSA puis mis en présence des cellules durant 90 minutes à 37 °C et à l'obscurité (Tableau 9).

### **V.2.6. Observation au microscope à fluorescence**

Après deux lavages des cellules avec du PBS, les puits sont démontés et une lamelle est déposée sur le support. Les cellules sont observées au microscope à fluorescence (Leica, France).

<b>Anticorps primaires dirigés contre</b>	<b>Produit chez</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution/temps d'incubation</b>
Anti-Apoptosis-Inducing Factor (AIF), humain A-7549, Lot # 90K4813	Lapin	SIGMA	1/500 dans PBS-0,1% BSA, 12 heures à 4 °C
Anti-Bax (B-9) sc-7480, Lot # A2903	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/200 dans PBS-0,1% BSA, 12 heures à 4°C
Anti-Bcl-2 (100) sc-509, Lot # K1402	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/200 dans PBS-0,1% BSA, 12 heures à 4°C
Anti-p21 (187) sc-817, Lot # H092	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/500 dans PBS-0,1% BSA, 12 heures à 4°C
Monoclonal antibody to cytochrome c mouton	Souris	ALEXIS BIOCHEMICALS	1/500 dans PBS-0,1% BSA, 12 heures à 4°C
Anti-p53, Phospho-Specific, humain	Souris	CALBIOCHEM	1/200 dans TBS-0,1% BSA, 12 heures à 4°C

**Tableau 8:** Conditions d'utilisation des anticorps primaires en immunomarquage par fluorescence indirecte

<b>Anticorps secondaire dirigés contre</b>	<b>Produit chez</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution/temps d'incubation</b>
Anti-souris couplé à la fluoresceine	Lapin	VALBIOTECH	1/500 dans PBS-0,1% BSA durant 90 minutes à 37°C
Anti- lapin couplé à la fluoresceine	Souris	VALBIOTECH	1/500 dans PBS-0,1% BSA durant 90 minutes à 37°C

**Tableau 9:** Conditions d'utilisation des anticorps secondaires en immunomarquage par fluorescence indirecte



## **VII. Etude de l'expression des protéines par la technique de "Western Blot"**

Nous utilisons la technique de Western Blot afin de caractériser la présence et de quantifier l'expression des protéines étudiées (AIF, Bax, Bcl-2, p21, p53,  $\beta$ -Actine) après traitement des cellules HaCat et M4Beu avec l'acide ursolique.

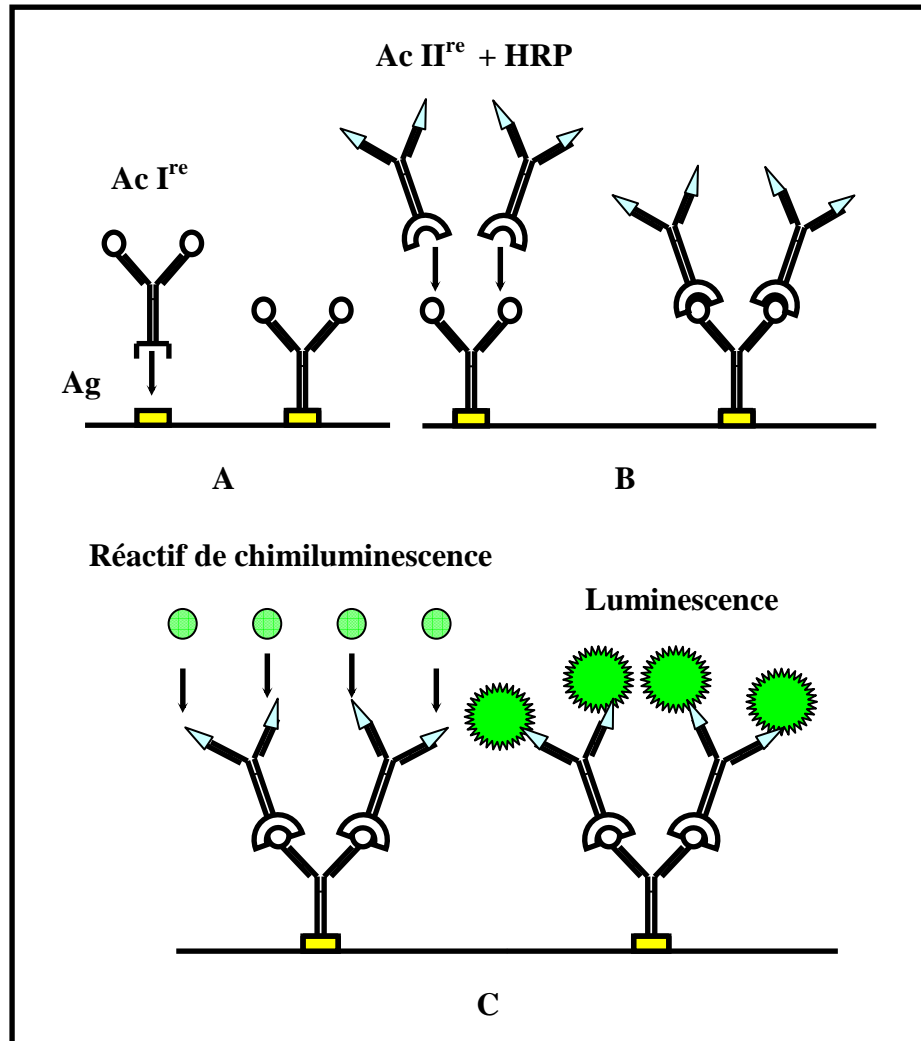
### **VII.1. Principe**

Le Western Blot est une technique permettant d'analyser l'expression des protéines cellulaires.

Pour cela, les étapes suivantes sont réalisées :

- Lyse et extraction des protéines.
- Dosage des protéines par la technique de Bradford.
- Dénaturation des protéines en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS).
- Migration des protéines sur gel polyacrylamide.
- Transfert sur membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) ou sur membrane de nitrocellulose.
- Marquage immunocytochimique
  - Marquage par l'anticorps primaire
  - Marquage par l'anticorps secondaire
- Révélation par réaction de chimiluminescence.

Une représentation schématique des deux dernières étapes est décrite sur la figure 43.



**Figure 43 :** Schéma de la technique d'immunomarquage par chimiluminescence.

A- Reconnaissance de l'antigène (Ag) par l'anticorps primaire (Ac I<sup>re</sup>) et fixation

B- Reconnaissance de l'Ac I<sup>re</sup> par l'anticorps secondaire (Ac II<sup>re</sup>) et fixation

C- Reconnaissance du réactif de chimiluminescence par l'enzyme portée sur l'Ac II<sup>re</sup> et fixation engendrant la luminescence

## **VII.2. Protocole opératoire**

Les cellules HaCat et M4Beu sontensemencées selon le protocole de culture cellulaire décrit précédemment :  $1,5 \times 10^6$  cellules sontensemencées dans une boîte de culture de 80 cm<sup>2</sup> contenant 10 ml de milieu de culture complet. Nous constituons un "pool" cellulaire regroupant les cellules du surnageant et les cellules du tapis cellulaire.

Les suspensions cellulaires sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes.

### **VII.2.1. Lyse et extraction des protéines totales**

Les cellules, sous formes de culot, sont lysées et les protéines extraites sont protégées par un inhibiteur de protéases. Les culots cellulaires contenant  $5 \times 10^6$  de cellules sont traités par 500 µl de solution tampon RIPA à pH 7.5 (\*) afin de lyser les cellules et d'isoler les protéines. Cette solution est additionnée d'un mélange d'inhibiteur de protéases (200 µl/ml Protease Cocktail Inhibitor, Sigma). Puis ce mélange est incubé 10 minutes sur la glace, et centrifugé à 12000 rpm à 4°C pendant 20 minutes. Le surnageant contenant les protéines est récupéré pour que ces dernières soient dosées.

(\*) Solution tampon RIPA : HEPES 50 mM, déoxycholate 1%, nonidet P40 1%, SDS 0,1%, NaCl 150 mM, aprotinine 20 µg/ml

### **VII.2.2. Dosage protéique de l'extrait cellulaire**

La concentration protéique du lysat cellulaire est déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad's protein assay, Bio-Rad, 1976). Pour chaque échantillon, 5 µl de surnageant issus de l'extraction sont ajoutés à 5 ml du mélange réactionnel de Bradford (1 ml de réactif de Bradford + 4 ml d'eau distillée stérile). Les différents tubes sont mis à incuber pendant 5 minutes sur la glace. L'absorbance du mélange est lue à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/Vis, V-560, Ubest). Préalablement au dosage, une gamme étalon est établie avec différentes dilutions d'une solution d'albumine de sérum de veau (BSA).

### VII.2.3. Préparation et dénaturation des échantillons protéiques

Cette étape entraîne la dénaturation des structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines par le SDS et permet la fixation de ce dernier sur celles-ci pour les charger négativement.

La quantité de protéines déposée sur le gel de polyacrylamide peut varier de 10 à 40 µg. Chaque extrait cellulaire est mélangé volume à volume avec un tampon de charge (\*). Les échantillons sont portés à 100°C pendant 5 minutes pour permettre la dénaturation des protéines.

(\*) Tampon de charge 2X, pH 6.8 : Tris-HCl 50 mM, β-mercaptoéthanol 100 mM, SDS 2%, bleu de bromophénol 0,1%, glycérol 10%.

### VII.2.4. Electrophorèse : migration des protéines sur gel polyacrylamide

Les protéines sont séparées par migration en SDS-PAGE "Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis". La concentration du gel en acrylamide / bisacrylamide varie de 10 à 15 % en fonction du poids moléculaire des protéines à analyser. Après le dépôt des échantillons et du marqueur de poids moléculaire (Figure 44A), la migration s'effectue à voltage constant (90 Volts) pendant 2 heures dans un tampon de migration (\*\*). (Figure 44B).

(\*\*) Tampon de migration, pH 8.3 : Tris-HCl 25 mM, glycine 250 mM, SDS 0,1%.

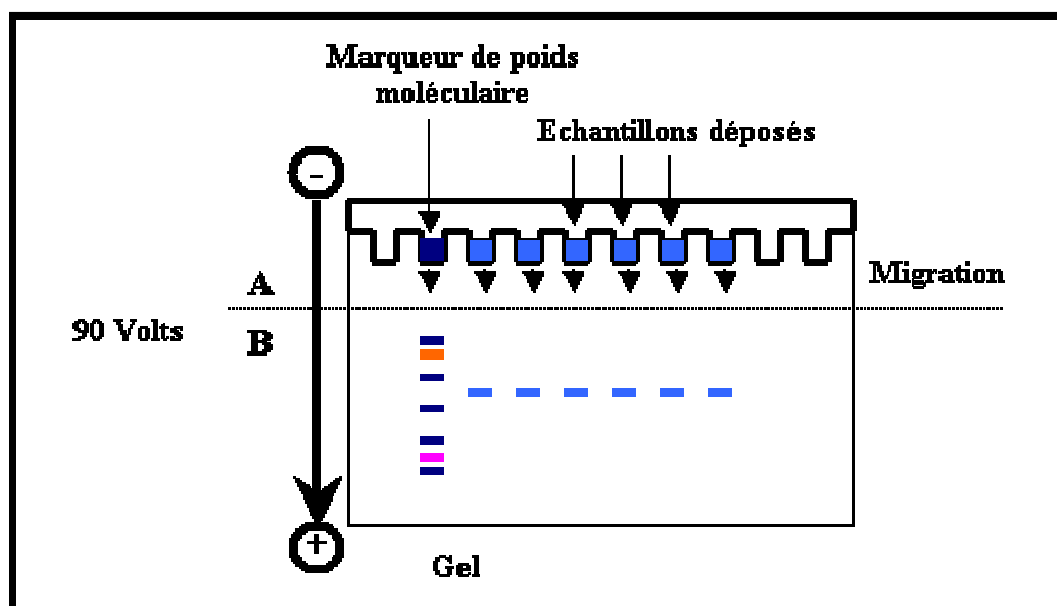
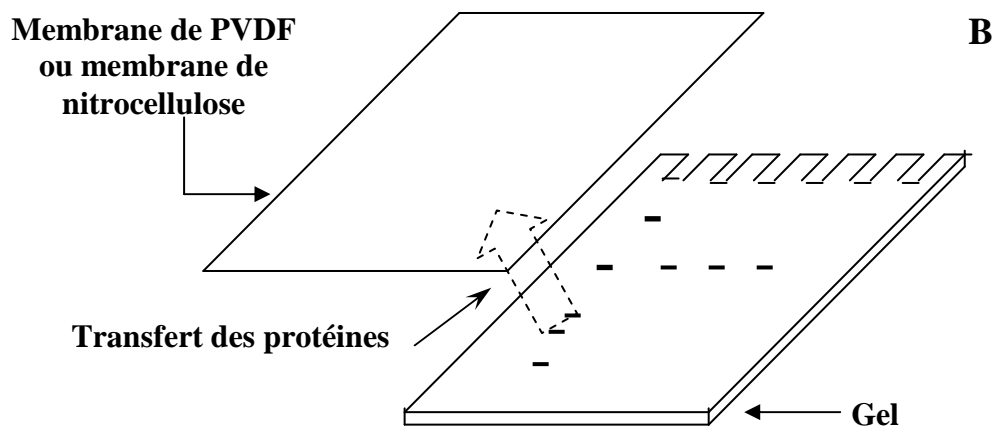
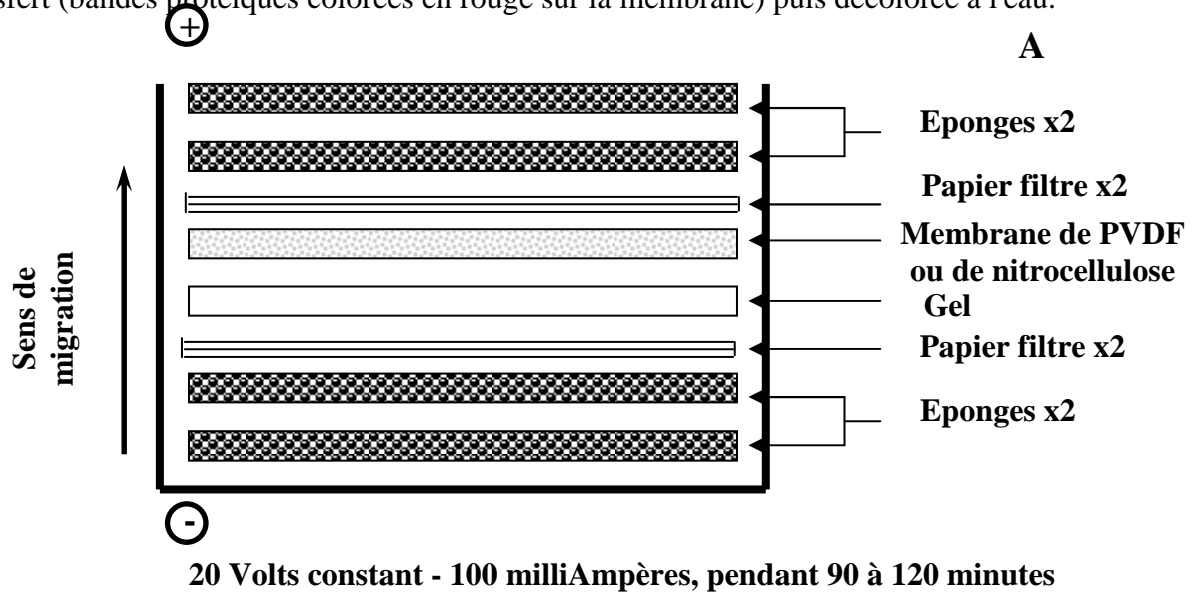


Figure 44 : Migration par électrophorèse des protéines sur gel polyacrylamide.

## VII.2.5. Transfert sur membrane de PVDF ou sur membrane de nitrocellulose

Après migration des protéines par électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF ou sur une membrane de nitrocellulose. Le gel de polyacrylamide est mis en contact avec l'une de ces membranes de transfert. Le transfert s'effectue dans une cuve à ampérage constant (20 V - 100 mA) pendant 90 minutes dans du tampon de transfert (Tris-HCl 48 mM, Glycine 39 mM, SDS 0,037 %, méthanol 20 %) (Figure 45). La membrane de transfert est récupérée et colorée au Rouge Ponceau (Sigma) pour s'assurer de la qualité du transfert (bandes protéiques colorées en rouge sur la membrane) puis décolorée à l'eau.



**Figure 45 :** Cuve de transfert

A - Disposition des éléments dans la cuve de transfert

B - Transfert des protéines

## VII.2.6. Marquage par immunofluorescence de la membrane de transfert avec les anticorps primaire et secondaire

Ce marquage permet de repérer les différentes protéines étudiées sur la membrane de transfert : celle-ci est incubée avec un anticorps primaire capable de reconnaître la protéine recherchée et de s'y fixer. Puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase est ajouté afin qu'il puisse se fixer sur le premier anticorps.

**Blocage** : La membrane est déposée dans une solution de blocage composée de PBS-lait ou de PBS-BSA à différentes concentrations, en fonction de l'anticorps primaire utilisé. Le blocage est effectué à 4°C sous agitation, durant 1 heure, pour saturer les sites non spécifiques.

**1<sup>er</sup> anticorps** : La membrane est incubée sous agitation avec l'anticorps primaire dilué avec une solution de blocage (PBS-BSA) pendant 12 heures et à 4°C. Les dilutions des anticorps ainsi que la solution de blocage utilisées varient en fonction de l'anticorps (Tableau 10). La membrane est ensuite rincée 4 fois par une solution de PBS-Tween 20 à 0,1%, puis deux fois avec du PBS.

Anticorps primaires dirigés contre	Produit chez	Fournisseur	Dilution/temps d'incubation
Anti-Apoptosis-Inducing Factor (AIF), humain A-7549, Lot # 90K4813	Lapin	SIGMA	1/1000 dans PBS-4% BSA, 12 heures à 4°C
Anti-Bax (B-9) sc-7480, Lot # A2903	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/200 dans PBS-4 % BSA, 12 heures à 4°C
Anti-Bcl-2 (100) sc-509, Lot # K1402	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/200 dans PBS-4 % BSA, 12 heures à 4°C
Anti-p21 (187) sc-817, Lot # H092	Souris	SANTA-CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	1/500 dans PBS-5% BSA, 12 heures à 4°C
Monoclonal antibody to cytochrome c mouton	Souris	ALEXIS BIOCHEMICALS	1/500 dans PBS-4% BSA, 12 heures à 4°C
Anti-β-actine (AC-15) A-5441, Lot#102K4811	Souris	SIGMA	1/5000 dans PBS-4% BSA, 12 heures à 4°C

**Tableau 10:** Conditions d'utilisation des anticorps primaires en Western Blot

2<sup>ème</sup> anticorps : La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire dans la solution de blocage pendant 90 minutes sous agitation et à 37°C. Deux anticorps secondaires sont utilisés : un anti-lapin IgG (H+L), couplé à la HRP "horseradish peroxydase" (Promega) ou un anti-souris, couplé à la HRP (Dako) (Tableau 11). La membrane est ensuite rincée 4 fois par une solution de PBS-Tween 20 0,1%, puis on effectue deux lavages au PBS.

Anticorps secondaires dirigés contre	Produit chez	Fournisseur	Dilution/temps d'incubation
Anti- lapin IgG (H+L) couplé HRP	Chèvre	PROMEGA	1/1000 dans PBS-lait 4%, durant 90 minutes à 37°C
Anti-Souris couplé HRP	Lapin	DAKO	1/1000 dans PBS-lait 4% , durant 90 minutes à 37°C

**Tableau 11:** Conditions d'utilisation des anticorps secondaires en Western Blot

### VII.2.7. Révélation par réaction de chimiluminescence

- Principe : La membrane est incubée avec du luminol (solutions 1 et 2 du réactif de chimiluminescence) (\*). Au contact de ce réactif, la peroxydase s'oxyde, la forme oxydée de l'enzyme libère de l'énergie lumineuse capable d'impressionner un film radiographique hypersensible. Les protéines apparaissent alors sous la forme de bandes sombres sur le film et peuvent être quantifiées par un logiciel adéquat.

- Protocole opératoire : La membrane est incubée pendant 1 minute avec un mélange volume à volume des solutions 1 et 2 du réactif de chimiluminescence. La membrane est égouttée et mise au contact d'un film radiographique (\*\*). Le temps de contact entre la membrane et le film varie en fonction de l'anticorps afin d'obtenir un signal d'une intensité optimale (5 secondes à 5 minutes). Les films sont alors révélés par un développeur automatique (Kodak Diagnostic Imaging, RP X-OMAT processor modèle M6B) et l'intensité de chaque signal présent sur le film est déterminée par le logiciel "Kodak 1 D Image Analysis Software".

(\*) Solutions 1 et 2 du réactif de chimiluminescence : ECL Western blotting detection reagents and analysis system, RPN 209, Amersham Biosciences, UK.

(\*\*) Film radiographique : "Hyperfilm ECL", Amersham Biosciences, UK

## **VIII. Mise en évidence des activités caspases par marquage *in situ* à l'aide du marqueur FITC-VAD-FMK**

Les modifications morphologiques caractéristiques de la cellule apoptotique, quel que soit le stimulus, suggèrent une phase effectrice commune à tous les types cellulaires. Tous ces signaux aboutissent en définitive à l'action irréversible d'un tronc commun, constitué par les caspases.

Pour montrer l'implication de l'acide ursolique dans le processus apoptotique, nous avons effectué un marquage *in situ* sur les cellules HaCat et M4Beu. Nous avons utilisé la sonde fluorescente FITC-VAD-FMK reconnue par toutes les caspases. Elle a la capacité de se fixer sur toutes les caspases actives au sein d'une cellule. Cette technique de marquage cytochimique va ainsi nous permettre de visualiser (qualitativement) l'importance du niveau d'activation des caspases après traitement avec l'acide ursolique.

### **VIII.1. Principe**

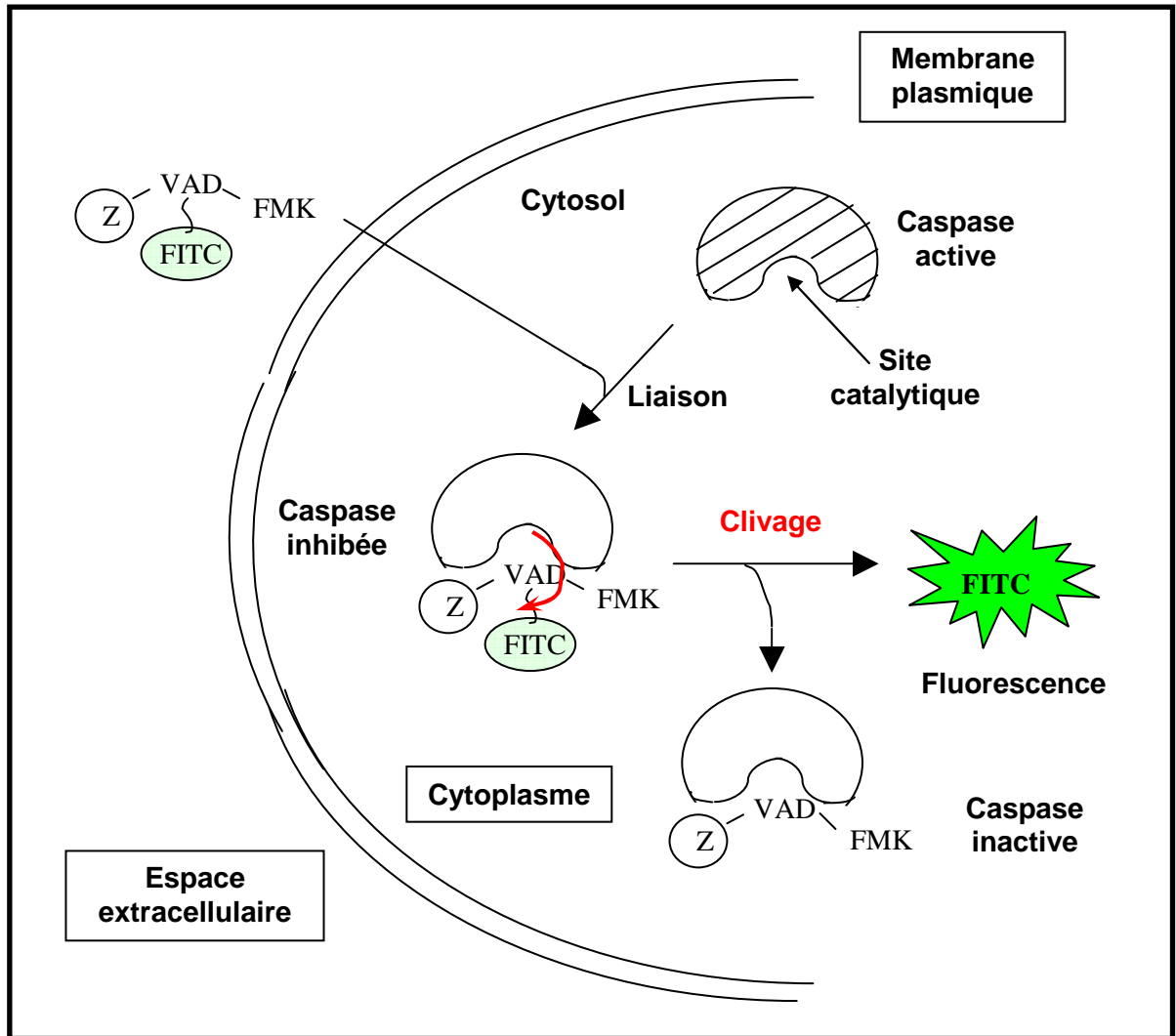
La sonde FITC-VAD-FMK est basée sur l'inhibiteur irréversible de caspase, Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-analyl-aspartyl-[O-méthyl]-fluorométhylketone), couplé au fluorochrome FITC.

Ce composé lipophile peut traverser la membrane de la cellule sans perméabilisation préalable. Le groupement méthyl de l'aspartate permet d'augmenter la capacité du composé à pénétrer les parois phospholipidiques des membranes cellulaires sans perturber l'intégrité de celles-ci. Le groupement Z ou carbobenzoxy empêche la digestion intracellulaire de la séquence VAD par les aminopeptidases.

Après avoir pénétré la cellule, la séquence cible de la sonde va être reconnue dans le cytosol par toutes les caspases actives. En effet, la séquence VAD (Valine-Alanine-Aspartate) de la sonde se trouve alors au contact avec les caspases ; une liaison covalente irréversible s'établit entre le groupement "fluorométhylketone" (FMK) de la sonde et le site catalytique d'une caspase (Figure 46).

A la suite de ce « verrouillage », il s'opère un clivage, au niveau du site catalytique. Une fois libéré, le fluorochrome va émettre dans le vert à 543 nm (après excitation à 490 nm) et l'observation se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence.





**Figure 46** : Schéma du principe du mécanisme d'action de l'inhibiteur FITC-VAD-FMK lors du marquage *in situ* des activités caspases

De part sa nature, la sonde FITC-VAD-FMK se comporte comme un inhibiteur irréversible de caspases. En effet, après formation du complexe enzyme (caspase) / substrat (sonde) et la libération concomitante du fluorochrome (FITC), le site catalytique de la caspase est rendu inaccessible suite aux liaisons covalentes engendrées entre le site catalytique et le groupement FMK. Cette propriété est essentielle car elle permet de montrer que l'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle au nombre de caspases actives liées au FITC-VAD-FMK, et non à une seule caspase active qui aurait clivé plusieurs fois la sonde.

## VIII.2. Protocole opératoire

Les cultures cellulaires (HaCat et M4Beu) s'effectuent sur des lames compartimentées en 8 puits démontables (Lab Tek I, Nunc). La densité cellulaire est de  $2,5 \times 10^4$  cellules par puits, chacun contenant 300  $\mu$ l de milieu de culture complet. Les cellules sont traitées psur une durée de 24 et 48 heures avec différentes concentrations d'acide ursolique.

Après chaque période d'incubation, le surnageant est retiré des puits ; ceux-ci sont rincés par trois lavages avec du PBS 1X (pH 7.4). Le marqueur « CaspACE™ FITC-VAD-FMK *in situ* » (Promega) à 5 mM est dilué dans 1 ml de milieu (soit 1  $\mu$ l/ml du marqueur). 200  $\mu$ l de cette dilution sont déposés sur le tapis cellulaire de chaque puits. Les puits sont incubés à 37°C, sous papier aluminium, durant 8 heures. Après incubation, le surnageant est retiré et les puits sont rincés avec du PBS 1X. Les cellules de chaque puits sont ensuite fixées avec du para-formaldéhyde (PAF) à 4% dans du PBS 1X durant 20 minutes à température ambiante. Un lavage avec du PBS 1X est à nouveau effectué, et les puits sont démontés avant de procéder à l'observation visuelle des cellules à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica), et photographiées.

## IX. Etude de l'activité enzymatique des caspases : dosage par spectrofluorométrie

Les deux voies biochimiques principales qui conduisent à la mort cellulaire par apoptose, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, se traduisent entre autre et respectivement par une activation de la caspase-8 et de la caspase-9.

L'activation de l'une et/ou de l'autre de ces deux caspases initiatrices déclenche un processus en cascade qui aboutit à l'initiation et à l'activation de caspases exécutrices comme la caspase-3.

La caspase-1, impliquée dans le processus inflammatoire, peut également induire l'activation de la caspase-3.

Le dosage des activités enzymatiques de ces différentes caspases est donc essentiel dans la recherche et la compréhension des étapes de la transduction du signal apoptotique induit par l'acide ursolique sur les cellules HaCat et M4Beu.

## IX.1. Principe

Le dosage des activités caspases nous permet de mettre en évidence et de quantifier les activités enzymatiques des différentes caspases étudiées.

Dans nos différentes expérimentations, nous avons utilisé des substrats synthétiques spécifiques de chaque caspase :

- Substrat spécifique de la caspase-3 : Ac-DEVD-AMC
- Substrat spécifique de la caspase-9 : Ac-LEHD-AMC
- Substrat spécifique de la caspase-8 : Ac-IETD-AMC
- Substrat spécifique de la caspase-1 : Ac-YVAD-AMC

Chacun de ces substrats synthétiques est constitué de trois groupements :

- Un groupement de 4 peptides spécifique d'une caspase donnée, comme par exemple : Aspartate-Glutamate-Valine-Aspartate (DEVD) pour le substrat de la caspase-3.

- Un groupement AMC (7-Amino-4-Méthyl Coumarine), un fluorochrome également appelé groupement rapporteur.

- Un groupement acétyl (Ac) permettant, tout comme le groupement Z, d'empêcher la digestion intracellulaire de la séquence DEVD par les aminopeptidases.

Si l'une des caspases étudiées est active, il s'opère, au niveau du résidu Aspartate, un clivage qui va entraîner la libération du fluorochrome. Celui-ci va alors produire une fluorescence détectable par spectrofluorométrie.

Parallèlement à la recherche de l'activité caspase, et pour un même échantillon, un inhibiteur synthétique spécifique est rajouté afin de réaliser une compétition réversible entre le substrat et l'inhibiteur. Ainsi la présence de cet inhibiteur permet de démontrer que l'activité enzymatique mesurée correspond spécifiquement à chaque caspase :

- Inhibiteur spécifique de la caspase-3 : Ac-DEVD-CHO
- Inhibiteur spécifique de la caspase-9 : Ac-LEHD-CHO
- Inhibiteur spécifique de la caspase-8 : Ac-IETD-CHO
- Inhibiteur spécifique de la caspase-1 : Ac-YVAD-CHO

La fonction aldéhyde (CHO) est un groupement inhibiteur réversible du site catalytique de la caspase.

Les différents réactifs (substrats et inhibiteurs) nécessaires à la mise en œuvre du dosage sont disponibles à l'unité ou dans des kits spécialisés.

Pour chaque échantillon, l'étude de l'activité enzymatique de chaque caspase est réalisé en 3 étapes :

- Lyse cellulaire
- Dosage protéique selon la méthode de Bradford pour déterminer la quantité exacte de protéine nécessaire au dosage de l'activité des caspases
- Dosage de l'activité des caspases (-1, -3, -8 et -9) : préparation et mesure par spectrofluorométrie

## **IX.2. Protocole opératoire**

Les cellules HaCaT et M4Beu sont ensemencées et traitées avec différentes concentrations d'acide ursolique comme précédemment décrit. Au terme de chaque durée d'incubation, 24 et 48 heures, les cellules du surnageant et du tapis cellulaire sont récupérées pour former un pool cellulaire. Chaque suspension cellulaire est centrifugée à 1000 rpm pendant 5 minutes et stockée sous forme de culot à -20°C jusqu'à utilisation.

### **IX.2.1. Lyse cellulaire**

L'opération de la lyse cellulaire est réalisée sur de la glace. Les culots cellulaires de chaque échantillon sont lysés par 20 µl de solution détergente (Triton X-100 à 10%), auquel sont ajoutés 200 µl d'une solution tampon de citrate de sodium (\*). Cette solution tampon permet de stabiliser les protéines cellulaires, et ainsi de réaliser une lyse douce. Enfin les différents lysats obtenus sont homogénéisés à l'aide d'un vortex.

(\*) Solution tampon de citrate de sodium à 0,1% : 0,5 g de citrate de sodium dans 500 ml de PBS stérile.

### **IX.2.2. Dosage protéique par la méthode de Bradford**

Afin de réaliser le dosage des protéines totales, il convient de calibrer le spectrophotomètre et d'établir une courbe étalon référentielle à l'aide de l'albumine issue de sérum bovin.

Le dosage des protéines totales se fait selon la méthode de Bradford décrit précédemment (VII.2.2.). Pour réaliser le dosage des activités caspases dans des conditions optimales, le volume de lysat ne doit pas dépasser 10 µl et la concentration en protéines totales a été fixée à 7,5 µg pour 1 µl de lysat (elle ne doit pas excéder 10 µg/µl) (kit «CaspACE Assay System, Fluorometric», Promega).

### **IX.2.3. Dosage des activités enzymatiques des caspases**

#### **IX.2.3.1. Etalonnage et préparation des échantillons**

Afin de réaliser le dosage des activités enzymatiques des caspases étudiées, il convient de calibrer préalablement le spectrofluoromètre (Fluorite 1000, Dynatech laboratories) et d'établir une gamme étalon référentielle à l'aide d'une solution de 7-Amino-4-Méthyl Coumarine (AMC).

Nous avons utilisé le kit de Promega «CaspACE Assay System, Fluorometric» pour mettre en évidence les activités de la caspase-3 et de la caspase-1, dans les différentes conditions expérimentales.

Nous avons adapté ce principe de dosage enzymatique à d'autres activités caspases telles que la caspase-8 et la caspase-9 dont les séquences peptidiques IETD (caspase-8), et LEHD (caspase-9) ont été choisies en fonction de la description bibliographique (Choi *et al.*, 2000).

- Kit «CaspACE™ Assay System, Fluorometric» (Promega) :
  - Tampon caspase,
  - Standard d'AMC (7-amino-4-méthyl coumarine),
  - Substrat de la caspase-3 (Ac-DEVD-AMC),
  - Inhibiteur de la caspase-3 (Ac-DEVD-CHO),
  - Substrat de la caspase-1 (Ac-YVAD-AMC),
  - Inhibiteur de la caspase-1 (Ac-YVAD-CHO),
- Eau distillée stérile,
- DMSO (dyméthyl sulfoxyde, Sigma),
- DTT (Dithiothreitol, Sigma) 1 M, aliquoté et conservé à -20°C,
- Substrat de la caspase-8 (Ac-IETD-AMC) (Bachem Biochimie),
- Inhibiteur de la caspase-8 (Ac-IETD-CHO) (Bachem Biochimie),

- Substrat de la caspase-9 (Ac-LEHD-AMC) (Bachem Biochimie),
- Inhibiteur de la caspase-9 (Ac-LEHD-CHO) (Bachem Biochimie).

Le DTT permet de maintenir sous forme réduite le soufre de la cystéine du site catalytique de façon à optimiser le clivage de l'enzyme.

### IX.2.3.2. Mesure de l'activité enzymatique des caspases

Les différents substrats et inhibiteurs de caspases sont préalablement dissous dans du DMSO, puis dilués dans de l'eau distillée stérile pour obtenir une concentration finale de 2,5 mM. Ils sont aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Les différents échantillons à tester sont disposés dans une plaque 96 puits «blanches» à fond plat (Nunc), avec les différents réactifs comme indiqué dans le tableau 12.

	Substrat / Inhibiteur	Substrat	Blanc
Tampon Caspase	32 µl	32 µl	32 µl
DMSO	2 µl	2 µl	2 µl
DTT (1mM)	10 µl	10 µl	10 µl
Lysat Cellulaire	*	*	-
Inhibiteur Caspase (2,5 mM)	2 µl	-	-
H <sub>2</sub> O	qsp 98 µl	qsp 98 µl	54 µl
Incuber 30 minutes à 37°C			
H <sub>2</sub> O	-	-	2 µl
Substrat Caspase (2,5 mM)	2 µl	2 µl	-
Incuber 2 heures à 37°C			

\* : le volume de chaque échantillon est toujours ajusté pour avoir une quantité de protéines totales égale à 75 µg avec un volume de lysat n'excédant pas 10 µl.

**Tableau 12:** Distribution des réactifs pour le dosage des activités caspases.

Après 2 heures d'incubation, la fluorescence est mesurée avec un lecteur de plaque à fluorescence à l'aide des filtres d'excitation ( $\lambda_{exc}$  360 nm) et d'émission ( $\lambda_{em}$  460 nm).

## **X. Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial, en cytométrie de flux, par un double marquage (TOTO-3 / JC-1) et en microscopie à fluorescence par un marquage *in situ* (JC-1)**

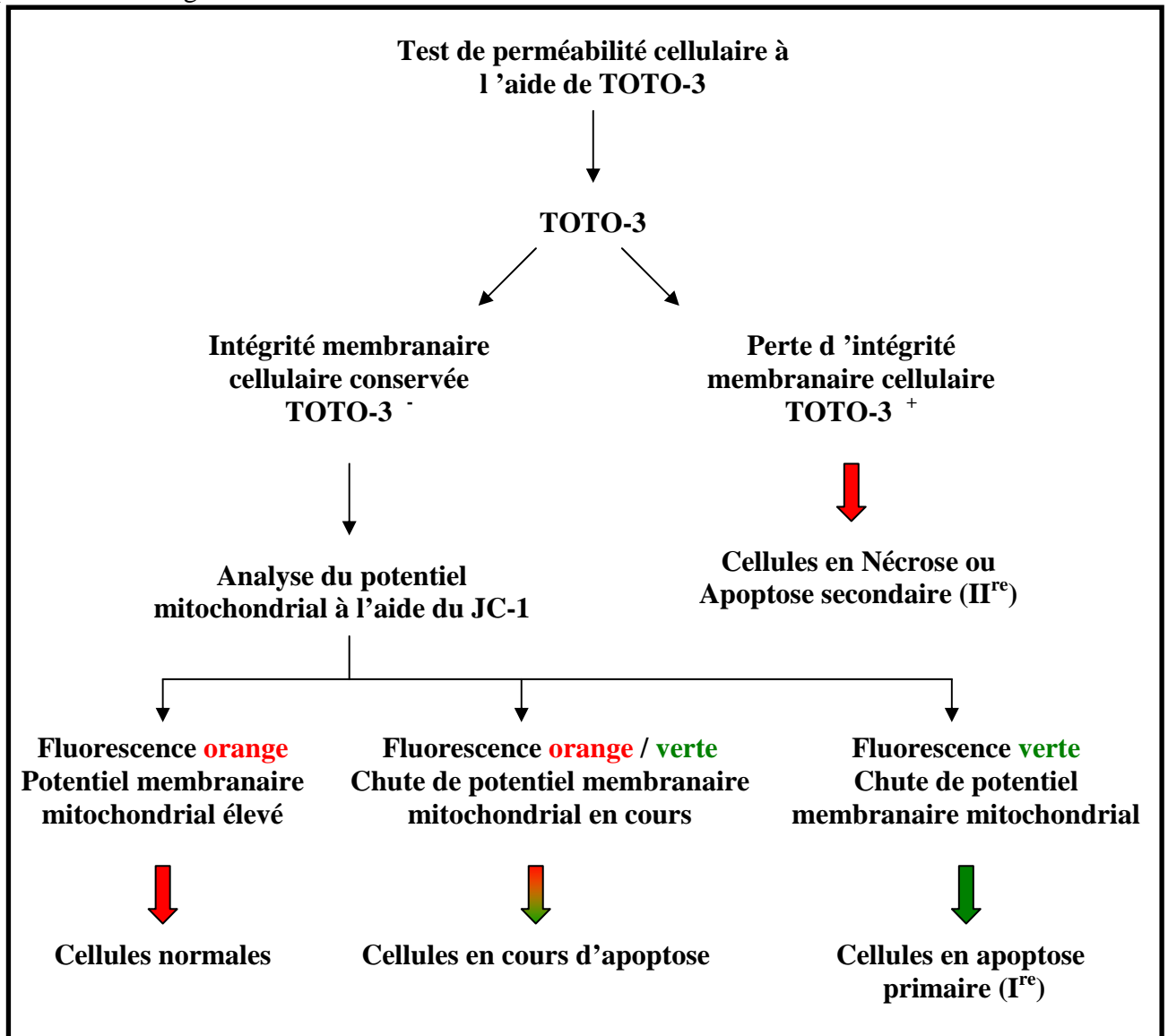
La mitochondrie joue un rôle central dans les mécanismes d'apoptose de la voie intrinsèque (Kroemer *et al.*, 1997). En effet, une des manifestations précoces du processus apoptotique se traduit par une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).

Pour mettre en évidence une dissipation de ce potentiel, sur des cellules HaCat et M4Beu traitées avec de l'acide ursolique, nous avons utilisé la technique de cytométrie en flux (CMF). A l'aide de deux fluorochromes, TOTO-3 et JC-1, nous avons effectué un double marquage cellulaire. Le fluorochrome TOTO-3 nous a permis de faire une discrimination entre les cellules mortes et les cellules vivantes. Sur cette dernière population, l'utilisation du marqueur JC-1 nous a permis d'analyser l'évolution du potentiel transmembranaire mitochondrial.

Il est à noter que l'étude du marquage JC-1 se fait uniquement sur les cellules vivantes, car les cellules apoptotiques secondaires forment plusieurs corps apoptotiques que la CMF pourrait comptabiliser comme des cellules intègres et ainsi fausser l'évaluation des cellules ayant des mitochondries à bas potentiel.

Nous avons également étudié l'évolution du potentiel transmembranaire mitochondrial par une analyse *in situ* des cellules HaCat et M4Beu traitées avec de l'acide ursolique. Pour cela, nous avons effectué un marquage cellulaire avec le fluorochrome JC-1 et suivi la dissipation du potentiel en microscopie à fluorescence.

Le schéma général de l'analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial est représenté sur la figure 47.



**Figure 47** : Principe de l'analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par double marquage



## **X.1. Analyse en cytométrie de flux du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par un double marquage TOTO-3 / JC-1**

### **X.1.1. Principe**

L'étude du potentiel transmembranaire mitochondrial, en cytométrie en flux, à l'aide de sondes fluorescentes TOTO-3 et le fluorochrome JC-1 permet d'effectuer une analyse précise de l'état fonctionnel mitochondrial.

#### **X.1.1.1. Fluorochrome TOTO-3**

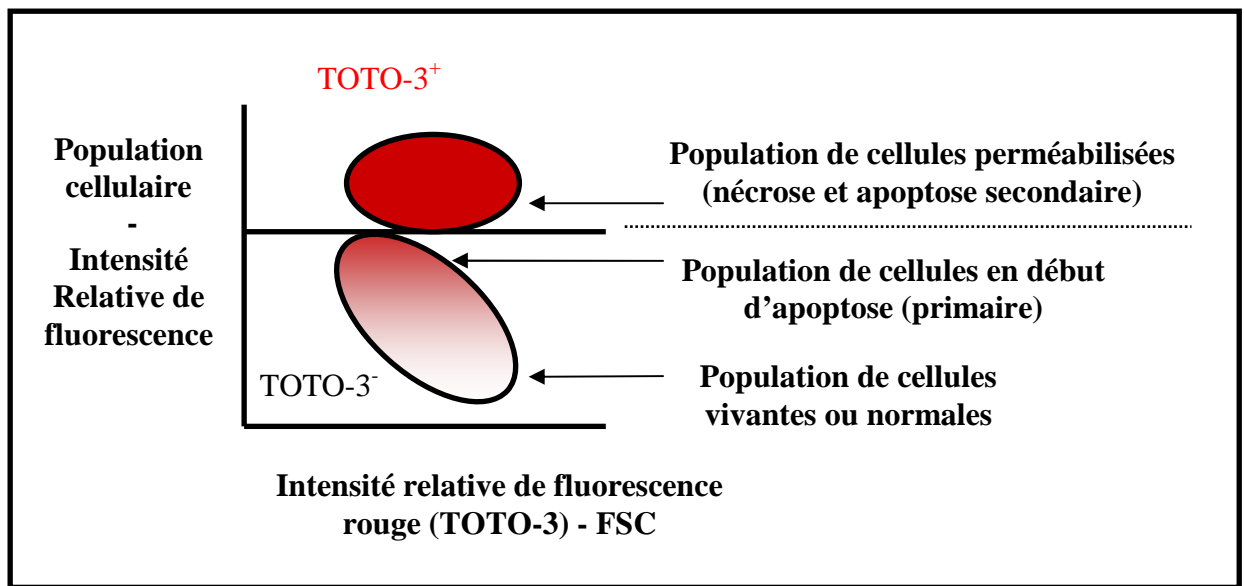
Le fluorochrome TOTO-3 (\*) est une molécule intercalante de l'ADN qui permet de faire une discrimination entre les cellules vivantes et les cellules mortes.

Les cellules mortes, parmi lesquelles se trouvent les cellules nécrotiques et les cellules en apoptose secondaire, ont perdu leur intégrité membranaire. Elles laissent ainsi pénétrer le fluorochrome TOTO-3 qui va alors s'intercaler dans l'ADN nucléaire. Sous une excitation à 633 nm par un laser hélium/néon, la sonde TOTO-3 fluoresce dans le rouge et son émission est lue par un filtre passe haut à 660 nm.

La population de cellules mortes est appelée, au cours de cette étude, TOTO-3<sup>+</sup> (Figure 48).

Les cellules vivantes, parmi lesquelles se trouvent les cellules normales et les cellules en apoptose primaire, ont une intégrité membranaire conservée. Les cellules vivantes sont imperméables à la sonde TOTO-3 et forment ainsi la population TOTO-3<sup>-</sup> (Figure 48).

(\*) TOTO-3 : [1,1-(4,4,8,8-tetraméthyl-4,8-diazaundecaméthylène)-bis-4-(3-méthyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazole)-2-méthylidène) -quinolinium tétraiodure (Molecular probes)]



**Figure 48** : Schéma de l'analyse en CMF des populations cellulaires marquées par TOTO-3. Forward Scatter (FSC) vs Intensité Relative de fluorescence (TOTO-3).

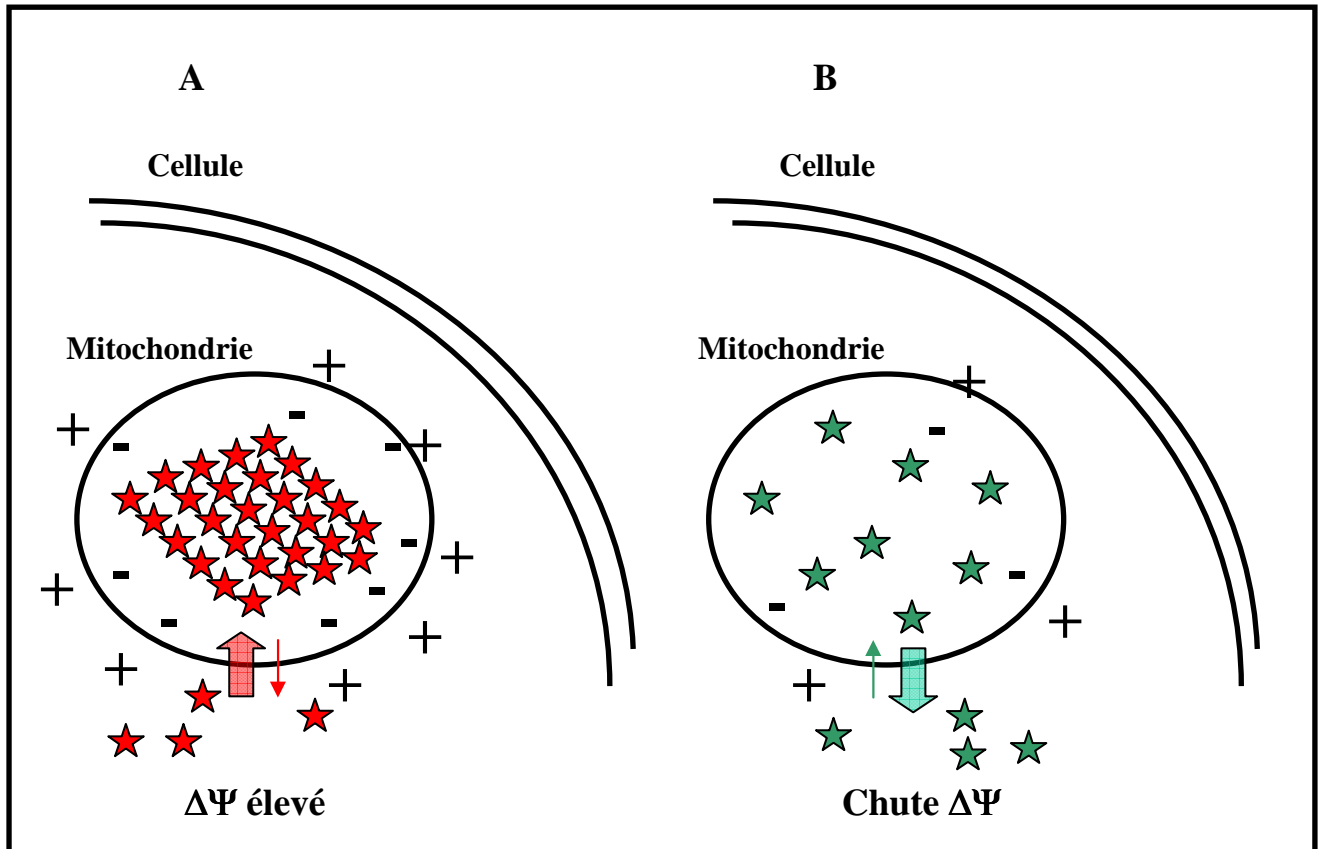
### X.1.1.2. Fluorochrome JC-1

Le fluorochrome JC-1 (\*) est une molécule chargée positivement, de couleur orange, et ayant un caractère hydrophobe.

Le gradient de potentiel de la mitochondrie intègre va permettre à la sonde JC-1, sous forme de monomères, de traverser en grande quantité les membranes mitochondriales. Sous l'influence du haut potentiel, les monomères de JC-1 vont former des agrégats qui émettent une fluorescence orange à 590 nm, après avoir été excités par le laser Argon à 488 nm (Figure 49 A).

Si la mitochondrie présente une diminution de son potentiel transmembranaire (baisse du gradient de potentiel), le marqueur JC-1 pénètre dans l'organite, mais en quantité peu importante. Le bas potentiel membranaire fait sortir la majorité des monomères JC-1 qui ne peuvent former d'agrégats. Les monomères restants de JC-1 émettent une fluorescence verte à 525 nm, après avoir été excités par le laser Argon à 488 nm (Figure 49 B).

(\*) JC-1 : [5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbo-cyanine iodide (Molecular probes)]



**Figure 49 :** Fluorescence de JC-1 en fonction du potentiel membranaire mitochondrial .  
Observation en microscopie à fluorescence

### X.1.2. Protocole opératoire

Les cellules HaCat et M4Beu sont traitées avec différentes concentrations d'acide ursolique pendant 24 et 48 heures.

Dans les mêmes conditions de culture, les cellules HaCat et M4Beu sont traitées avec de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ), qui est considérée, dans notre étude, comme un témoin positif induisant de manière précoce le processus apoptotique (Zuliani *et al.*, 2003).  $H_2O_2$  (1mM finale) est ajoutée 5 heures avant la fin de l'expérimentation. Dans ce protocole, les cellules non traitées et traitées avec  $H_2O_2$  vont permettre de définir le niveau de fluorescence de la sonde TOTO-3 (seuil TOTO-3<sup>-</sup> / TOTO-3<sup>+</sup>) correspondant respectivement aux cellules vivantes et aux cellules mortes.

Pour chaque expérimentation, nous constituons un "pool" cellulaire regroupant les cellules du surnageant et les cellules du tapis cellulaire. Pour chaque suspension cellulaire, les cellules sont comptées, puis centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes. Elles sont remises en suspension avec du milieu complet de façon à obtenir une densité cellulaire de  $5 \times 10^5$  cellules/ml. Un volume de 5  $\mu$ l du marqueur JC-1 (1  $\mu$ M finale) est rajouté à chaque échantillon qui sera incubé à 37°C pendant 30 minutes. Puis un volume de 0,5  $\mu$ l du marqueur TOTO-3 (1 mM finale) est rajouté aux échantillons avant que ces derniers soient de nouveau incubés durant 5 minutes à 37°C.

L'analyse en cytométrie de flux est réalisée avec un minimum de  $10^4$  cellules. Les débris cellulaires sont éliminés du reste de la population cellulaire par FACS Vantage (Beckton Dickinson, San José, CA) et représentés à l'aide d'un cytogramme FSC versus SSC.

Les résultats cytométriques sont analysés avec le logiciel "Cell Quest" (Beckton Dickinson, USA) et sont visualisés sous forme de cytogrammes :

- cytogramme FSC versus FL4 (intensité relative de fluorescence rouge de la sonde TOTO-3) pour représenter les populations TOTO-3<sup>+</sup> / TOTO-3<sup>-</sup>
- cytogramme FL1 (intensité relative de fluorescence verte de la sonde JC-1) versus FL2 (intensité relative de fluorescence orange de la sonde JC-1) pour représenter les populations cellulaires ayant des mitochondries à haut potentiel transmembranaire (orange) et à bas potentiel transmembranaire (vert).
- cytogramme FL2 versus FL4 pour représenter les trois populations de cellules mortes (rouge), vivantes (orange) et apoptotiques (verte).

## **X.2. Etude *in situ* du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par simple marquage avec la sonde JC-1 : observation en microscopie à fluorescence**

Cette étude *in situ* en microscopie à fluorescence, avec la sonde JC-1, doit nous permettre d'observer une photographie ponctuelle de l'état du potentiel membranaire mitochondrial des cellules HaCat et M4Beu traitées avec l'acide ursolique.

Lors de cette étude, les cellules sont adhérentes à leur support et ne subissent pas le stress du décollement à la trypsine. Ainsi, les cellules observées correspondent uniquement à la population de cellules normales ou en cours d'apoptose.

### **X.2.1. Principe**

Comme préalablement décrit, le fluorochrome JC-1 émet une fluorescence orange pour toute mitochondrie à haut potentiel membranaire (cellules vivantes normales) tandis qu'il émet une fluorescence verte caractéristique des mitochondries à bas potentiel membranaire (cellules vivantes en cours d'apoptose).

### **X.2.2. Protocole opératoire**

Les cellules sontensemencées sur des lames compartimentées en 4 puits circulaires démontables (Lab Tek I, Nunc) avec une densité de  $2 \times 10^4$  cellules par puits dans un volume de 1 ml. Après 24 heures d'adhérence cellulaire, puis 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique, un volume de 500  $\mu$ l de milieu complet contenant 5  $\mu$ l de JC-1 (1  $\mu$ M final) est déposé sur chaque échantillon. Ces derniers sont incubés durant 35 minutes à 37°C. Après un lavage du tapis cellulaire avec du PBS, les puits sont démontés et une lamelle est déposée directement sur les quatre échantillons. Ces derniers sont examinés au microscope à fluorescence (Leica), puis photographiés.

## **XI. Statistiques**

Pour toutes les expérimentations, les analyses statistiques ont été réalisées par des analyses de variance (ANOVA). Une valeur inférieure à 0,05 ( $P < 0,05$ ) est considérée comme significative. Toutes les expérimentations ont été réalisées trois fois.

# **RESULTATS**

# CHAPITRE I : Lignée cellulaire HaCaT

## I. Evaluation du potentiel anti-prolifératif de l'acide ursolique

Dans cette étude portant sur les effets potentiels de l'acide ursolique sur la lignée cellulaire HaCaT, notre première approche a été de mettre en évidence l'activité anti-proliférative de cette biomolécule. Pour cela, nous avons utilisé deux techniques d'évaluation de la prolifération cellulaire : la technique du MTT et la technique du bleu trypan.

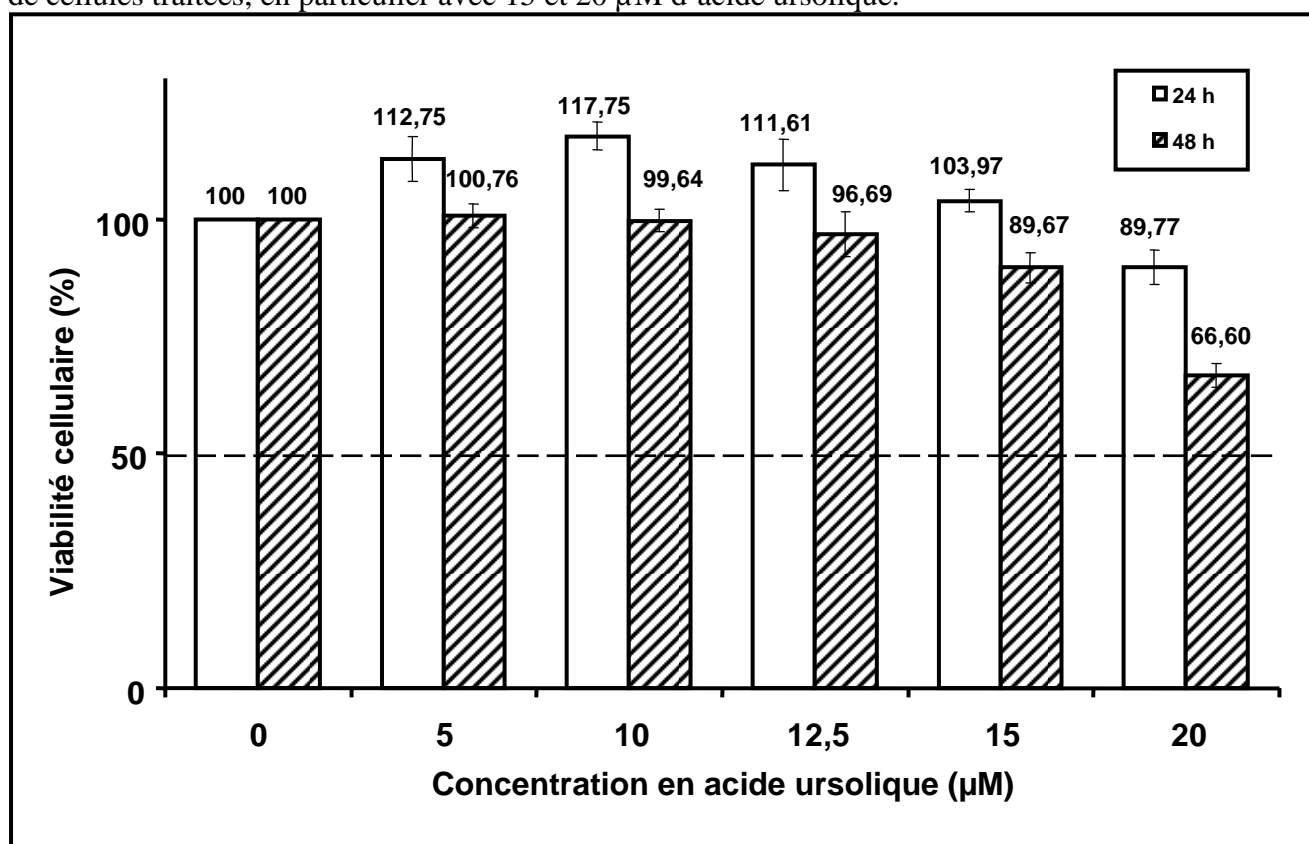
### I.1. Technique du MTT

La viabilité cellulaire a été déterminée après traitement des cellules avec différentes concentrations d'acide ursolique sur une durée d'incubation de 24 et 48 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules témoins non traitées (Figure 50).

Après 24 heures d'incubation, la courbe de prolifération fait apparaître une légère augmentation de la viabilité avec des concentrations d'acide ursolique comprises entre 5 et 15  $\mu\text{M}$ . La viabilité cellulaire maximale est obtenue avec 10  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique ; une augmentation de la prolifération de 17,75% est observée par rapport aux cellules non traitées. Avec 20  $\mu\text{M}$ , un faible effet anti-prolifératif est mis en évidence, avec une diminution de la viabilité de 10,23 %.

Après 48 heures de traitement, un effet anti-prolifératif est observé à partir de 12,5  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique ; avec 20  $\mu\text{M}$  la viabilité cellulaire est diminuée de 33,4 %.

Les résultats semblent montrer que l'acide ursolique présente un effet anti-prolifératif mais uniquement quand les cellules sont traitées avec les concentrations 15 et 20  $\mu\text{M}$  (Figure 50). Au terme de ces deux périodes de traitement, et avec cette gamme de concentration, les valeurs des  $\text{IC}_{50}$  (Concentration d'acide ursolique entraînant une diminution de 50 % de la viabilité cellulaire) semblent être largement supérieures à 20  $\mu\text{M}$  et ne sont pas déterminées. Cependant, ces résultats ne sont pas en adéquation avec un examen visuel du tapis cellulaire : l'observation faite au microscope optique, parallèlement à la mise en place de la technique du MTT, fait très nettement apparaître, dès 24 heures, une diminution du nombre de cellules traitées, en particulier avec 15 et 20  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique.



**Figure 50 :** Etude de la viabilité des cellules HaCaT en présence d'acide ursolique après 24 et 48 heures de traitement.

La technique du MTT ne paraissant pas être adaptée à l'étude de la prolifération des cellules HaCaT en présence de l'acide ursolique, nous avons déterminé la viabilité cellulaire par un comptage direct de ces cellules grâce à la technique du bleu trypan.



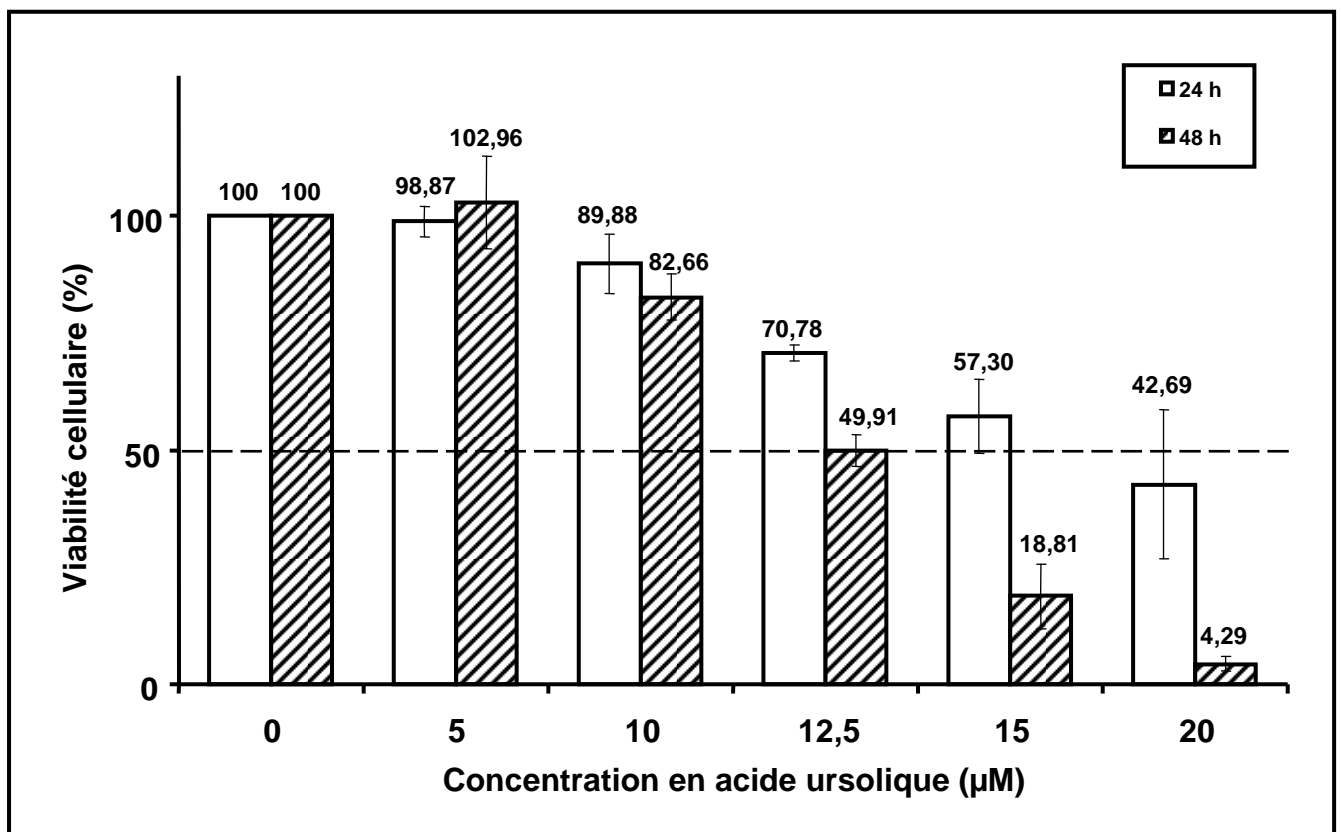
## I.2. Technique du bleu trypan

Les cellules HaCaT sont comptées sur un hémocytomètre de Malassez et les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules témoins non traitées (Figure 51).

L'acide ursolique présente un effet anti-prolifératif dose et temps dépendants :

Après 24 heures d'incubation avec l'acide ursolique, l'IC<sub>50</sub> est comprise entre 15 et 20 µM d'acide ursolique, avec respectivement 57,30 % et 42,69 % de viabilité cellulaire pour ces deux concentrations.

Après 48 heures de traitement, l'IC<sub>50</sub> est de 12,5 µM d'acide ursolique.



**Figure 51** : Etude de la viabilité des cellules HaCaT en présence d'acide ursolique après 24 et 48 heures de traitement.

### I.3. Etude comparative de la viabilité des cellules HaCaT en présence d'acide ursolique. Techniques du MTT et du bleu trypan.

L'évaluation du potentiel anti-prolifératif de l'acide ursolique, obtenue après le comptage des cellules HaCaT avec la technique du bleu trypan, met en évidence un effet inhibiteur dose et temps dépendants. La même évaluation faite avec la technique du MTT minimise complètement cet effet (Figure 52).

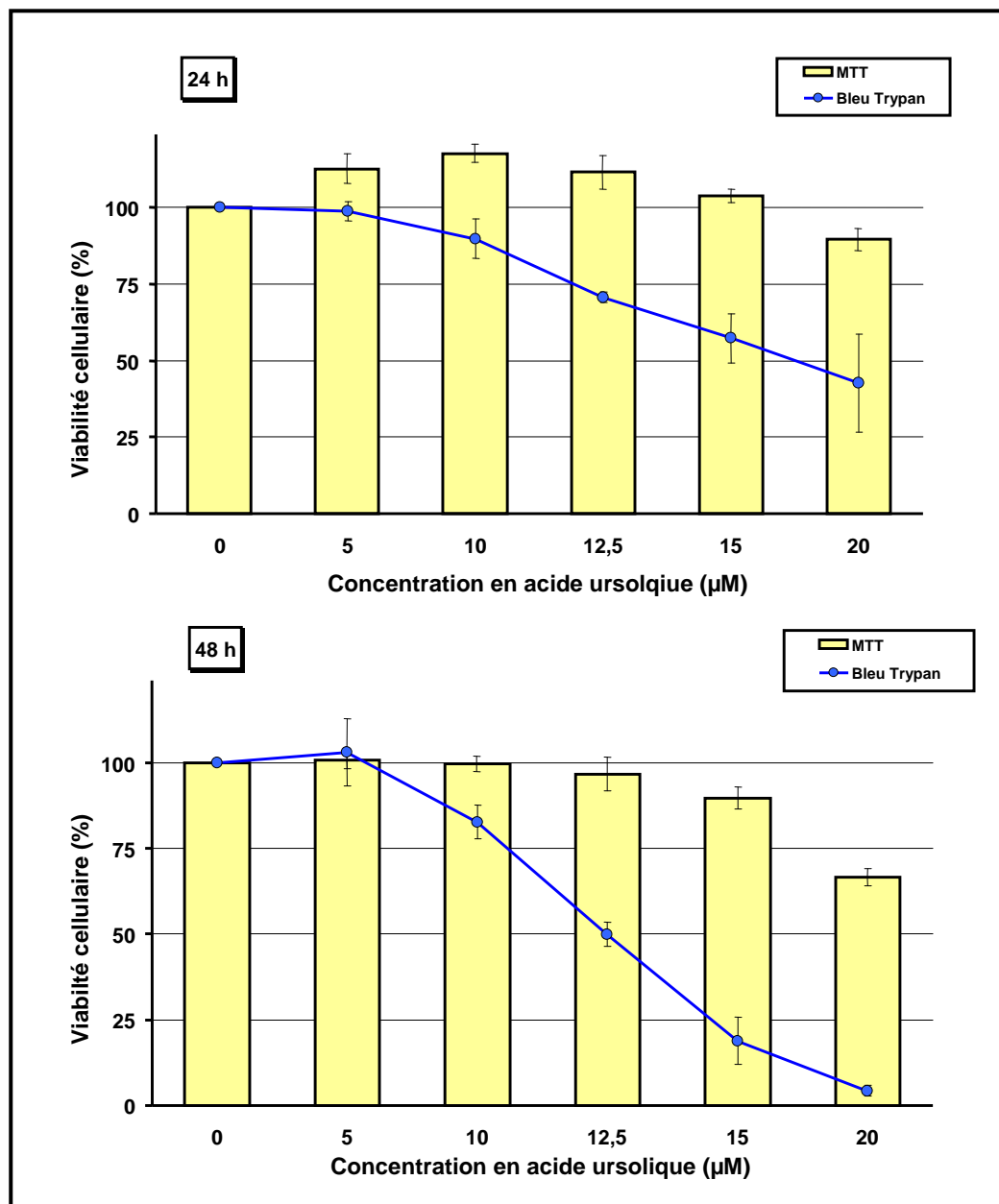


Figure 52 : Analyse comparative de la viabilité cellulaire des cellules HaCaT en présence d'acide ursolique (24 et 48 heures de traitement).

Techniques du MTT et du bleu trypan (n=3).

## II. Analyse du cycle cellulaire des cellules HaCaT, par cytométrie de flux

Après avoir mis en évidence une activité anti-proliférative de l'acide ursolique sur la lignée HaCaT, nous avons recherché si cet effet pouvait être la conséquence d'un arrêt du cycle cellulaire induit par cette molécule.

### II.1. Etude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire

Nous avons utilisé la technique d'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux pour rechercher le contenu en ADN des cellules et ainsi déterminer leur répartition dans les différentes phases du cycle. Les résultats sont donnés en pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle (Tableau 13).

Temps	Traitement	G0/G1	S	G2/M	Sub-G1	
24 h	Témoin	29,06±1,42	56,91±3,60 %	13,48±1,45 %	1,02±0,22 %	
	Acide ursolique	7,5 µM	30,86±2,55	54,56±3,82 %	13,52±1,21 %	1,06±0,17 %
		10 µM	31,33±2,34	55,18±2,24 %	13,48±0,98 %	0,96±0,18 %
		12,5 µM	37,05±2,88	52,50±2,54 %	10,45±1,01 %	1,12±0,49 %
		15 µM	42,10±3,26	42,13±2,71 %	15,77±1,83 %	3,47±1,14 %
		20 µM	46,76±3,13	49,17±2,45 %	4,07±1,46 %	13,23±2,28 %

Temps	Traitement	G0/G1	S	G2/M	Sub-G1	
48 h	Témoin	30,88±1,99 %	52,27±2,81 %	16,85±2,14 %	1,14±0,21 %	
	Acide ursolique	7,5 µM	37,74±2,21 %	50,46±2,52 %	11,80±1,65 %	1,46±0,33 %
		10 µM	44,87±2,43 %	44,58±3,74 %	10,55±1,42 %	1,36±0,27 %
		12,5 µM	44,17±1,57 %	50,18±2,67 %	5,66±0,93 %	1,10±0,19 %
		15 µM	48,26±2,77 %	44,16±2,44 %	7,58±0,68 %	15,29±2,83 %
		20 µM	52,06±3,02 %	41,16±3,14 %	6,79±0,87 %	22,53±3,14 %

**Tableau 13 :** Répartition des cellules HaCaT dans les différentes phases du cycle cellulaire après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Les cellules HaCaT témoins présentent un cycle cellulaire qui évolue normalement au cours du temps avec une proportion de cellules dans les phases G1, S et G2/M, comparable après 24 et 48 heures de traitement (Tableau 13).

En ce qui concerne les cellules traitées, nous observons après 24 heures d'incubation, une accumulation progressive des cellules HaCaT dans la phase G1 : de 29,06% pour les cellules témoins à 46,76% avec 20  $\mu$ M d'acide ursolique.

Après 48 heures d'incubation, la même évolution est observée mais avec une plus forte accumulation dans cette phase : de 30,88% pour les cellules témoins à 52,06% avec 20  $\mu$ M d'acide ursolique.

De manière concomittente, nous observons une diminution du nombre des cellules en phase G2/M en fonction de la concentration d'acide ursolique.

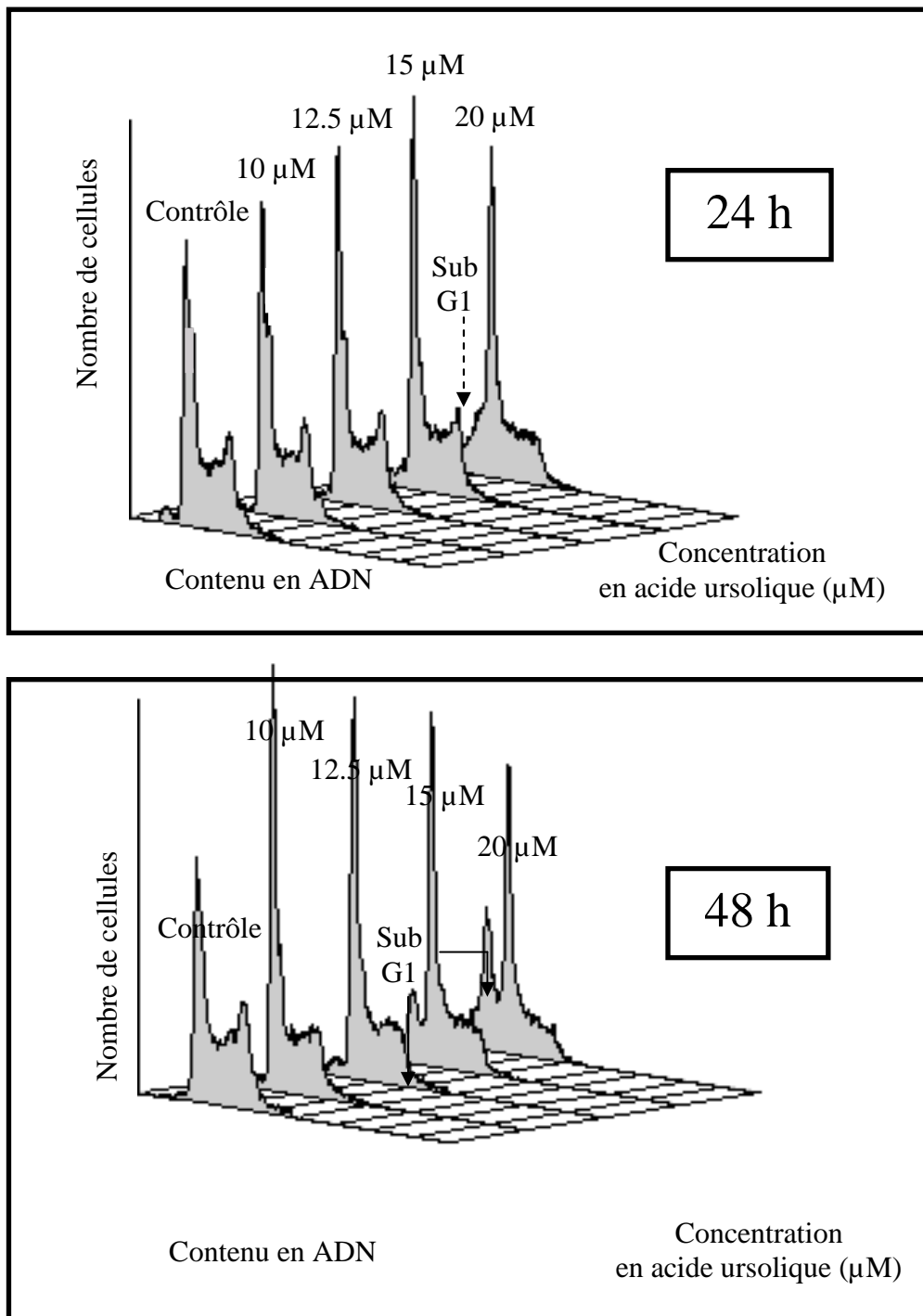
## **II.2. Mise en évidence d'une population cellulaire apoptotique : présence d'un pic sub-G1**

L'analyse du cycle cellulaire fait également apparaître un pic sub-G1 (sous-groupe de la phase G1) (Tableau 13, Figure 53). Ce pic sub-G1 est représentatif d'une population cellulaire apoptotique, caractérisée par une fragmentation de l'ADN (Ormerod *et al.*, 1992). En effet, lors du protocole opératoire mis en œuvre pour l'étude du cycle, les cellules sont perméabilisées avec de l'éthanol à -20°C créant des micropores dans les membranes cytoplasmiques. Ces micropores permettent la pénétration de l'iodure de propidium qui pourra aller s'intercaler dans l'ADN. Mais au cours des « lavages » successifs des cellules (étapes du protocole opératoire), les micropores laissent échapper dans le milieu extracellulaire les petits fragments d'ADN des cellules apoptotiques. Ces dernières se retrouvent alors avec un contenu en ADN fortement diminué, mais néanmoins marquées avec l'iodure de propidium : le pic sub-G1 représente une accumulation de ces cellules apoptotiques dans la sous phase G1, ces cellules ayant perdu la majorité de leur contenu en ADN.

C'est ainsi qu'après 24 heures de traitement, nous observons l'apparition d'un pic sub-G1 quand les cellules sont traitées avec 20  $\mu$ M d'acide ursolique (13,23% de cellules apoptotiques).

Après 48 heures de traitement, ce pic sub-G1 est mis en évidence dès 15  $\mu$ M d'acide ursolique (15,29% de cellules apoptotiques). Pour les cellules traitées avec 20  $\mu$ M d'acide

ursolique, le pourcentage de cellules apoptotiques est très significativement augmenté entre 24 et 48 heures (de 13,23% à 22,53%).



**Figure 53 :** Etude de la répartition des cellules HaCaT dans les différentes phases du cycle cellulaire après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique par la technique de CMF.

L'analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux montre que sur la lignée HaCaT, l'acide ursolique induit de manière dose et temps dépendants un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Lors de cette analyse du cycle cellulaire, la présence du pic sub-G1 est le premier élément dans cette étude qui nous amène à penser que l'acide ursolique induit le processus apoptotique sur les cellules HaCaT.

Dans la suite de nos expérimentations, nous étudierons les effets de l'acide ursolique avec une gamme de concentration resserrée autour des valeurs de l'IC<sub>50</sub>.

### **III. Protéines p53 et p21. Etude de l'expression des ARNm et des protéines**

Nous avons montré précédemment en cytométrie de flux que l'acide ursolique induisait sur les cellules HaCaT un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Nous avons également montré la présence de pics sub-G1, caractéristiques de cellules apoptotiques. Aussi, nous nous sommes intéressés aux protéines couramment impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (p53, p21) et dans l'apoptose (p53).

#### **III.1. Etude de p53**

Dans les cellules « normales », la protéine p53 est très faiblement exprimée. Lors d'une agression de la cellule, différentes voies de signalisation aboutissent à la stabilisation de la protéine, entraînant son accumulation dans le noyau et son activation comme facteur de transcription.

Cette activation induit l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et/ou dans l'induction du processus apoptotique.

L'activation de p53 peut être modulée à plusieurs niveaux :

- augmentation de l'expression de la protéine,
- conversion de p53 d'une forme latente en une forme active (activation par phosphorylation, par exemple),
- translocation de p53 du cytoplasme vers le noyau.

C'est ainsi que, sur les cellules HaCaT, nous avons étudié, avec la technique de RT-PCR, l'effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de p53. Nous avons également

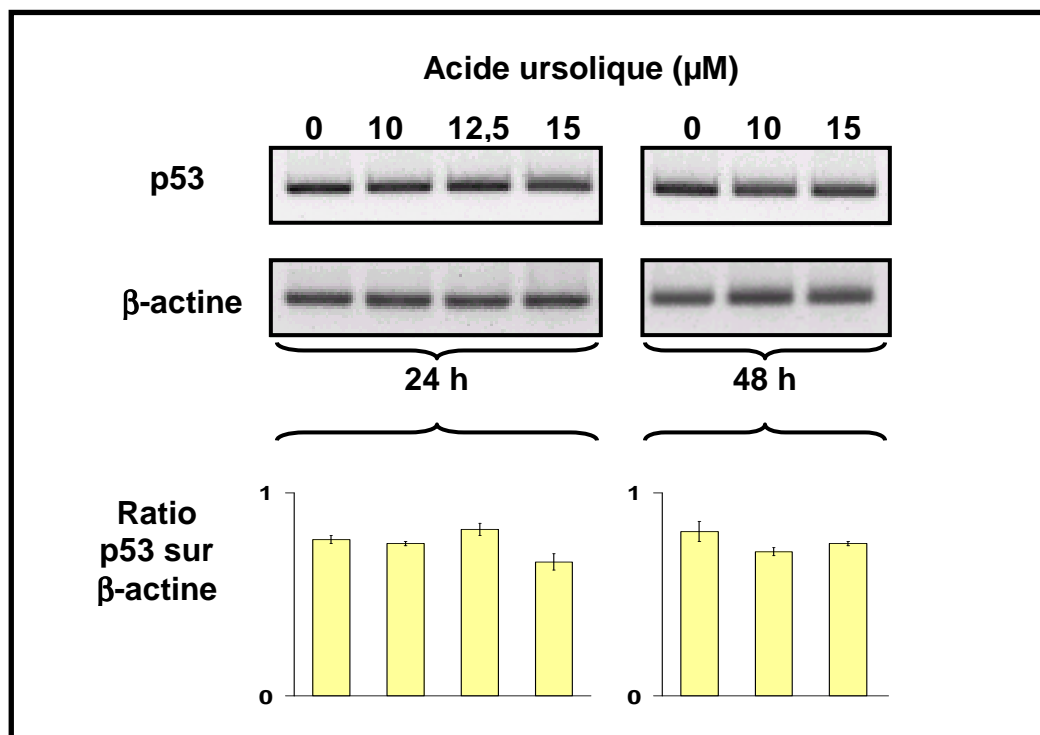
étudié l'effet de cette biomolécule sur l'expression et l'activation de la protéine p53 en utilisant deux techniques : Western Blot et le marquage immunofluorescent indirect *in situ*.

### III.1.1. Expression de l'ARNm de p53

Sur les cellules HaCaT témoins et traitées avec de l'acide ursolique, l'expression de l'ARNm de p53 a été mise en évidence à l'aide de la technique RT-PCR.

Nous avons utilisé l'expression de l'ARNm de la  $\beta$ -actine pour quantifier celle de l'ARNm étudié. En effet, la  $\beta$ -actine est une protéine constitutive de la cellule que l'on retrouve de façon constante dans les cellules témoins et les cellules traitées : elle ne subit aucune altération lors des différents traitements, et c'est pour cette raison que nous l'utilisons comme référence dans cette étude.

L'observation de l'intensité des bandes obtenues en RT-PCR montre que l'acide ursolique est sans effet sur l'expression de l'ARNm de p53. La quantification de ces bandes en faisant le ratio d'intensité p53 /  $\beta$ -actine pour chacune des bandes confirme cette observation (Figure 54).



**Figure 54** : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de p53 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

### III.1.2. Expression de la protéine p53

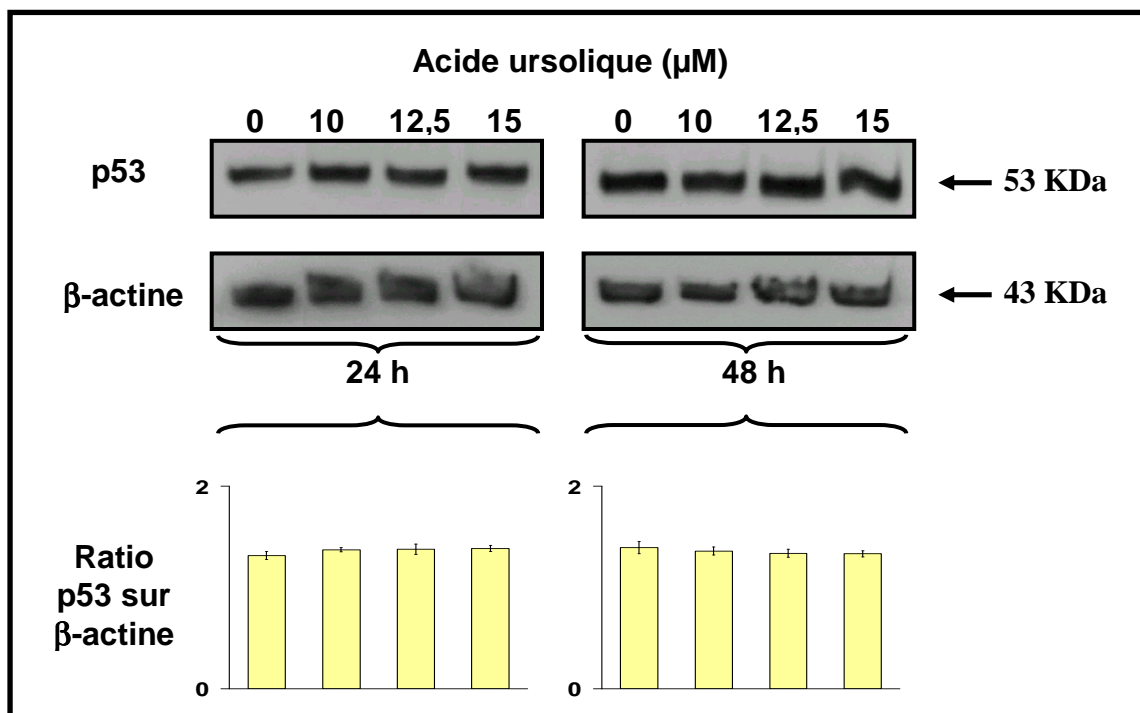
Afin de vérifier les résultats obtenus en RT-PCR, nous avons étudié l'expression et l'activation de la protéine p53 en utilisant deux techniques :

- Western Blot avec un anticorps anti-p53 pour étudier l'expression de la protéine,
- Immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps anti-p53 phosphorylé sur la sérine 392, pour visualiser l'activation de p53.

#### III.1.2.1. Expression de p53 par la technique Western Blot

L'observation de l'intensité des bandes et le calcul des ratios p53 /  $\beta$ -actine qui en résulte montrent que l'expression de la protéine p53 des cellules traitées avec l'acide ursolique, après 24 et 48 heures de traitement, ne présente pas de variations significatives par rapport aux cellules témoins (Figure 55).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la technique RT-PCR.



**Figure 55 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine p53 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

Technique Western Blot (n=3).

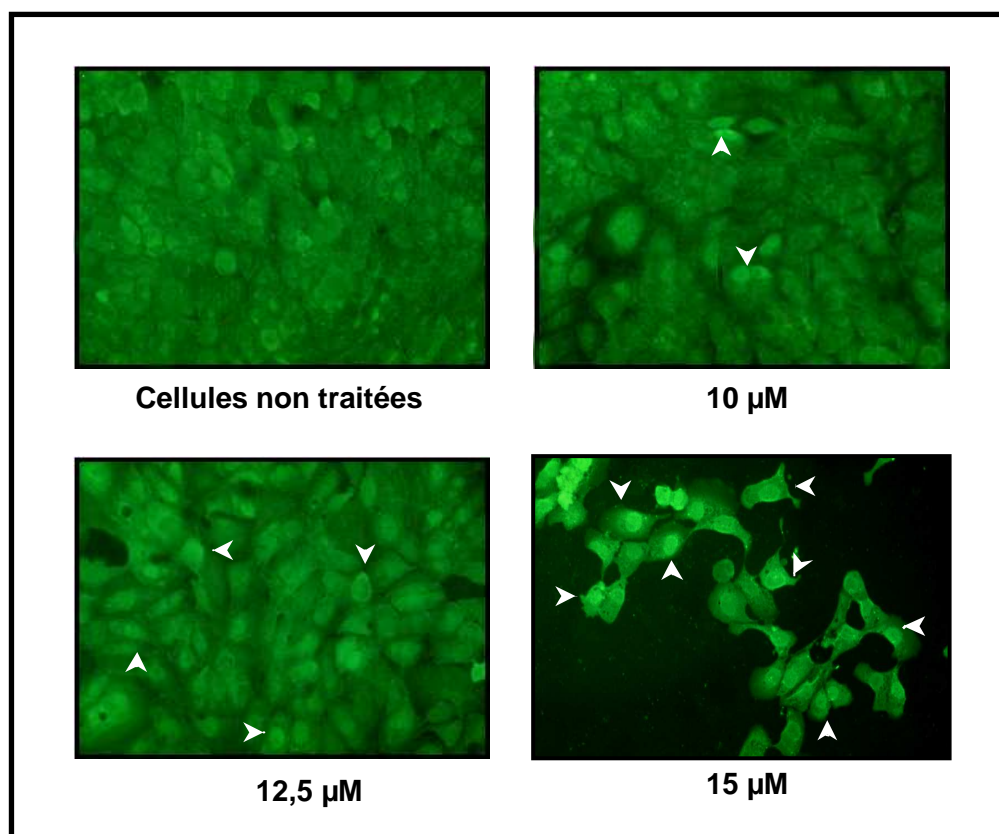


### III.1.2.2. Activation de p53 par immunofluorescence indirecte

Quand p53 est activée *in vitro*, la protéine subit des modifications post-traductionnelles et en particulier une phosphorylation de la sérine 392 (Sakaguchi *et al.*, 1997).

Aussi dans cette étude sur les cellules HaCaT, nous avons effectué un marquage immunofluorescent de p53 avec un anticorps anti-p53 phosphorylé et spécifique de la sérine 392, sur lequel on fixe un deuxième anticorps couplé au fluorochrome FITC.

Sur la figure 56, nous pouvons observer que les cellules témoins, après 24 heures d'incubation, présentent au niveau du cytoplasme une fluorescence diffuse, traduisant l'activation basale de la protéine p53. En revanche, les cellules traitées avec de l'acide ursolique font apparaître une fluorescence verte de plus en plus intense qui évolue du cytoplasme vers le noyau en fonction de l'augmentation de la concentration de la molécule. Ces résultats mettent en évidence l'activation de p53 (phosphorylation) et sa translocation vers le noyau.



**Figure 56 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine p53 des cellules HaCaT après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations.

Grossissement x 200. (n=3)

Le marquage après 48 heures d'incubation est comparable à celui de 24 heures (résultats non présentés).

Dans cette étude sur la protéine p53 des cellules HaCaT traitées avec de l'acide ursolique, nous observons grâce à un immunomarquage, une activation de cette protéine, alors que les techniques de RT-PCR et de Western Blot n'avaient montré aucune augmentation dans l'expression des ARNm et dans l'expression de la protéine.

### **III.2. Etude de p21**

La protéine p21 est une cible majeure de p53 ; cette dernière stimule la transcription du gène WAF-1, codant pour la protéine p21. Il est admis que l'activation de p21 est en grande partie responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Waldmann *et al.*, 1992).

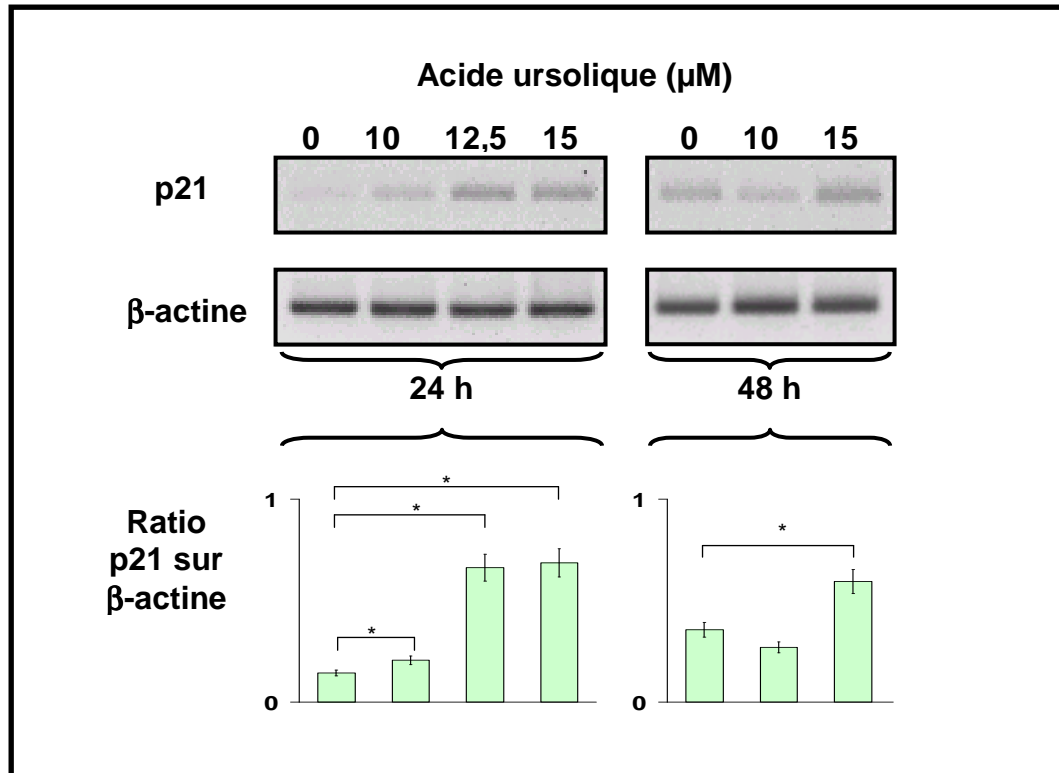
Aussi, après avoir montré un arrêt du cycle en phase G1, ainsi que l'activation *in situ* de p53 sur les cellules HaCaT traitées avec de l'acide ursolique, nous nous sommes donc intéressés à l'expression de l'ARNm (RT-PCR), puis à l'expression (Western Blot et immunomarquage fluorescent indirect) de p21.

#### **III.2.1. Expression de l'ARNm de p21**

Les résultats obtenus avec la technique RT-PCR montrent que l'acide ursolique augmente de manière significative l'expression de l'ARNm de p21 (Figure 57).

Après 24 heures de traitement, le ratio p21/ $\beta$ -actine est de 0,14 pour les cellules témoins et de 0,69 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 4,9.

Après 48 heures de traitement, le ratio est de 0,36 pour les cellules témoins et de 0,59 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,6.



**Figure 57 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de p21 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

Technique RT-PCR (n=3). (\* P<0,05).

### III.2.2. Expression de la protéine p21

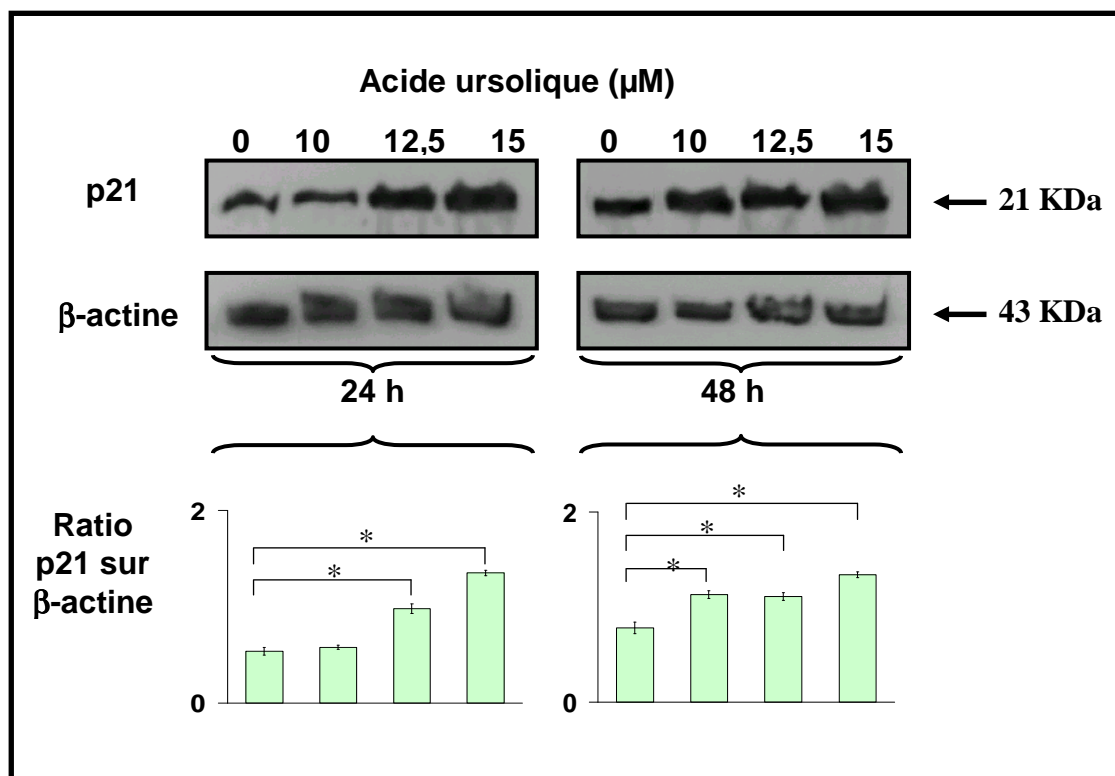
Pour confirmer les résultats obtenus en RT-PCR, nous avons étudié l'expression de la protéine p21 par les techniques Western Blot et immunofluorescence indirecte en utilisant un anticorps anti-p21.

#### III.2.2.1. Expression de p21 par la technique Western Blot

L'observation des bandes protéiques de p21 des cellules traitées montre une augmentation de l'expression de p21 en fonction de la concentration en acide ursolique. Le calcul des ratios p21 / β-actine confirme cette observation (Figure 58).

Après 24 heures de traitement, le ratio est de 0,54 pour les cellules non traitées et de 1,35 pour les cellules traitées avec 15 μM d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 2,5.

Après 48 heures de traitement, le ratio est de 0,78 pour les cellules non traitées et de 1,34 pour les cellules traitées avec 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,7.



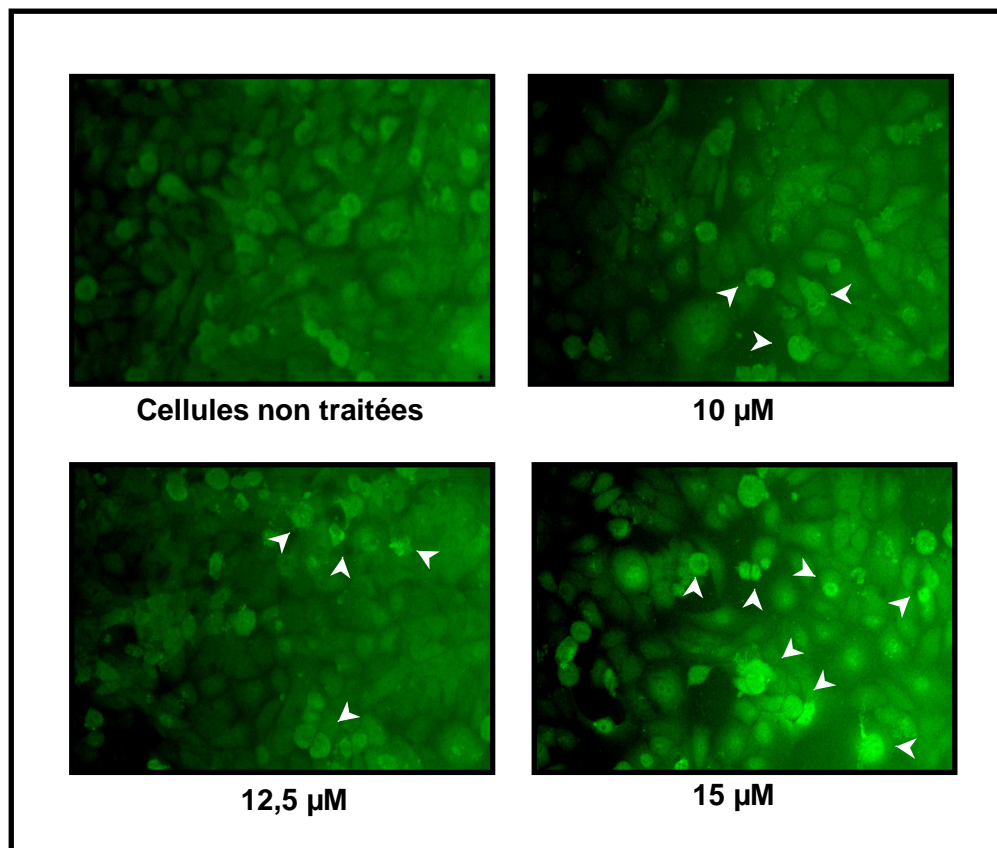
**Figure 58** : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine p21 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

Technique Western Blot (n=3). (\* P<0,05)

### III.2.2.2. Expression de p21 par immunofluorescence indirecte

Nous avons réalisé l'immunomarquage *in situ* des cellules HaCaT avec le même anticorps anti-p21 que celui utilisé avec la technique du Western Blot.

Après 24 heures d'incubation (Figure 59), les cellules non traitées présentent une fluorescence verte diffuse, traduisant l'expression basale de la protéine p21. En revanche, les cellules traitées avec les différentes concentrations d'acide ursolique font apparaître une augmentation de la fluorescence verte dans le cytoplasme. Avec 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, le nombre de cellules marquées au niveau du cytoplasme ainsi que l'intensité de fluorescence augmentent par rapport aux cellules témoins.

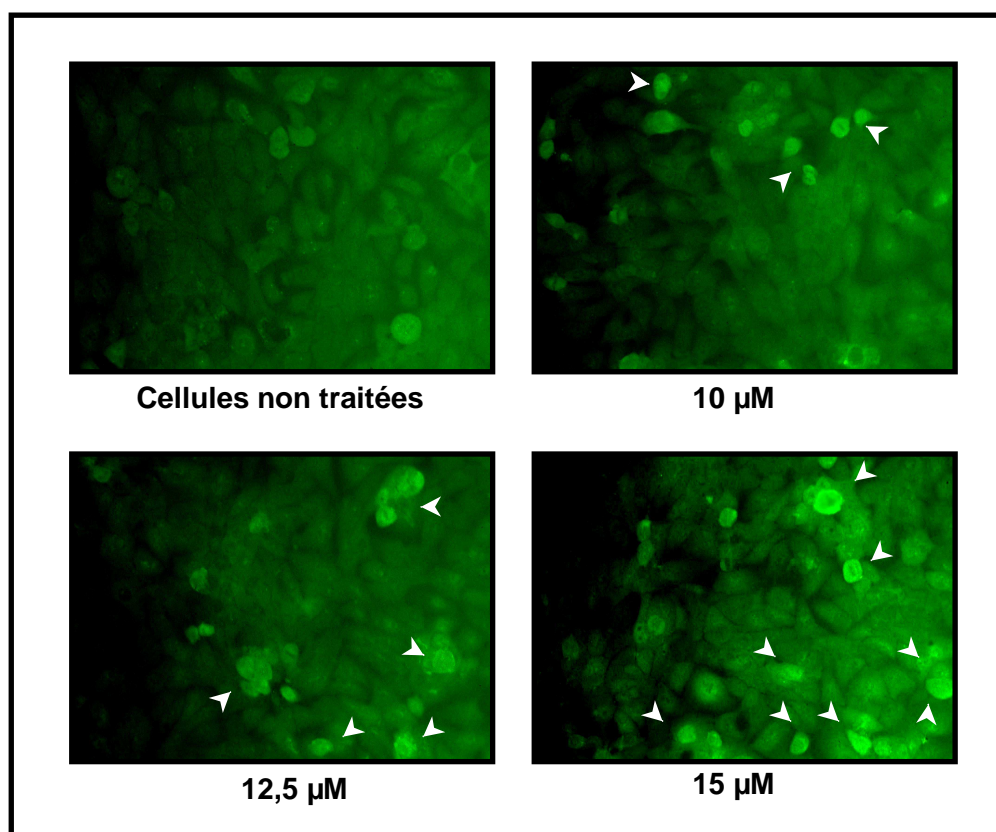


**Figure 59 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine p21 des cellules HaCaT après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations.

Grossissement x 200. (n=3).

Après 48 heures d'incubation (Figure 60), et par rapport à 24 heures, nous pouvons observer que les cellules traitées présentent au niveau du cytoplasme une fluorescence verte beaucoup plus intense : cette observation semble indiquer une plus grande expression de la protéine p21 après 48 heures de traitement.



**Figure 60 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine p21 des cellules HaCaT après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations. Grossissement x 200. (n=3).

Ces résultats obtenus par immunomarquage *in situ* corroborent ceux obtenus avec les techniques de RT-PCR et de Western Blot.

L'étude de p21 nous a permis de montrer successivement une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine p21 quand les cellules sont traitées avec différentes concentrations d'acide ursolique. Ces résultats sont en adéquation et montrent, sur les cellules HaCaT, le rôle majeur de la protéine p21 dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

Dans cette étude sur les protéines p53 et p21 des cellules HaCaT traitées avec de l'acide ursolique, nous avons montré une activation de p53 par phosphorylation grâce à un immunomarquage, mais aussi une augmentation de l'expression de l'ARNm de p21 et de la protéine. Les résultats sur les cellules HaCaT suggèrent que la protéine p53 est impliquée dans le processus apoptotique (pic sub-G1) et que la protéine p21 joue un rôle majeur dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

## **IV. Etude du processus apoptotique dépendant de l'activation des caspases**

Après traitement des cellules HaCaT avec de l'acide ursolique, l'analyse du cycle cellulaire nous a permis de mettre en évidence un arrêt du cycle en phase G1, mais aussi une accumulation de cellules dans le sous groupe de la phase G1 (pic sub-G1, caractéristique d'une population de cellules apoptotiques). La présence de ce pic, mais également l'activation de la protéine p53, nous ont conduit à étudier de manière plus approfondie le mécanisme d'apoptose induit par l'acide ursolique sur les cellules HaCaT.

Le processus apoptotique est caractérisé par des modifications morphologiques et biochimiques. Parmi les critères morphologiques, l'apparition de corps apoptotiques, (événement tardif observable uniquement *in vitro*), est observée et pourrait correspondre aux cellules accumulées dans la phase sub-G1, représentée par un pic. Aux critères biochimiques est généralement associée l'activation des caspases, responsables de l'initiation et de l'exécution de l'apoptose.

Afin de préciser le mécanisme d'action de l'acide ursolique comme inducteur du processus apoptotique sur les cellules HaCaT, nous avons cherché à évaluer l'activation des caspases, en réponse au traitement.

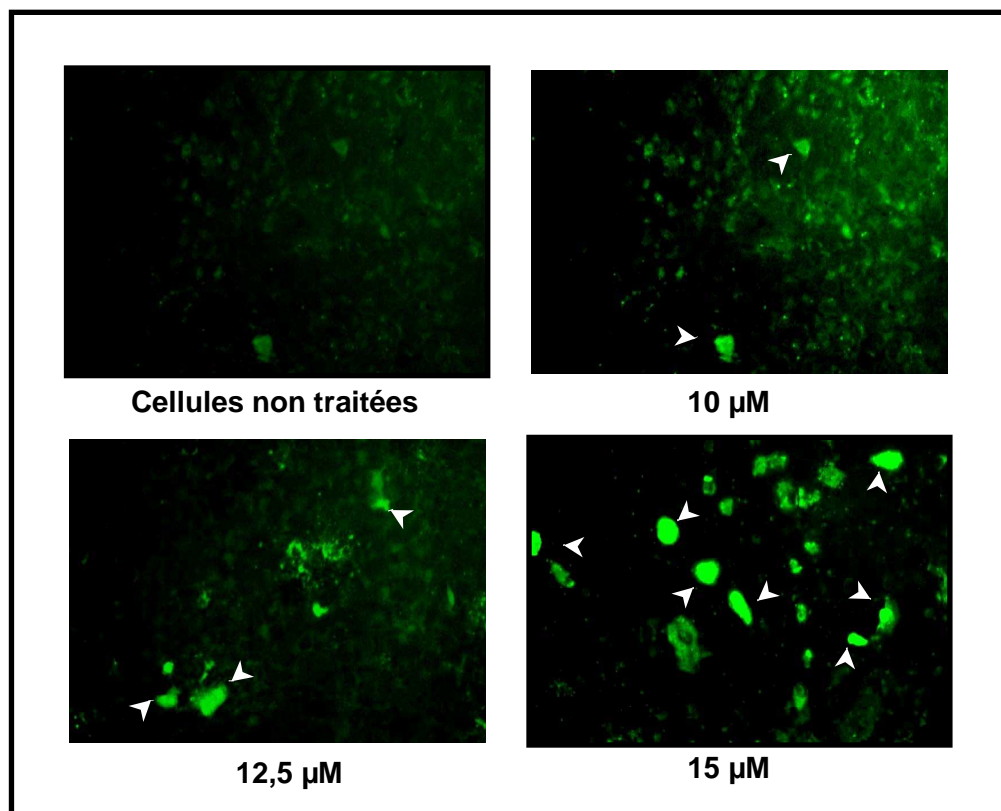
### **IV.1. Etude de l'activation des caspases par marquage *in situ* des cellules HaCaT à l'aide du substrat-inhibiteur de caspases FITC-VAD-FMK**

Afin de préciser le mécanisme d'action de l'acide ursolique comme inducteur du processus apoptotique sur les cellules HaCaT, nous avons évalué le potentiel de cette molécule sur l'activation des caspases. Pour cela, nous avons effectué un marquage *in situ* des cellules à l'aide de la sonde fluorescente FITC-VAD-FMK (fluorochrome FITC et groupement FMK). En se liant au site catalytique d'une caspase active, ce composé se comporte comme un inhibiteur irréversible, libère son fluorochrome et permet ainsi de mettre en évidence l'ensemble des caspases actives.

Les résultats obtenus après 24 et 48 heures de traitement sont représentés sur les photographies de la figure 61 et 62.

Le tapis cellulaire des cellules non traitées présente une fluorescence verte diffuse, ce qui traduit l'expression basale de l'activité caspase.

En ce qui concerne les cellules traitées, et pour les deux périodes d'incubation, nous pouvons observer que, de façon concomitante, le nombre de cellules marquées, et leur intensité de fluorescence au sein du cytoplasme, augmentent en fonction de la concentration d'acide ursolique. Avec 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, le nombre de cellules présentant une forte intensité de fluorescence est particulièrement augmenté par rapport aux cellules témoins.

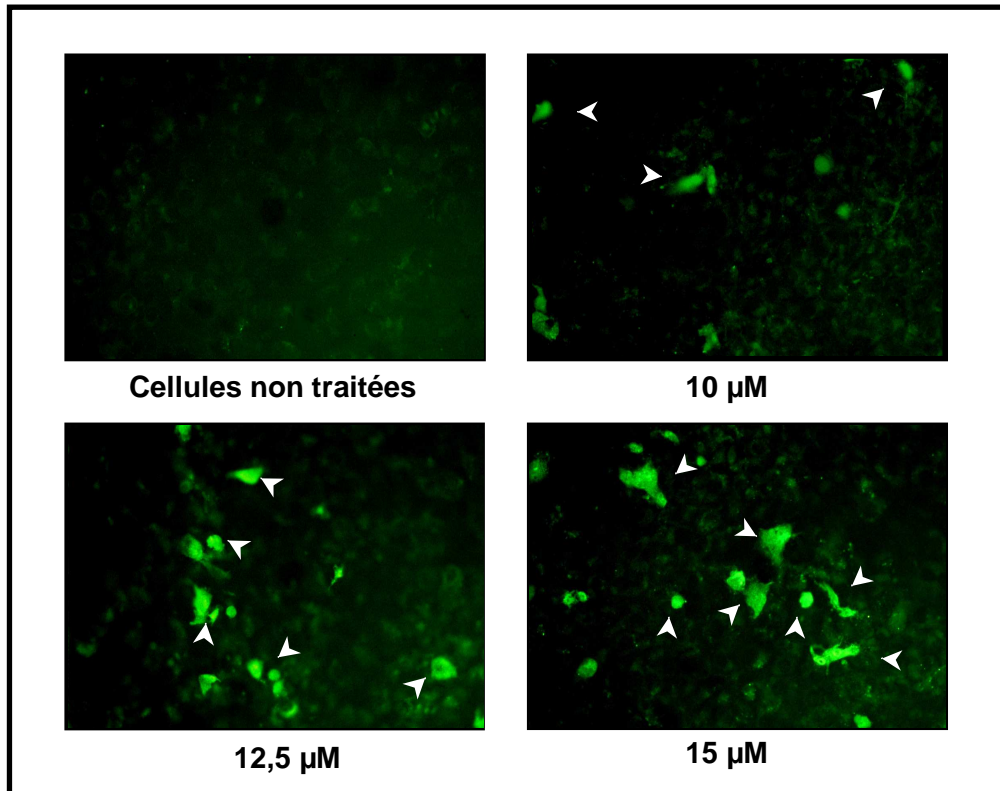


**Figure 61** : Marquage *in situ* des cellules HaCaT avec l'inhibiteur FITC-VAD-FMK après 24 h de traitement avec l'acide ursolique.

Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations.

Grossissement x 200. (n=3).





**Figure 62** : Marquage *in situ* des cellules HaCaT avec l'inhibiteur FITC-VAD-FMK après 48 h de traitement avec l'acide ursolique. Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations. Grossissement x 200. (n=3).

L'utilisation de l'inhibiteur FITC-VAD-FMK nous a permis de montrer une augmentation du nombre des caspases actives quand les cellules HaCaT sont traitées avec l'acide ursolique, ce qui semble indiquer une induction du processus apoptotique caspase-dépendant.

## **IV.2. Etude des activités caspases**

Après avoir montré, *in situ*, que l'acide ursolique induisait l'activation de caspases sur les cellules HaCaT, il nous a paru important d'identifier quelles étaient les caspases impliquées dans ce processus apoptotique.

Les deux voies principales de transduction du signal qui conduisent à l'apoptose sont la voie des récepteurs de la mort et la voie mitochondriale, appelées également voie extrinsèque et voie intrinsèque.

Les modifications biochimiques qui s'opèrent lors du processus apoptotique sont l'activation de caspases initiatrices, en particulier la caspase-8 (voie des récepteurs) et la caspase-9 (voie mitochondriale). L'activation de l'une et/ou de l'autre de ces caspases aboutit, à la suite d'un processus en cascade, à l'activation de caspases exécutrices, et plus particulièrement à l'activation de la caspase-3. Cette dernière induit alors de manière irréversible la mort cellulaire par apoptose.

La caspase-1, impliquée dans le processus inflammatoire, peut également dans certains cas activer la caspase-3.

C'est ainsi que, dans le cas de cellules HaCaT traitées avec de l'acide ursolique, nous sommes intéressés à chacune de ces caspases.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de leur ARNm (technique de RT-PCR), puis dans un deuxième temps nous avons effectué, par spectrofluorimétrie, le dosage de leur activité enzymatique, en utilisant des substrats spécifiques et des inhibiteurs spécifiques.

### **IV.2.1. Etude de la caspase-3**

La caspase-3 est la caspase effectrice majeure directement impliquée dans l'exécution de l'apoptose.

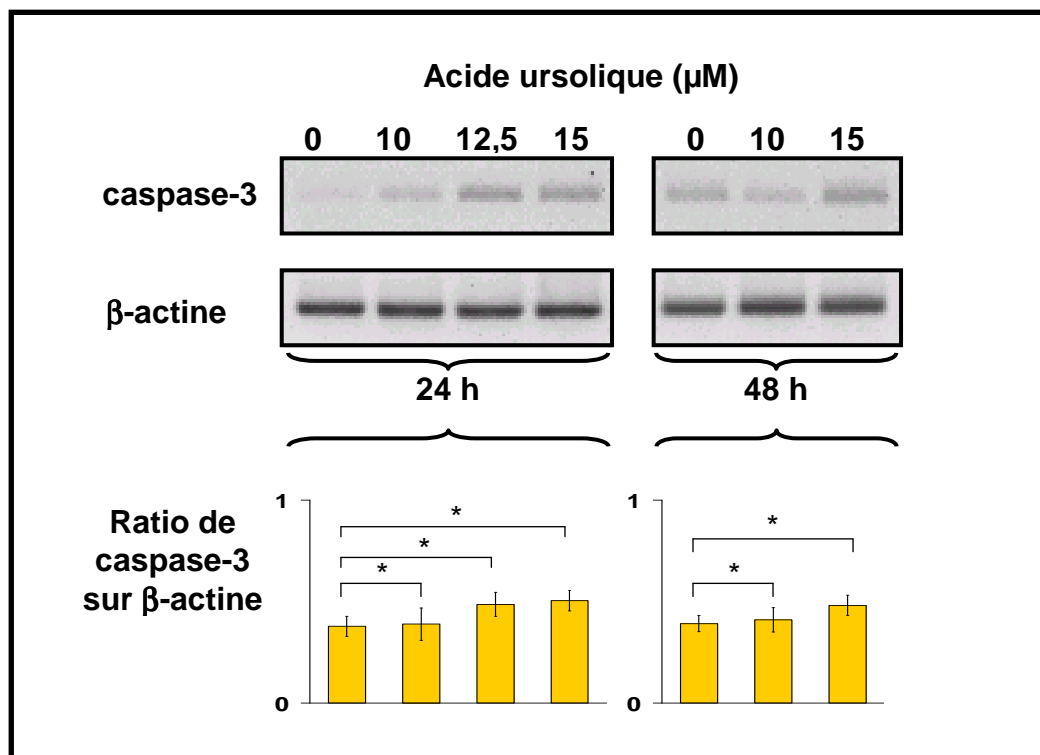
#### **IV.2.1.1. Expression de l'ARNm de la caspase-3**

Après 24 et 48 heures de traitement (Figure 63), l'observation de l'intensité de chacune des bandes montre une augmentation de l'expression de l'ARNm de la caspase-3.

Cette observation est confirmée par le calcul du ratio ARNm de la caspase-3 /  $\beta$ -actine pour chaque bande. Le maximum d'augmentation est observé avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique.

Après 24 heures de traitement, le ratio est de 0,38 pour les cellules non traitées et de 0,51 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,34.

Après 48 heures de traitement, le ratio est de 0,39 pour les cellules non traitées et de 0,48 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,23.



**Figure 63 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-3 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

Technique RT-PCR (n=3). (\* P<0,05)

#### IV.2.1.2. Activité enzymatique de la caspase-3

Après avoir mis en évidence une augmentation de l'expression du gène de la caspase-3 en fonction de la concentration d'acide ursolique, nous avons effectué le dosage de son activité enzymatique.

Pour cela nous avons utilisé un substrat synthétique spécifique de la caspase-3 (Ac-DEVD-AMC). Nous avons également utilisé un inhibiteur synthétique spécifique de la caspase-3 (Ac-DEVD-CHO) pour s'assurer de la spécificité du dosage.

Les valeurs de l'activité enzymatique sont exprimées en unités relative de fluorescence (URF) après un dosage par spectrofluorimétrie (Figure 64).

Après 24 heures de traitement, le dosage enzymatique de la caspase-3 ne fait apparaître aucune différence significative entre les cellules témoins et les cellules traitées.

Après 48 heures de traitement, l'activité enzymatique est très significativement augmentée dès 12,5 $\mu$ M d'acide ursolique :

- cellules non traitées : 721 URF
- cellules traitées avec 12,5  $\mu$ M d'acide ursolique : 1680 URF, soit une augmentation d'un facteur de 2,9
- cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique : 2711 URF, soit une augmentation d'un facteur de 4,7

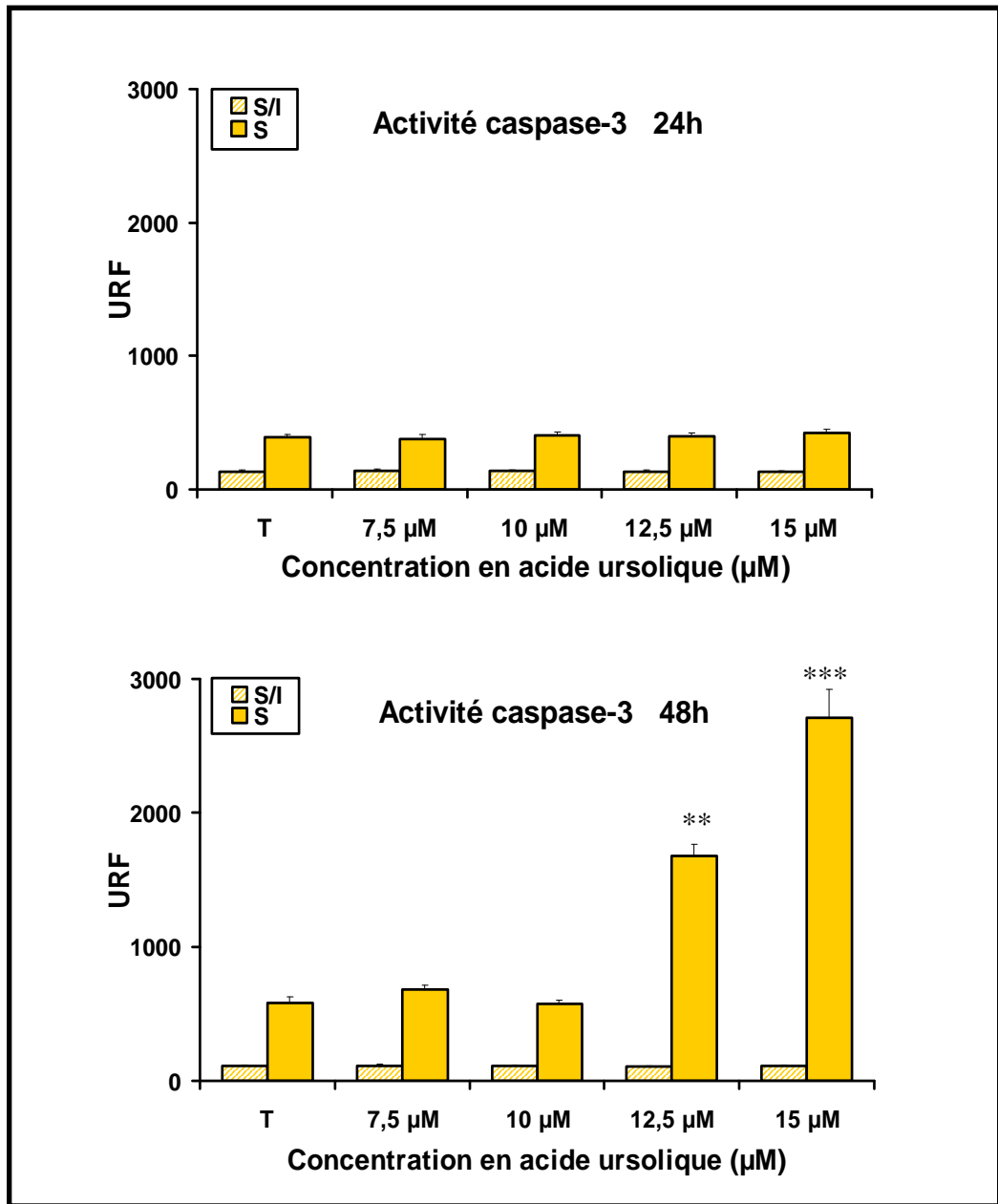
En présence de l'inhibiteur spécifique, l'activité de la caspase-3 ne varie pas ; le niveau de fluorescence basal reste constant, ce qui nous permet de confirmer la spécificité du couple substrat/inhibiteur utilisé pour la caspase-3.

Ces résultats montrent un effet dose et temps dépendants de l'acide ursolique sur l'activation enzymatique de la caspase-3. L'augmentation enzymatique est particulièrement importante après 48 heures de traitement, alors qu'une augmentation de l'expression de l'ARNm de cette caspase est détectée dès 24 heures.

Dans ces premières études relatives aux caspases nous avons mis en évidence :

- une activation des caspases (marquage *in situ* avec FITC-VAD-FMK)
- une activation importante de la caspase exécutive de l'apoptose, la caspase-3 (dosage enzymatique).

Aussi, afin de progresser dans la compréhension du mécanisme d'action de l'acide ursolique, nous nous sommes donc intéressés aux différentes caspases situées en amont de la caspase-3 (caspase-8, caspase-9). Nous avons également étudié la caspase-1 impliquée dans le processus inflammatoire et qui peut dans certains cas activer la caspase-3.



Cellules HaCaT en présence du substrat spécifique de caspase-3

 Ac-DEVD-AMC

Cellules HaCaT en présence du couple substrat/inhibiteur spécifique de caspase-3

 Ac-DEVD-AMC / Ac-DEVD-CHO

**Figure 64** : Activité enzymatique de la caspase-3 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

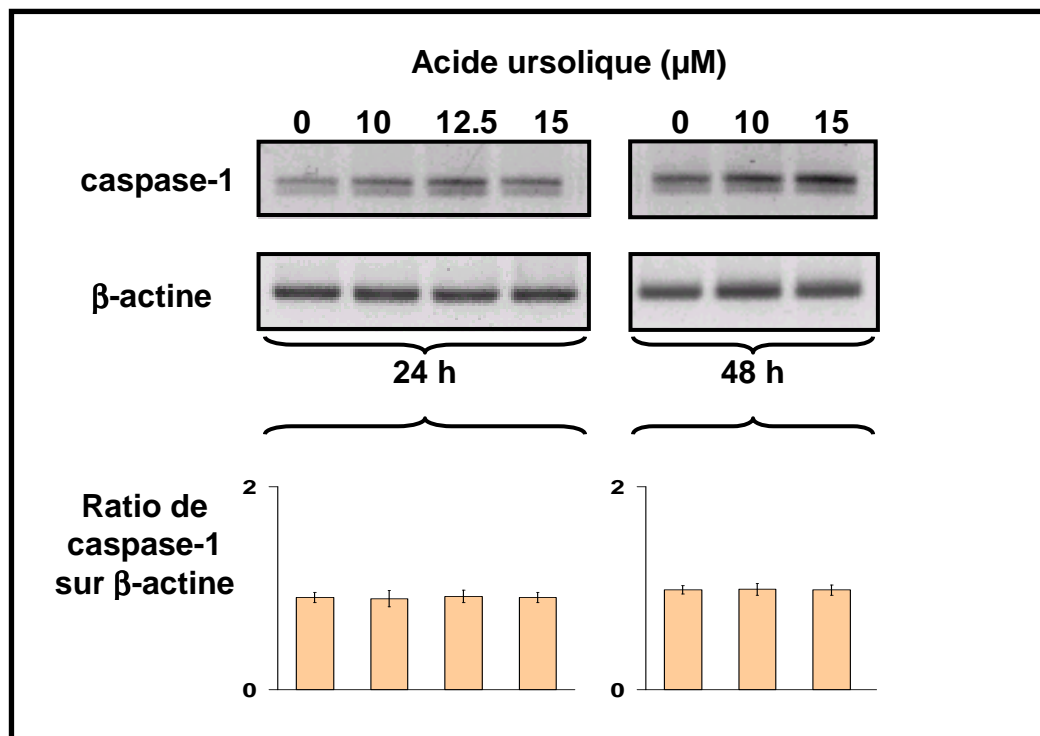
### IV.2.2. Etude de la caspase-1

La caspase-1 est principalement impliquée dans les événements inflammatoires. Dans certains cas, au cours de ces événements, l'activation de la caspase-1 peut induire également l'activation de la caspase-3 et entraîner l'apoptose (Choi *et al.*, 2004).

C'est ainsi que nous avons étudié la caspase-1 pour déterminer si l'activation de la caspase-3 par l'acide ursolique, précédemment mise en évidence, pouvait résulter d'un processus inflammatoire.

#### IV.2.2.1. Expression de l'ARNm de la caspase-1

Après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique, l'expression de l'ARNm de la caspase-1 ne présente aucune variation significative par rapport aux cellules non traitées (Figure 65).

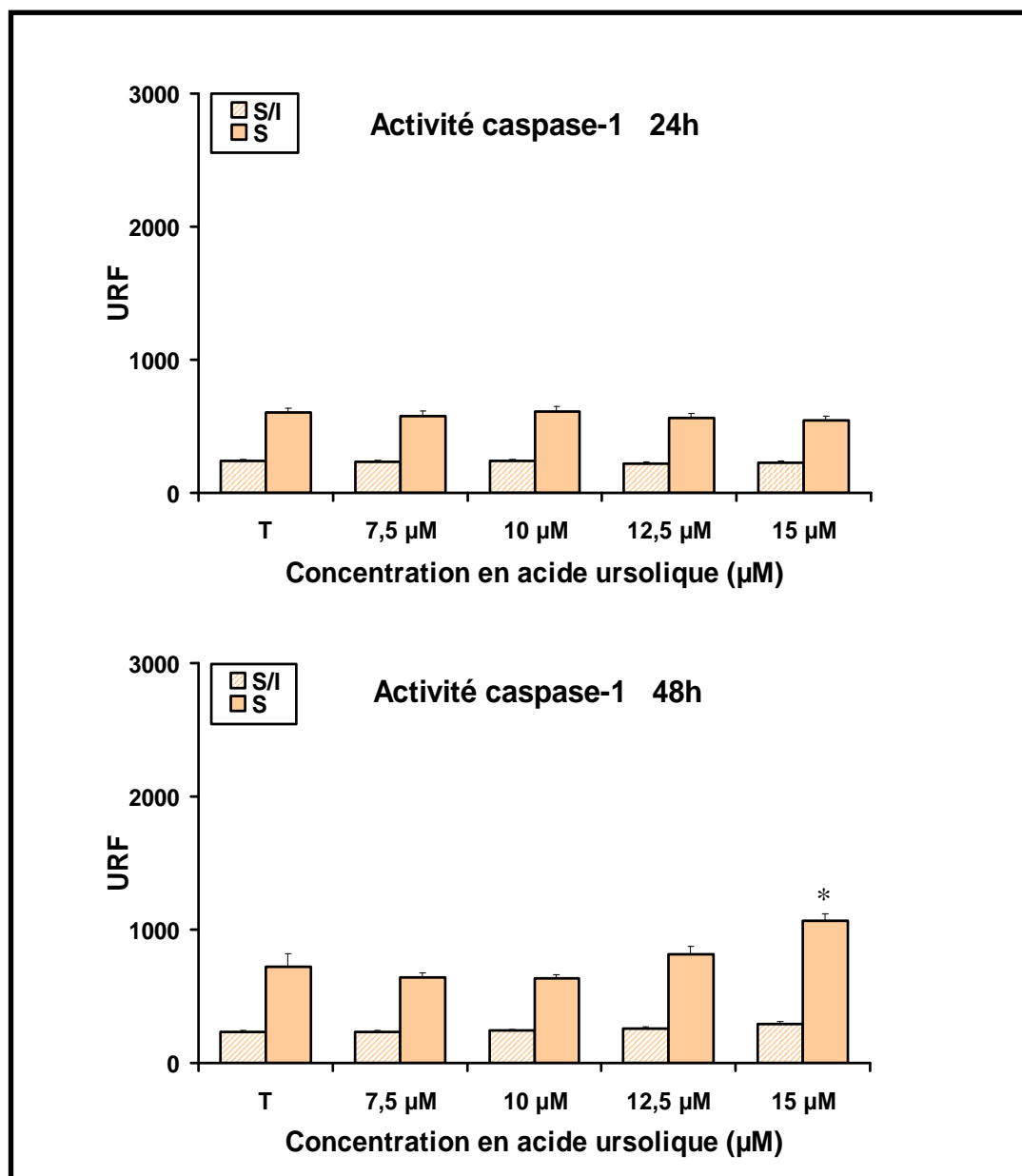


**Figure 65** : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de caspase-1 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

Technique RT-PCR. (n=3).

#### IV.2.2.2. Activité enzymatique de la caspase-1

Les expérimentations ont été réalisées en utilisant un substrat synthétique spécifique de la caspase-1 (Ac-YVAD-AMC) et un inhibiteur spécifique (Ac-YVAD-CHO) (Figure 66).



Cellules HaCaT en présence du substrat spécifique de caspase-1

Cellules HaCaT en présence du couple substrat/inhibiteur spécifique de caspase-1

■ Ac-YVAD-AMC

▨ Ac-YVAD-AMC / Ac-YVAD-CHO

**Figure 66 :** Activité enzymatique de la caspase-1 des cellules HaCaT après 24 h et 48 h de traitement avec l'acide ursolique.

Après 24 heures de traitement avec les différentes concentrations d'acide ursolique, l'activité de la caspase-1 dans les cellules traitées n'évolue pas par rapport à celle des cellules témoins.

Après 48 heures de traitement, une légère augmentation de l'activité est observée pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique :

- cellules non traitées : 721,25 URF
- cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique : 1066,25 URF,  
soit une augmentation d'un facteur de 1,48

L'activité mesurée est bien celle de la caspase-1 puisque la présence de l'inhibiteur spécifique inhibe complètement cette activité.

Il est à noter également que l'activation mise en évidence avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique n'est pas corrélée avec une augmentation de l'expression de l'ARNm.

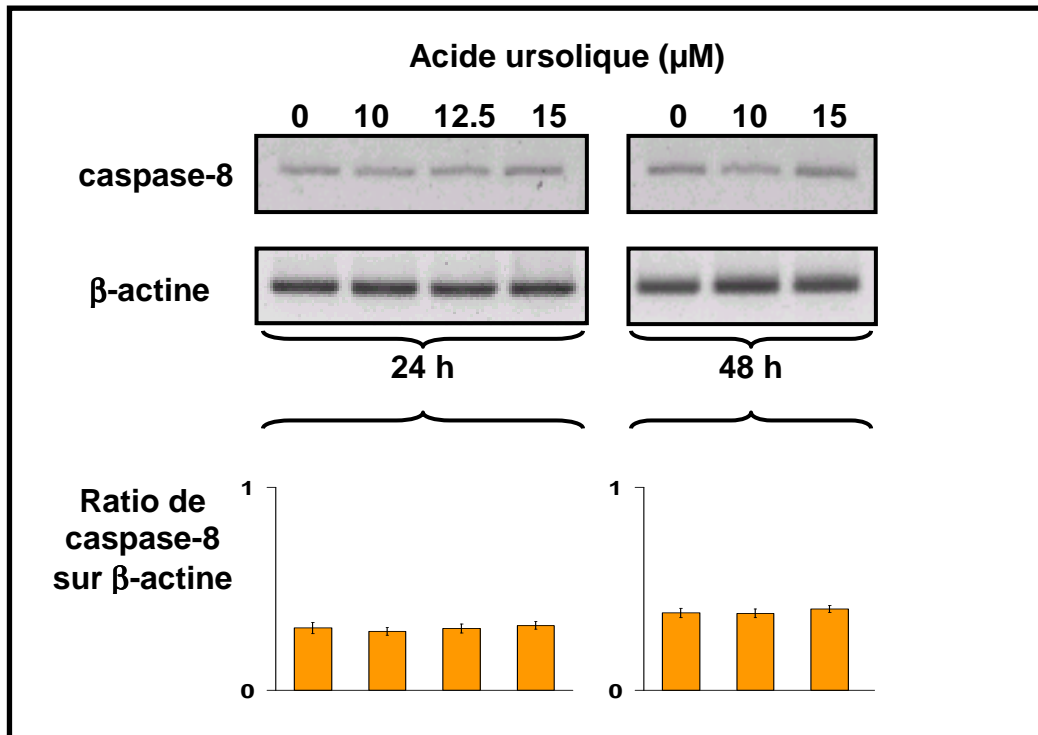
### **IV.2.3. Etude de la caspase-8**

La caspase-8 est une caspase initiatrice de la voie extrinsèque conduisant à l'apoptose. Son étude doit nous permettre d'appréhender si cette voie de transduction peut être impliquée dans le processus apoptotique induit sur les cellules HaCaT par l'acide ursolique.

#### **IV.2.3.1. Expression de l'ARNm de la caspase-8**

Après 24 et 48 heures de traitement, l'observation des bandes obtenues en RT-PCR, ainsi que le calcul du ratio caspase-8 /  $\beta$ -actine ne fait apparaître aucune différence significative entre les cellules témoins et les cellules traitées (Figure 67).





**Figure 67 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-8 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

Technique RT-PCR (n=3)

#### IV.2.3.2. Activité enzymatique de la caspase-8

Le substrat spécifique de la caspase-8 utilisé pour cette étude est Ac-IETD-AMC et l'inhibiteur spécifique est Ac-IETD-CHO (Figure 68).

Les cellules HaCaT présentent une forte activité basale de la caspase-8.

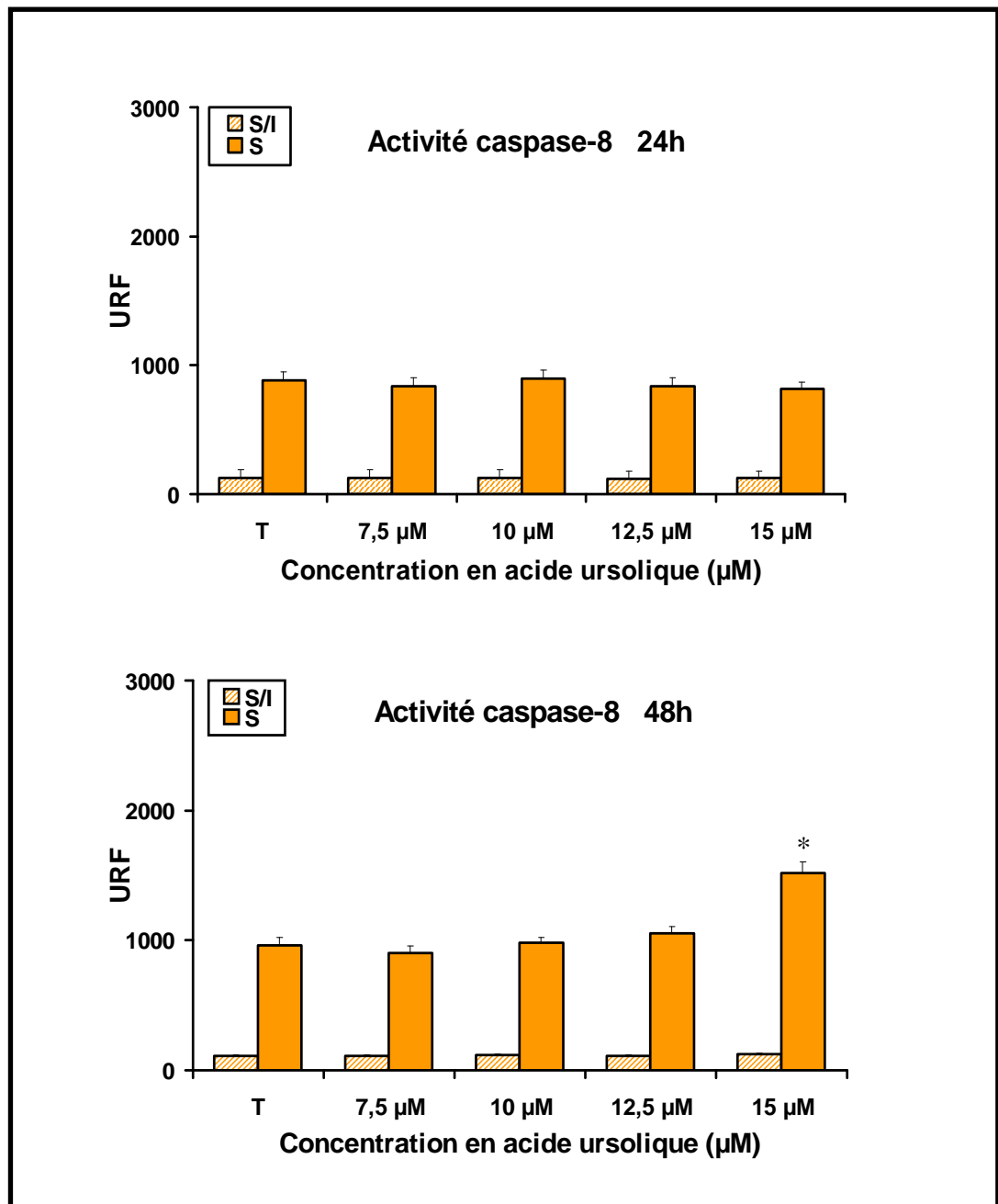
Après 24 heures de traitement, l'acide ursolique n'induit pas de variation de l'activité de la caspase-8 par rapport aux cellules témoins.

Après 48 heures de traitement, on observe une augmentation de l'activité de la caspase, mais uniquement avec 15 μM d'acide ursolique :

- cellules non traitées : 962 URF
- cellules traitées avec 15 μM d'acide ursolique : 1518 URF soit une augmentation d'un facteur de 1,57

La présence de l'inhibiteur spécifique réprime complètement l'activité de la caspase-8, ce qui confirme la spécificité du substrat de la caspase-8.

Avec 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, pour la caspase-8 et de la même manière que pour la caspase-1, nous avons mesuré une augmentation de l'activité enzymatique sans pour autant avoir mis en évidence une surexpression de l'ARNm.



Cellules HaCaT en présence du substrat spécifique de caspase-8

Cellules HaCaT en présence du couple substrat/inhibiteur spécifique de caspase-8

 **Ac-IETD-AMC**

 **Ac-IETD-AMC / Ac-IETD-CHO**

**Figure 68 :** Activité enzymatique de la caspase-8 des cellules HaCaT après 24 h et 48 h de traitement avec l'acide ursolique.

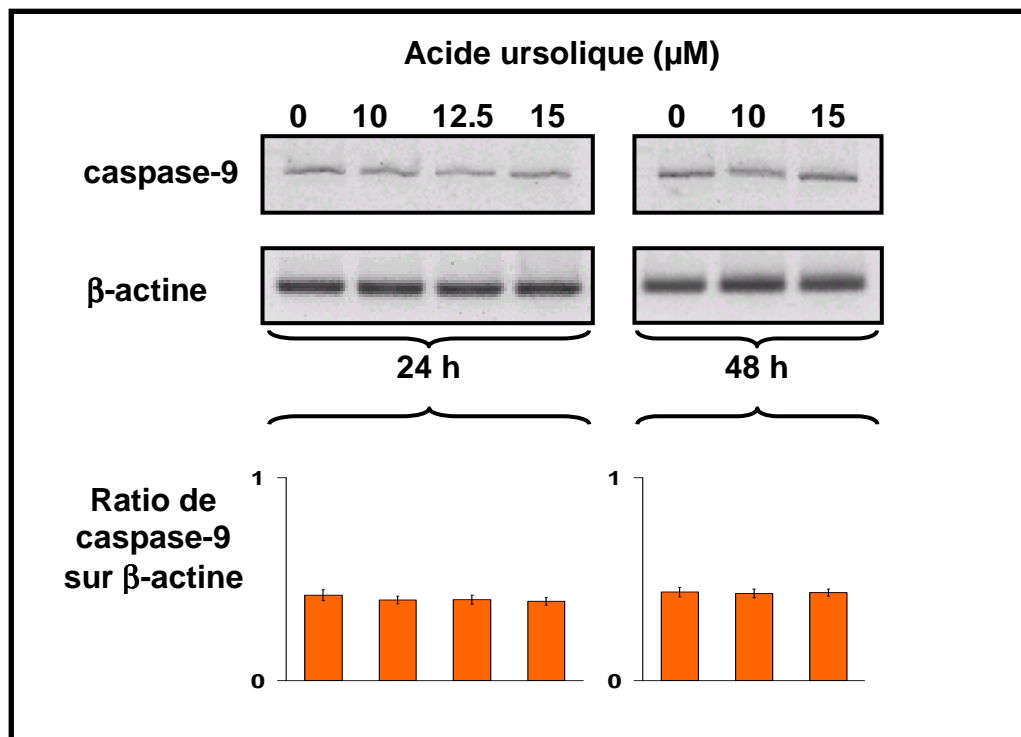
#### IV.2.4. Etude de la caspase-9

La caspase-9 caractérise la voie apoptotique intrinsèque ou voie mitochondriale.

Son étude doit nous permettre d'appréhender si cette voie de transduction peut être impliquée dans le processus apoptotique induit par l'acide ursolique sur les cellules HaCaT.

##### IV.2.4.1. Expression de l'ARNm de la caspase-9

Après 24 et 48 heures de traitement, l'acide ursolique n'entraîne aucune variation significative de l'expression de l'ARNm de la caspase-9 (Figure 69).

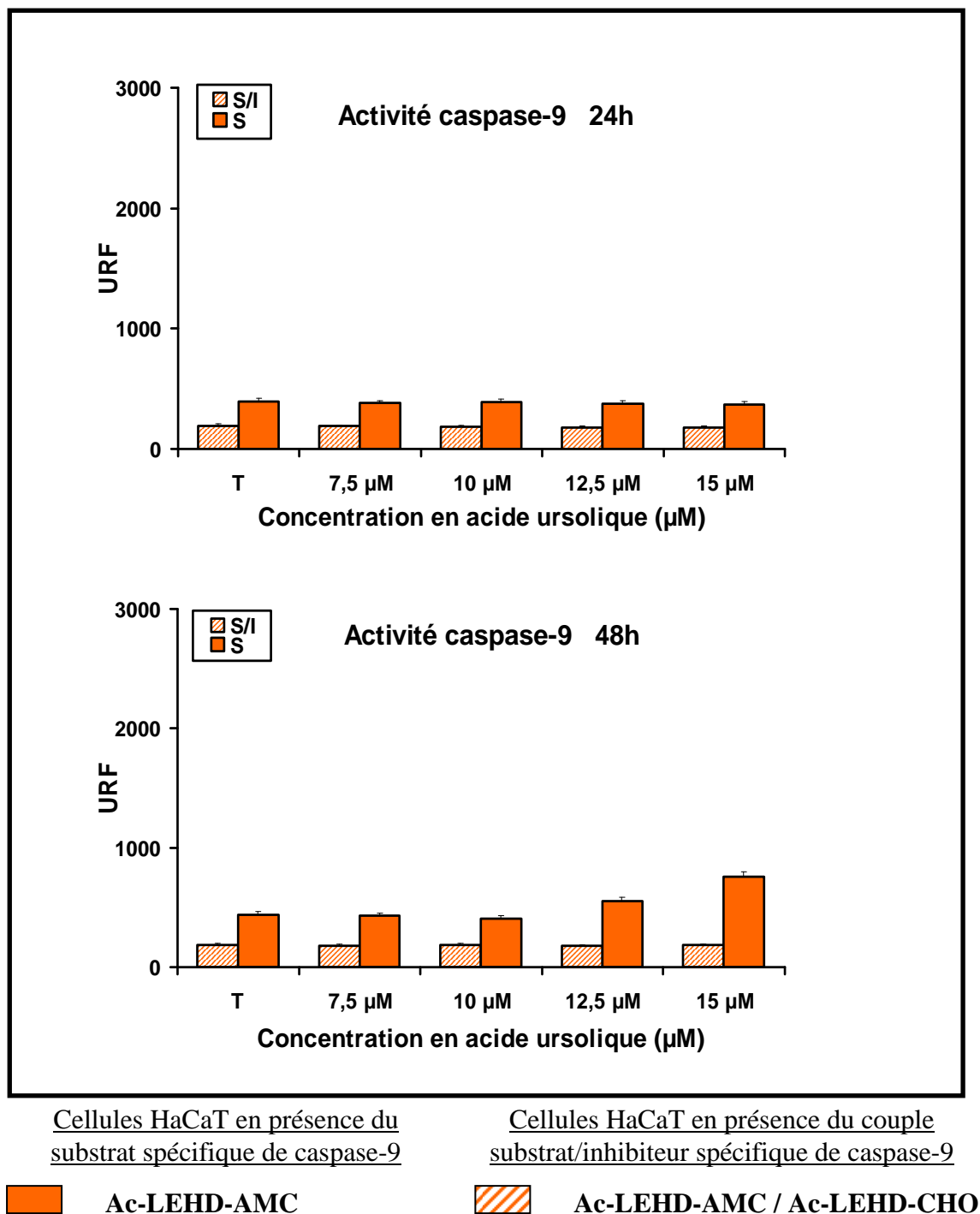


**Figure 69 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-9 des cellules HaCat après 24 et 48 heures de traitement.

Technique RT-PCR (n=3)

#### IV.2.4.2. Activité enzymatique de la caspase-9

Pour l'étude de l'activité enzymatique de la caspase-9, nous avons utilisé le substrat spécifique (Ac-LEHD-AMC) et l'inhibiteur spécifique (Ac-LEHD-CHO) (Figure 70).



**Figure 70 :** Activité enzymatique de la caspase-9 des cellules HaCaT après 24 h et 48 h de traitement avec l'acide ursolique. \*

Après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique, aucune variation de l'activité enzymatique n'est observée par rapport à l'activité des cellules témoins.

Après 48 heures de traitement, une augmentation de l'activité est mesurée à partir de 12,5  $\mu\text{M}$  :

-cellules non traitées : 441 URF

-cellules traitées avec 12,5  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique : 554 URF soit une augmentation d'un facteur de 1,26

-cellules traitées avec 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique : 766 URF soit une augmentation d'un facteur de 1,71

La présence de l'inhibiteur spécifique montre que l'activité mesurée est bien celle de la caspase-9.

Comme précédemment avec la caspase-1 et la caspase-8, l'activation de la caspase-9 n'est pas corrélée avec une surexpression de l'ARNm.

#### **IV.2.5. Etude comparative de l'activité enzymatique des caspases étudiées**

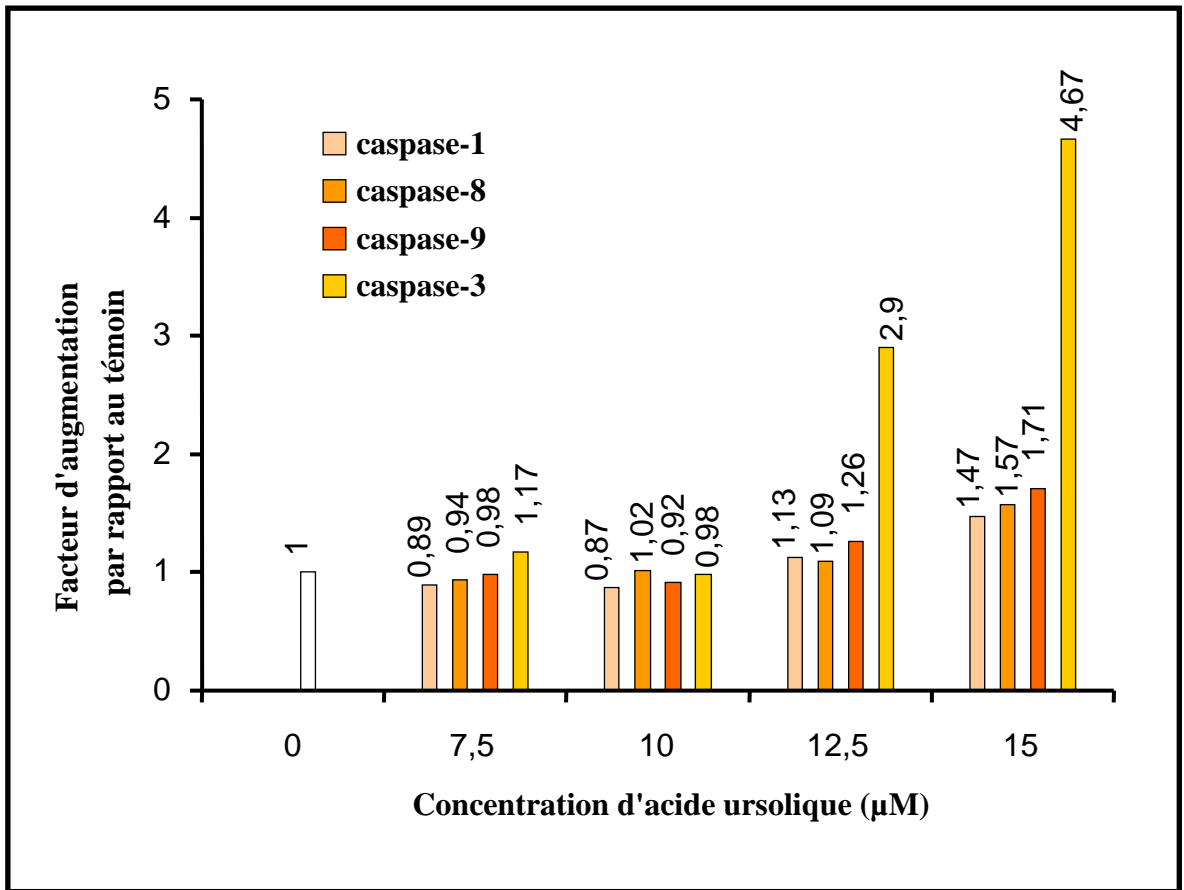
Après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique, aucune des caspases étudiées ne présente une augmentation significative de son activité (étude comparative non présentée).

Après 48 heures de traitement (Figure 71), l'activité de la caspase-3 est très nettement augmentée à partir de 12,5  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique.

L'activité de la caspase-9 est également augmentée dès 12,5  $\mu\text{M}$  mais dans une bien moindre proportion.

Les activités de la caspase-8 et de la caspase-1 sont également augmentées mais uniquement avec 15  $\mu\text{M}$ , et dans une proportion plus faible que celle de la caspase-9.

Ces résultats peuvent suggérer que la voie mitochondriale (caspase-9) pourrait être la voie initiatrice du processus apoptotique dans les cellules HaCaT.



**Figure 71** : Etude comparative des facteurs d'augmentation de l'activité des caspases des cellules HaCaT après 48 heures de traitement.

## V. Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

La première perturbation cellulaire détectable au cours du processus apoptotique issu de la voie mitochondriale est une dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial.

Ainsi, après avoir mis en évidence l'activation de la caspase-9, suggérant l'implication de la voie mitochondriale dans le processus apoptotique, nous avons étudié l'évolution du potentiel mitochondrial des cellules HaCaT traitées avec de l'acide ursolique.

### V.1 Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial par marquage *in situ* avec le fluorochrome JC-1

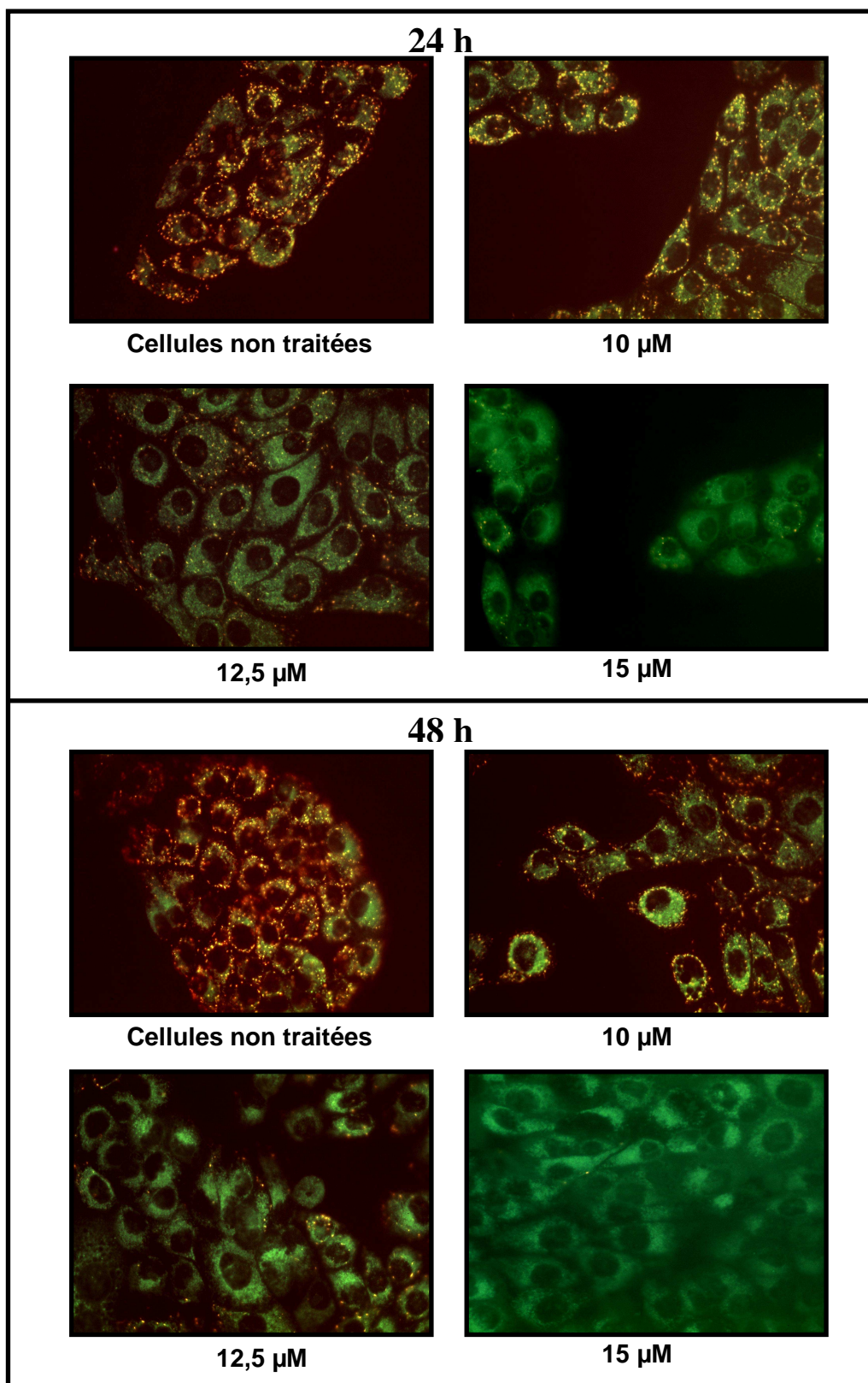
Nous avons effectué un marquage *in situ* avec le fluorochrome JC-1 sur les cellules HaCaT pour avoir une vision qualitative du potentiel mitochondrial de ces cellules quand elles sont traitées avec de l'acide ursolique. Le marquage est opéré uniquement sur les cellules vivantes, adhérentes au support de la boîte de culture ; les cellules mortes sont éliminées par lavage lors du protocole opératoire.

La population cellulaire « normale » présente un haut potentiel mitochondrial qui favorise la pénétration de la sonde dans les mitochondries. Sous l'influence de ce haut potentiel, le fluorochrome, initialement sous forme de monomères, va former, à l'intérieur de la mitochondrie, des agrégats qui fluorescent dans le orange. En revanche, les cellules en cours d'apoptose à bas potentiel mitochondrial laissent pénétrer la sonde JC-1 en petite quantité : le fluorochrome reste alors sous forme de monomères qui fluorescent dans le vert.

La discrimination entre les cellules à haut potentiel et les cellules apoptotiques à bas potentiel, est réalisée par une observation du tapis cellulaire en microscopie à fluorescence (Figure 72).

Après 24 et 48 heures d'incubation, les cellules non traitées présentent majoritairement une fluorescence orange, ce qui indique la présence de cellules intègres avec un haut potentiel mitochondrial.

Après 24 et 48 heures d'incubation, en ce qui concerne les cellules traitées, nous pouvons observer, dès 10  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique la présence de cellules à bas potentiel mitochondrial qui fluorescent dans le vert. Au delà de 10  $\mu\text{M}$ , le nombre de cellules à bas potentiel augmente en fonction de la concentration d'acide ursolique, alors que de manière concomitante le nombre de cellules à haut potentiel diminue.



**Figure 72 :** Marquage *in situ* du potentiel mitochondrial membranaire des cellules HaCaT avec le fluorochrome JC-1 après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique.

Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations.

Grossissement x 200. (n=3).



La fluorescence verte plus intense après 48 heures d'incubation semble signifier une chute de potentiel plus marquée qu'à 24 heures.

Cette analyse *in situ* nous indique que l'acide ursolique induit, de manière dose et temps dépendants, la chute du potentiel mitochondrial membranaire des cellules HaCaT.

L'observation des différentes photographies fait également apparaître une hétérogénéité intra-cellulaire entre la fluorescence orange et la fluorescence verte, ce qui montre l'évolution du potentiel mitochondrial dans une même cellule.

## **V.2. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial en cytométrie de flux**

Le marquage *in situ* des cellules HaCaT, avec le fluorochrome JC-1, nous a permis de montrer qualitativement que l'acide ursolique induisait une chute du potentiel mitochondrial. Pour quantifier cette chute de potentiel, nous avons effectué un double marquage cellulaire, suivi d'une analyse en cytométrie de flux.

Dans un premier temps, à partir de la population cellulaire totale, le marquage des cellules HaCaT avec le fluorochrome TOTO-3 permet de discriminer, par une analyse en CMF, les cellules vivantes (nommées TOTO-3<sup>-</sup>) et les cellules mortes (TOTO-3<sup>+</sup>).

Dans un deuxième temps, c'est uniquement à partir de la population de cellules vivantes (cellules « normales » et cellules en cours d'apoptose), que l'évolution du potentiel mitochondrial est suivie en CMF grâce au fluorochrome JC-1.

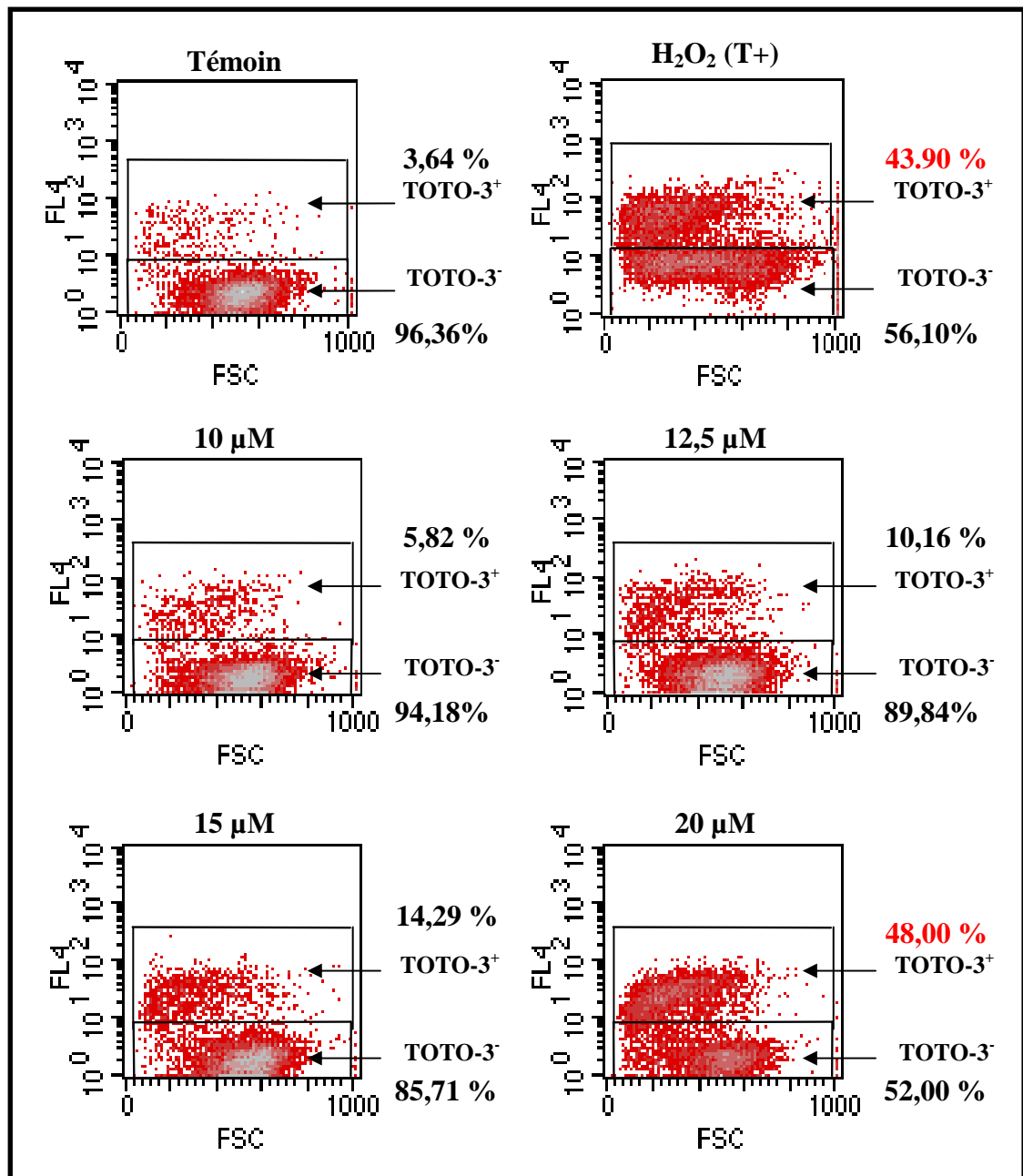
Enfin, à partir de la population totale, nous avons déterminé le taux d'apoptose résultant de la voie mitochondriale, à l'aide d'un double marquage TOTO-3 et JC-1.

### **V.2.1. Discrimination entre les cellules vivantes et les cellules mortes avec le fluorochrome TOTO-3**

Les cellules mortes ayant perdu leur intégrité membranaire laissent pénétrer la sonde TOTO-3 qui va alors s'insérer dans l'ADN nucléaire. Cette population cellulaire, nommée TOTO-3<sup>+</sup> va émettre une fluorescence dans le rouge.

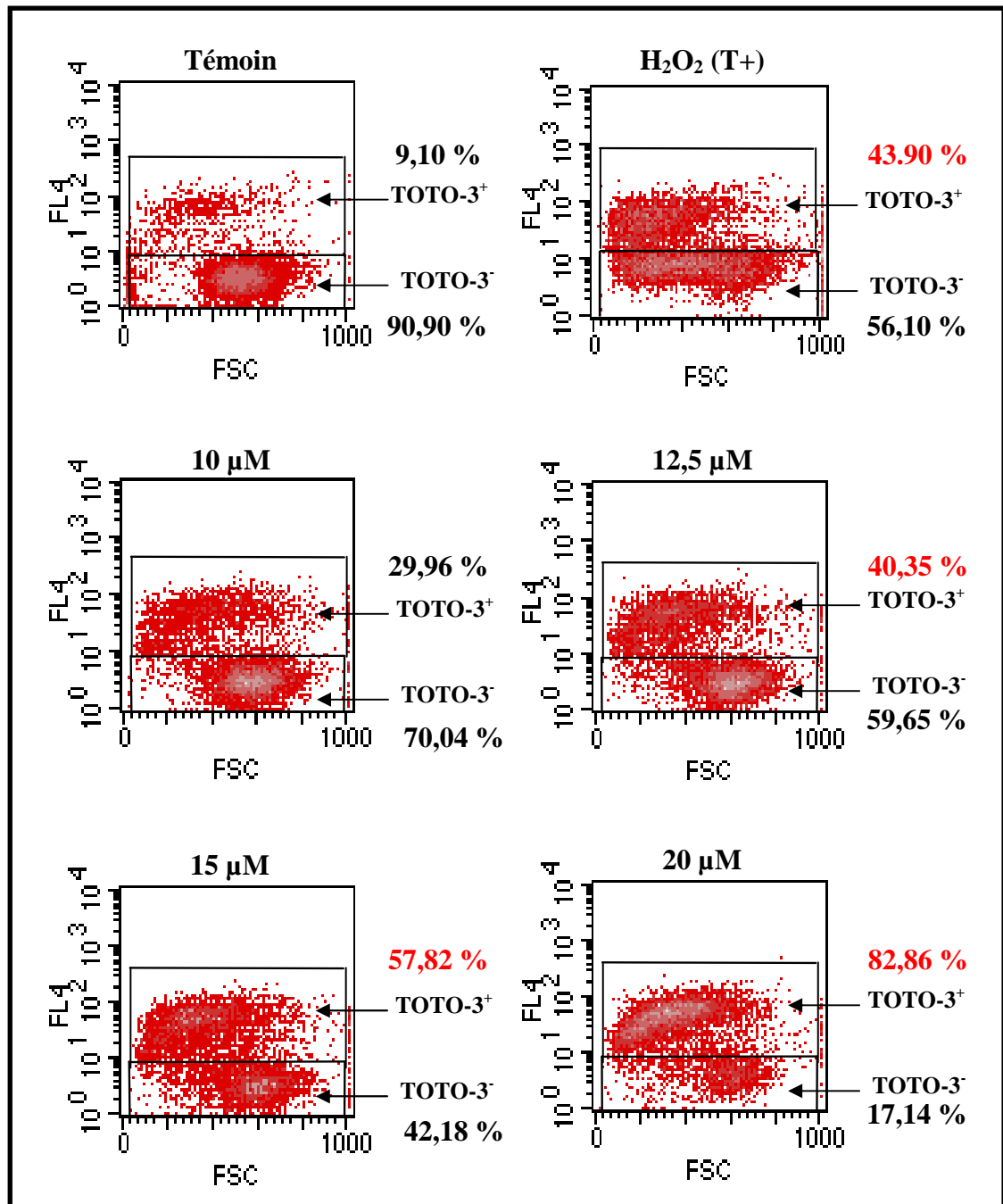
Les figures 73 et 74 représentent, à partir de la population totale, les cytogrammes de répartition entre les cellules vivantes et les cellules mortes ; cette discrimination est nécessaire pour poursuivre l'étude du potentiel transmembranaire mitochondrial.

Cette discrimination met également en évidence l'effet anti-prolifératif dose et temps dépendants de l'acide ursolique sur les cellules HaCaT : la valeur de l'IC<sub>50</sub> est proche de 20 µM après 24 heures de traitement, et est comprise entre 12,5 et 15 µM d'acide ursolique après 48 heures.



**Figure 73 :** Cytogrammes de répartition des cellules HaCaT mortes (TOTO-3<sup>+</sup>) et vivantes (TOTO-3<sup>-</sup>) après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique.

FSC (Forward Scatter) en fonction de FL4 (l'intensité relative de fluorescence rouge en TOTO-3). (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Témoïn positif). Cytogrammes représentatifs de l'une des trois expérimentations (n=3).



**Figure 74 :** Cytogrammes de répartition des cellules HaCaT mortes (TOTO-3<sup>+</sup>) et vivantes (TOTO-3<sup>-</sup>) après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

FSC (Forward Scatter) en fonction de FL4 (l'intensité relative de fluorescence rouge en TOTO-3). (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Témoïn positif). Cytogrammes représentatifs de l'une des trois expérimentations (n=3).

### **V.2.2. Evolution du potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules vivantes (TOTO-3<sup>-</sup>) à l'aide du fluorochrome JC-1**

Cette étude est réalisée sur la population de cellules vivantes (TOTO-3<sup>-</sup>) discriminée précédemment. Le marquage avec le fluorochrome JC-1 permet de mettre en évidence le niveau du potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules « normales » et des cellules en cours d'apoptose. Les cellules en apoptose secondaire, qui ont perdu leur intégrité membranaires et considérées comme mortes, sont exclues de cette analyse.

Comme précédemment décrit (marquage *in situ* avec JC-1), les cellules normales avec un haut potentiel transmembranaire mitochondrial fluorescent dans le orange, alors que les cellules en cours d'apoptose fluorescent dans le vert.

Les figures 75 et 76 représentent les cytogrammes de répartition entre les cellules à haut potentiel transmembranaire mitochondrial et les cellules à bas potentiel transmembranaire mitochondrial.

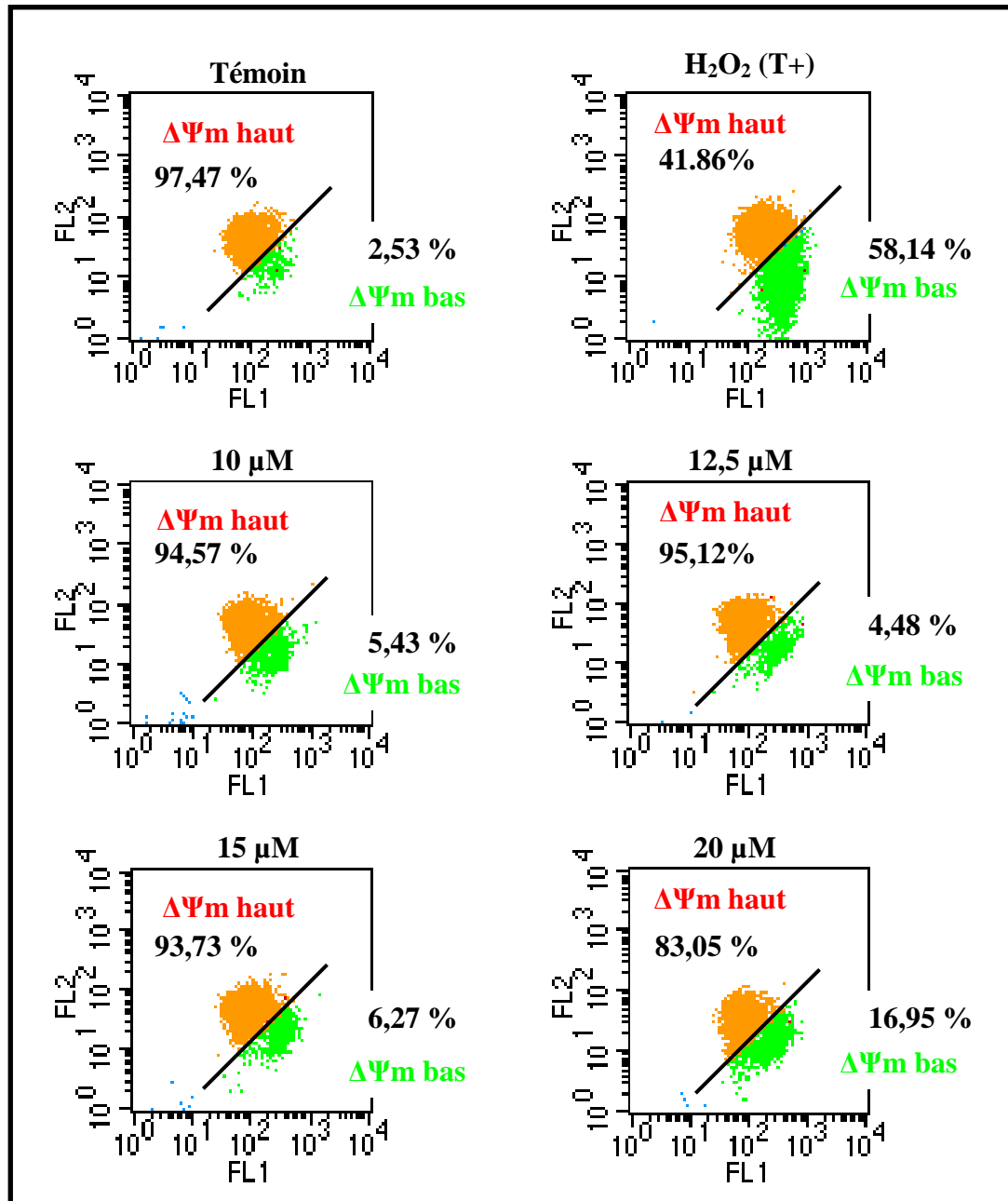
Les résultats compilés et présentés sous forme d'histogrammes (Figure 77) montrent que le nombre de cellules à bas potentiel transmembranaire mitochondrial augmente progressivement avec la concentration d'acide ursolique :

Après 24 heures de traitement :

- 2,53 % de cellules à bas potentiel dans les cellules non traitées
- 16,95 % de cellules à bas potentiel avec 20  $\mu$ M d'acide ursolique

Après 48 heures de traitement :

- 8,16 % de cellules à bas potentiel dans les cellules non traitées
- 19,86 % de cellules à bas potentiel avec 20  $\mu$ M d'acide ursolique

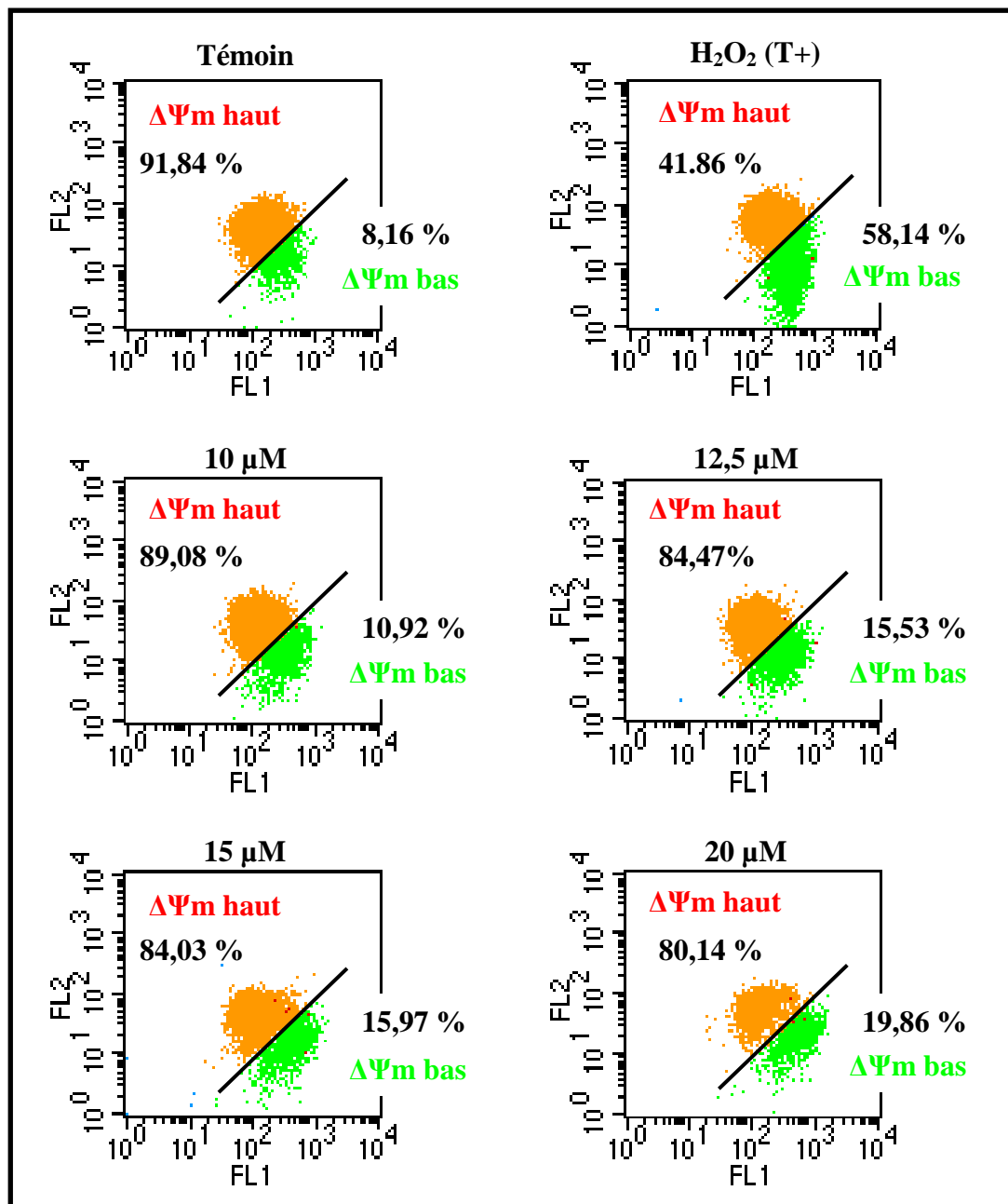


**Figure 75 :** Sur les cellules HaCaT vivantes (TOTO-3<sup>-</sup>), cytogrammes de répartition des cellules à haut potentiel et des cellules à bas potentiel transmembranaire mitochondrial après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Analyse en CMF avec JC-1 (n=3). (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Témoïn positif)

FL1 : intensité relative de fluorescence verte du JC-1

FL2 : intensité relative de fluorescence orange du JC-1

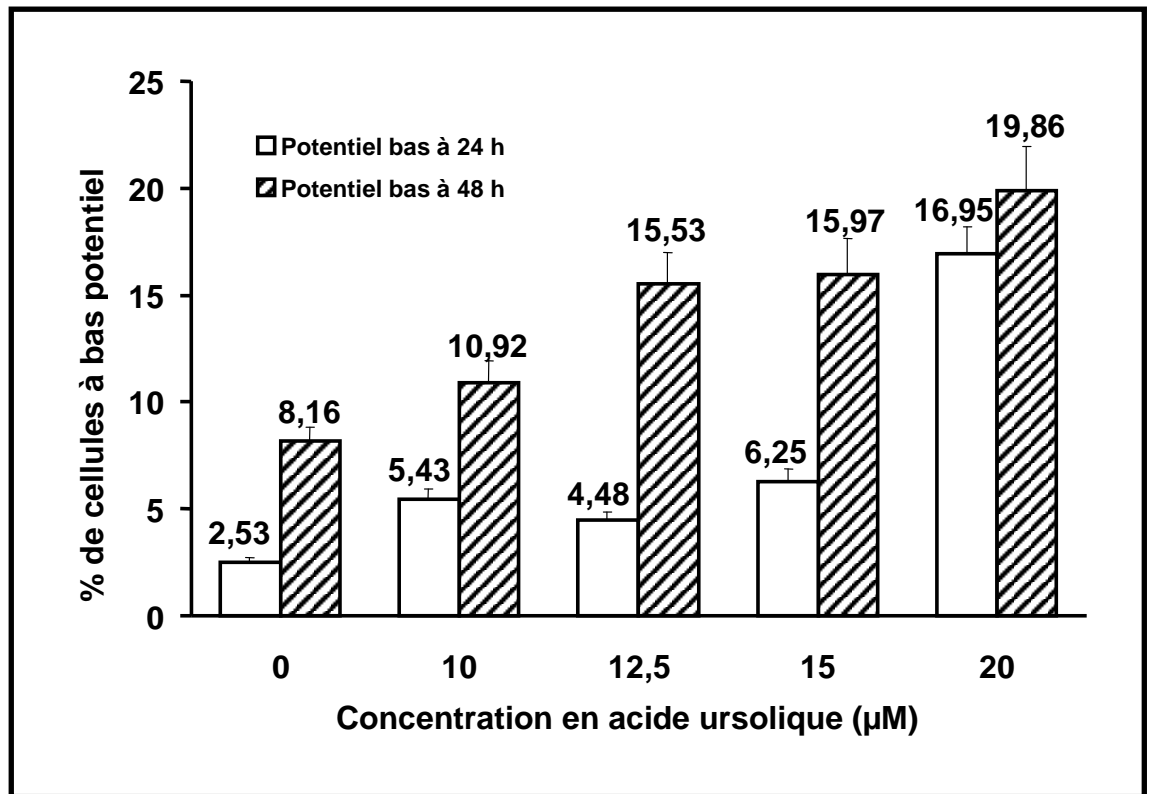


**Figure 76 :** Sur les cellules HaCaT vivantes (TOTO-3<sup>+</sup>), cytogrammes de répartition des cellules à haut potentiel et des cellules à bas potentiel transmembranaire mitochondrial après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Analyse en CMF avec JC-1 (n=3). (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Témoin positif)

FL1 : intensité relative de fluorescence verte du JC-1

FL2 : intensité relative de fluorescence orange du JC-1



**Figure 77 :** Histogrammes de répartition des cellules HaCaT possédant des mitochondries à bas potentiel mitochondrial après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

### **V.2.3. Détermination du taux d'apoptose sur la population cellulaire HaCaT totale à l'aide du double marquage TOTO-3 et JC-1 en CMF**

A partir des résultats précédents obtenus en cytométrie de flux et grâce à une analyse multiparamétrique, nous pouvons déterminer sur la population cellulaire totale le pourcentage de cellules en cours d'apoptose issue de la voie mitochondriale.

Les figures 78 et 79 représentent, à partir de la population cellulaire totale, les cytogrammes de répartition des trois sous types de population :

- cellules mortes, TOTO-3<sup>+</sup>,
- cellules vivantes « normales », TOTO-3<sup>-</sup>, à haut potentiel mitochondrial,
- cellules vivantes, TOTO-3<sup>-</sup>, en cours d'apoptose, à bas potentiel mitochondrial.

Les résultats de l'analyse en CMF sont compilés et présentés dans le tableau 14.

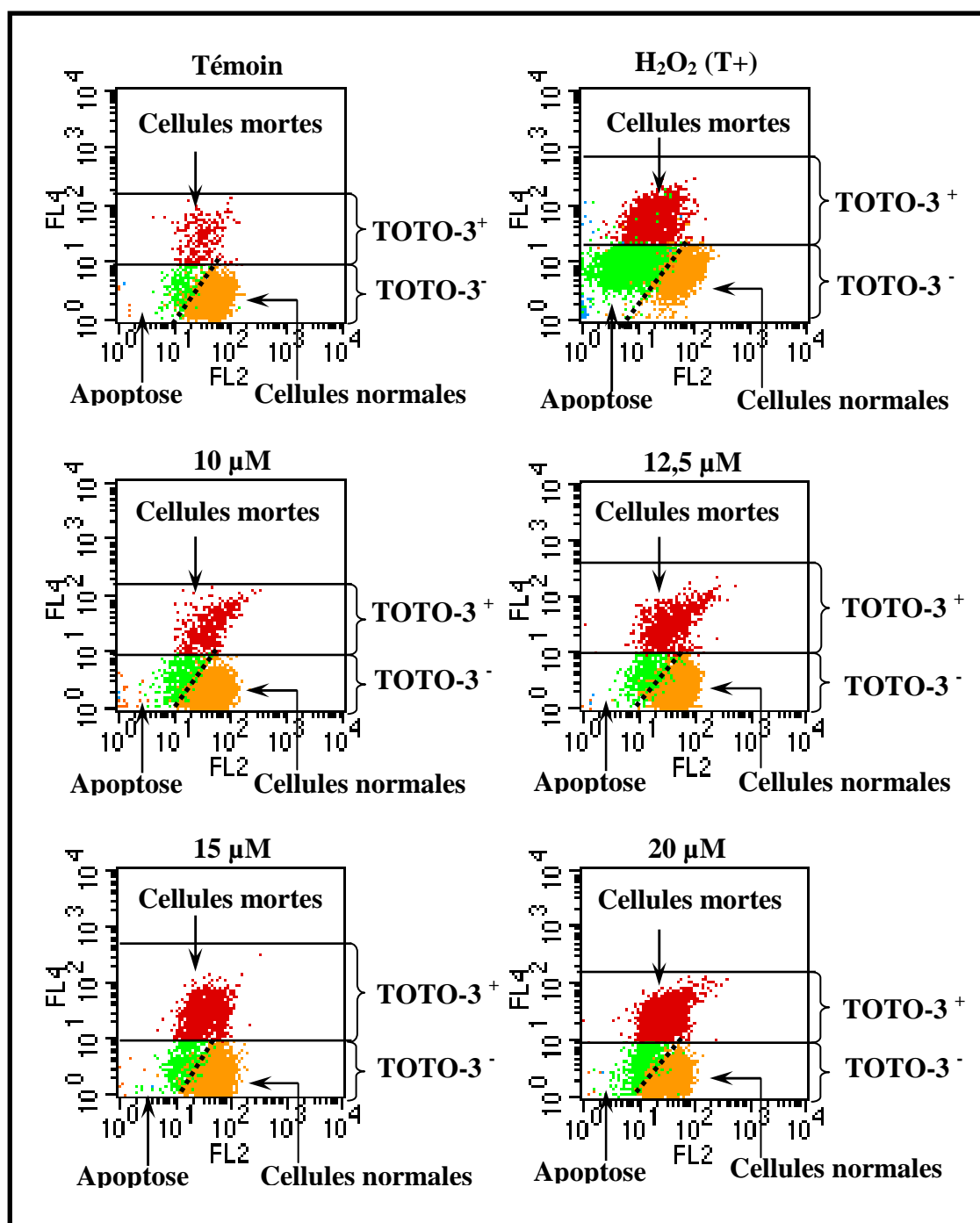
Après 24 heures de traitement, le pourcentage de cellules en cours d'apoptose augmente très progressivement en fonction de la concentration d'acide ursolique : de 3,81 % pour les cellules non traitées à 13,88 % pour les cellules traitées avec 20  $\mu$ M d'acide ursolique.

Après 48 heures de traitement, les cellules en cours d'apoptose n'exèdent pas 12,17% avec 12,5  $\mu$ M d'acide ursolique (7,39 % pour les cellules non traitées). Le pourcentage de cellules en cours d'apoptose diminue avec 15 et 20  $\mu$ M, respectivement 8,90 et 4,43 %. Cette diminution peut s'expliquer par le fait que le nombre de cellules mortes est particulièrement important avec ces deux concentrations, en particulier avec 20  $\mu$ M d'acide ursolique (79,75 % de cellules mortes). On peut penser également qu'un nombre non négligeable de cellules ait évolué vers un stade d'apoptose secondaire (ou tardive), ce qui minimise le nombre de cellules apoptotiques pris en compte par cette technique.

Cette analyse en CMF nous indique que l'acide ursolique a un effet relativement faible sur la chute du potentiel mitochondrial des cellules HaCaT et par conséquent sur le nombre de cellules apoptotiques qui découlent de cette voie.

Ainsi la voie mitochondriale ne semble pas être la voie de transduction principale dans le processus apoptotique induit par l'acide ursolique.





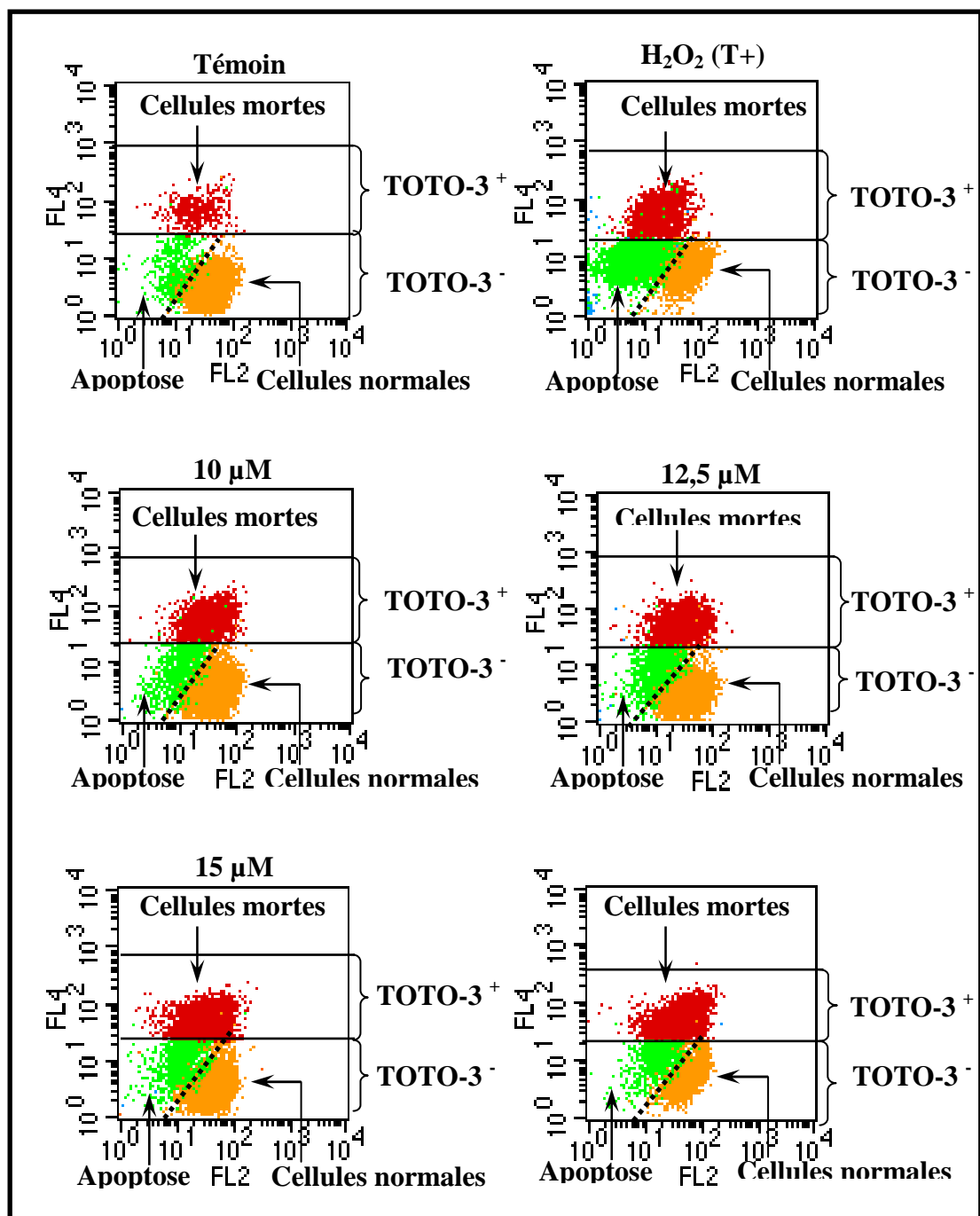
FL2 : Fluorescence orange vs FL4 : Fluorescence rouge ( $H_2O_2$ =Témoin positif).

**Figure 78 :** Cytogrammes de répartition des trois sous-populations des cellules HaCaT à partir de la population cellulaire totale après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique. Analyse en CMF avec TOTO-3 et JC-1.

TOTO-3<sup>+</sup> : cellules mortes (nécrose + apoptose II<sup>ère</sup>)

TOTO-3<sup>-</sup> : cellules vivantes « normales » = haut potentiel mitochondrial et cellules vivante en apoptose I<sup>ère</sup> = bas potentiel mitochondrial.

Cytogrammes représentatifs de l'une des trois expérimentations (n=3).



FL2 : Fluorescence orange vs FL4 : Fluorescence rouge ( $H_2O_2$ =Témoïn positif).

**Figure 79 :** Cytogrammes de répartition des trois sous-populations des cellules HaCaT à partir de la population cellulaire totale après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. Analyse en CMF avec TOTO-3 et JC-1.

TOTO-3<sup>+</sup> : cellules mortes (nécrose + apoptose II<sup>ère</sup>)

TOTO-3<sup>-</sup> : cellules vivantes « normales » = haut potentiel mitochondrial et cellules vivante en apoptose I<sup>ère</sup> = bas potentiel mitochondrial.

Cytogrammes représentatifs de l'une des trois expérimentations (n=3).

Temps	Traitement		Cellules vivantes (%) (TOTO-3 <sup>-</sup> )		Cellules mortes (%) (TOTO-3 <sup>+</sup> )	Population totale (%)
			Apoptose (~ΔΨ <sub>m</sub> bas)	Normales (~ΔΨ <sub>m</sub> haut)		
-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (T+)		27,92±2,24	35,04±3,40	37,04±2,46	100,00
24 h	Témoin		3,81±0,45	93,12±2,56	3,07±0,24	100,00
	[UA] (μM)	10	6,95±0,96	87,71±1,85	5,34±1,33	100,00
		12,5	5,33±1,02	85,48±1,62	9,19±1,56	100,00
		15	6,36±1,12	80,63±1,89	13,01±2,19	100,00
		20	13,88±1,74	41,72±2,54	44,40±3,51	100,00

Temps	Traitement		Cellules vivantes (%) (TOTO-3 <sup>-</sup> )		Cellules mortes (%) (TOTO-3 <sup>+</sup> )	Population totale (%)
			Apoptose (~ΔΨ <sub>m</sub> bas)	Normales (~ΔΨ <sub>m</sub> haut)		
-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (T+)		27,92±2,24	35,04±3,40	37,04±2,46	100,00
48 h	Témoin		7,39±1,88	84,04±2,23	8,57±1,52	100,00
	[UA] (μM)	10	9,76±1,31	62,28±1,99	27,96±1,74	100,00
		12,5	12,17±1,06	48,56±1,56	39,27±2,13	100,00
		15	8,90±0,96	36,10±2,14	55,00±3,54	100,00
		20	4,43±0,54	15,82±1,91	79,75±4,06	100,00

**Tableau 14 :** Sur la population totale des cellules HaCaT, analyse de la répartition entre les cellules mortes, les cellules vivantes « normales » et les cellules vivantes en cours d'apoptose. Analyse en CMF avec les fluorochromes TOTO-3 et JC-1. (n=3).

## **VI. Etude des molécules apoptogènes libérées à partir de la mitochondrie : cytochrome c et « Apoptosis Inducing Factor » (AIF)**

La chute du potentiel transmembranaire mitochondrial qui a lieu lors du processus apoptotique s'accompagne généralement d'une libération dans le cytoplasme de molécules apoptogènes dont le cytochrome c et l'AIF.

Dans notre étude sur les cellules HaCaT, même si la voie mitochondriale ne semble pas être prépondérante dans le processus apoptotique induit par l'acide ursolique (la chute du potentiel mitochondrial observée est relativement modérée), nous avons cependant effectué un marquage immunofluorescent afin de mettre en évidence un relargage éventuel dans le cytoplasme de ces molécules apoptogènes. Nous avons également étudié l'expression de ces protéines à l'aide de la technique de Western Blot.

### **VI.1. Etude du cytochrome c par immunofluorescence indirecte**

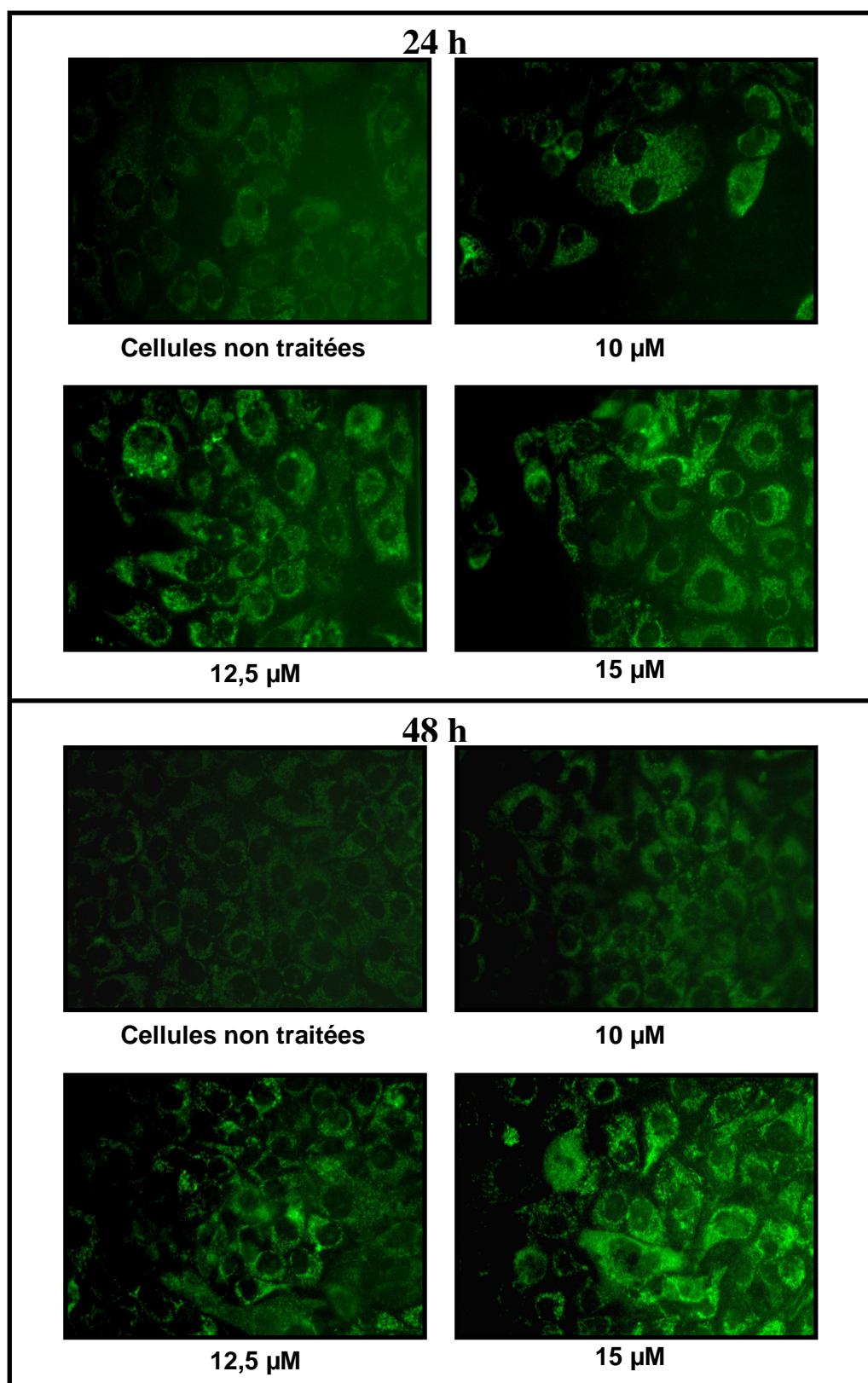
Le cytochrome c, libéré par la mitochondrie, se lie dans le cytosol à la protéine régulatrice « Apoptosis Protein Activating Factor-1 » (APAF-1) et à la pro-caspase-9 ; le complexe ainsi formé, l'apoptosome, induit l'activation de la caspase-9.

Dans cette étude, nous avons effectué un marquage du cytochrome c par la technique d'immunofluorescence indirecte, avec un anticorps de souris anti-cytochrome c humain et un anticorps anti-souris couplé au fluorochrome FITC.

Après 24 et 48 heures de traitement et par rapport aux cellules non traitées, l'acide ursolique induit de manière dose-dépendante la libération du cytochrome c (Figure 80) : le nombre de cellules marquées, ainsi que l'intensité de fluorescence verte au niveau du cytoplasme, augmente avec la concentration d'acide ursolique.

NB : Nous avons étudié l'expression de la protéine cytochrome c par Western Blot.

Les résultats obtenus ne sont pas présentés ici : la technique opératoire, même répétée plusieurs fois, ne nous a pas permis d'obtenir un marquage cohérent des cellules traitées et des cellules témoins.



**Figure 80 :** Immunofluorescence indirecte du cytochrome c des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique. Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations. Grossissement x 400. (n=3).

## **VI.2. Etude de l'« Apoptosis Inducing Factor » (AIF)**

Libérée par la mitochondrie dans le cytoplasme, la protéine AIF est transloquée vers le noyau où elle est capable d'induire les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose telle que la fragmentation nucléaire de haut poids moléculaire.

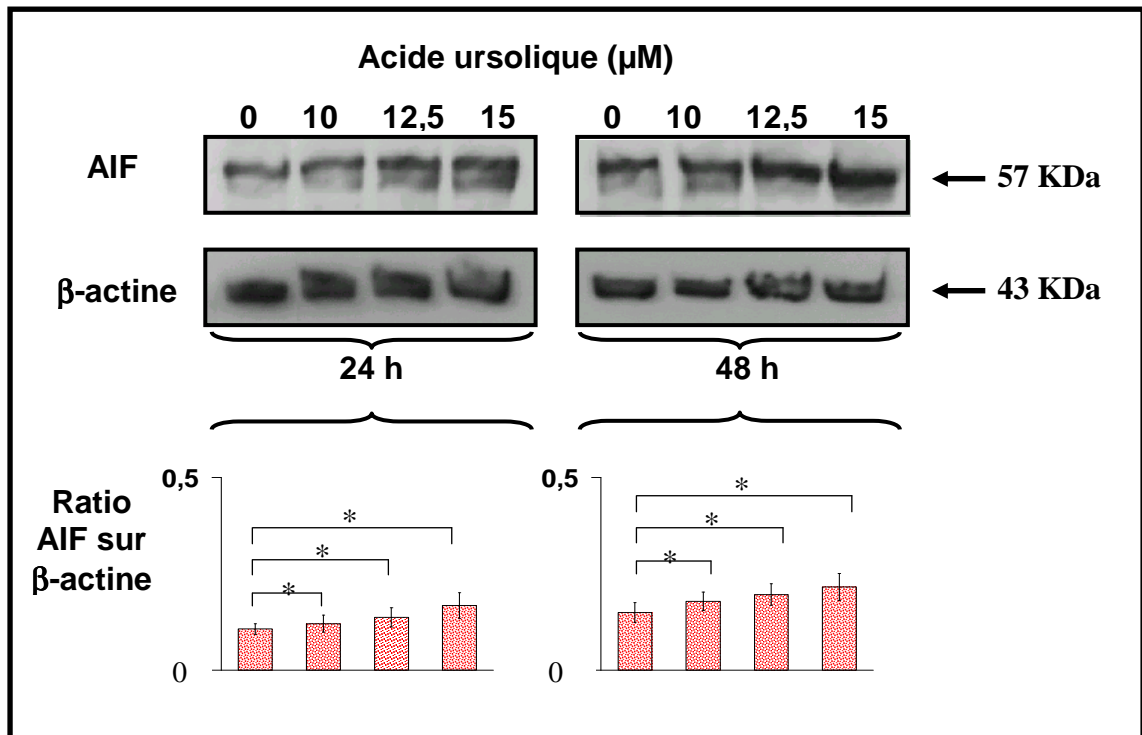
Pour mettre en évidence la libération de AIF à partir des cellules HaCaT traitées avec de l'acide ursolique, nous avons étudié l'expression de cette protéine par la technique du Western Blot avec un anticorps de lapin anti-AIF humain et par marquage immunofluorescent indirect en utilisant le même anticorps anti-AIF mais sur lequel nous fixons un second anticorps couplé au fluorochrome FITC.

### **VI.2.1. Expression de la protéine AIF par la technique de Western Blot**

L'observation des bandes protéiques des cellules traitées montre une augmentation significative de l'expression de AIF en fonction de la concentration d'acide ursolique (Figure 81). Le calcul des ratios AIF /  $\beta$ -actine confirme cette observation.

Après 24 heures de traitement, le ratio est de 0,107 pour les cellules non traitées et de 0,168 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,57.

Après 48 heures de traitement, le ratio est de 0,150 pour les cellules non traitées et de 0,216 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,44.



**Figure 81 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine AIF des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

Technique de Western Blot (n=3). (\* P<0,05).

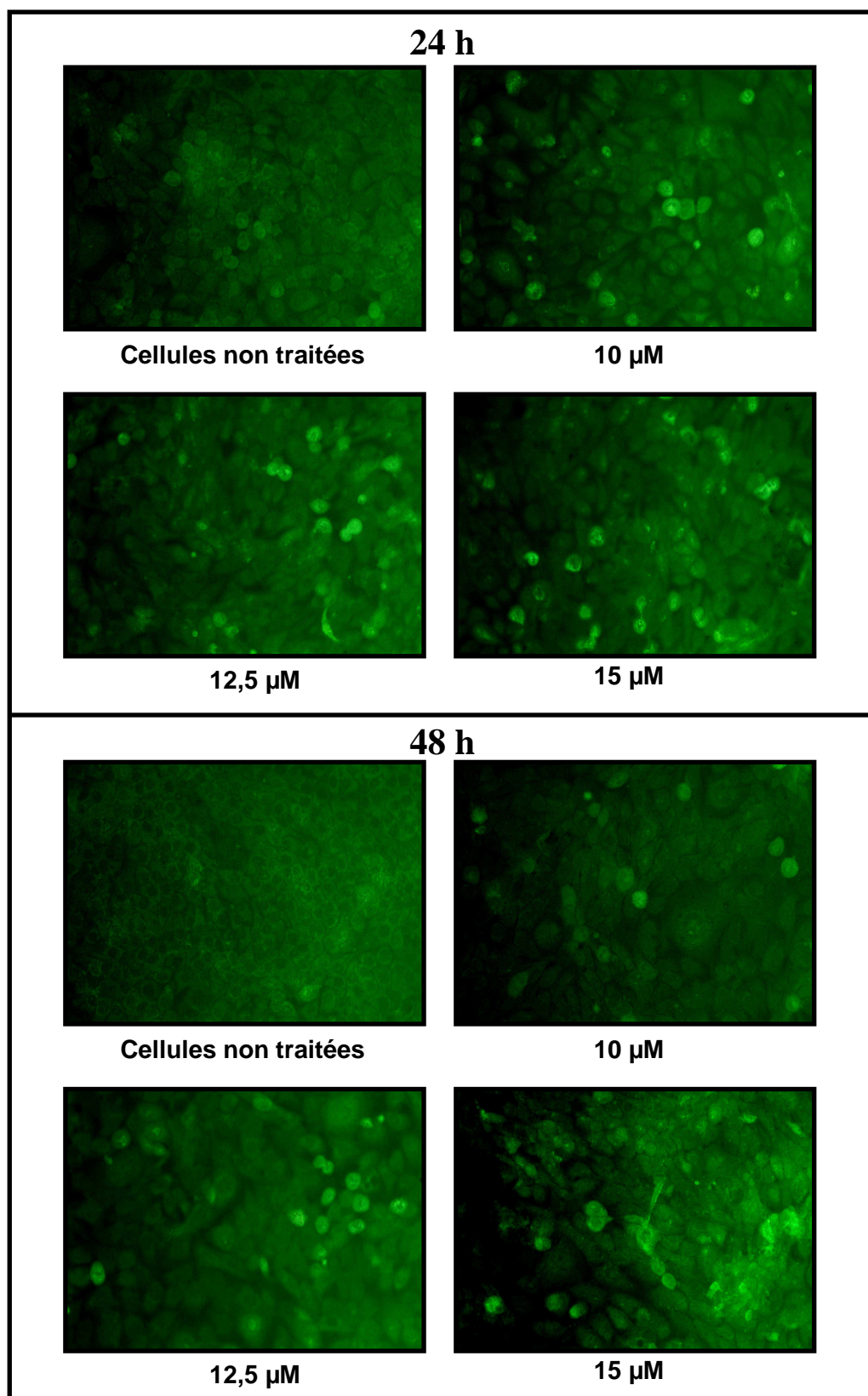
### VI.2.2. Expression de la protéine AIF par immunofluorescence indirecte

Les cellules témoins présentent une fluorescence verte plus ou moins intense, traduisant le niveau basal de la protéine dans les cellules après 24 et 48 heures d'incubation (Figure 82).

Pour les mêmes périodes d'incubation, le nombre de cellules marquées, ainsi que l'intensité de fluorescence augmentent en fonction de la concentration d'acide ursolique

Ces résultats mettent en évidence une augmentation de l'expression de la protéine AIF ainsi que sa libération à partir de la mitochondrie en fonction de la concentration d'acide ursolique.

L'étude de molécules apoptogènes cytochrome c et AIF par immunofluorescence indirecte fait apparaître que l'acide ursolique induit la libération de ces molécules apoptogènes à partir de la mitochondrie des cellules HaCaT traitées.



**Figure 82 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine AIF des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique. Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations. Grossissement x 200. (n=3)



## **VII. Bax et Bcl-2. Etudes des expressions des ARNm et des protéines**

Parmi les membres de la famille Bcl-2, les protéines Bax (pro-apoptotique) et Bcl-2 (anti-apoptotique), ont un effet régulateur sur la fermeture et l'ouverture des pores de la mitochondrie, permettant, notamment de réguler la libération des molécules apoptogènes, cytochrome c et AIF.

Ayant mis en évidence une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules HaCaT, ainsi que la libération du cytochrome c et de l'AIF, nous avons donc étudié le comportement des protéines Bax et Bcl-2 au cours du processus apoptotique induit par l'acide ursolique.

Dans cette étude, nous avons étudié l'expression de leur ARNm avec la technique de RT-PCR, ainsi que que l'expression de leur protéine avec les techniques du Western Blot et d'immunofluorescence indirecte.

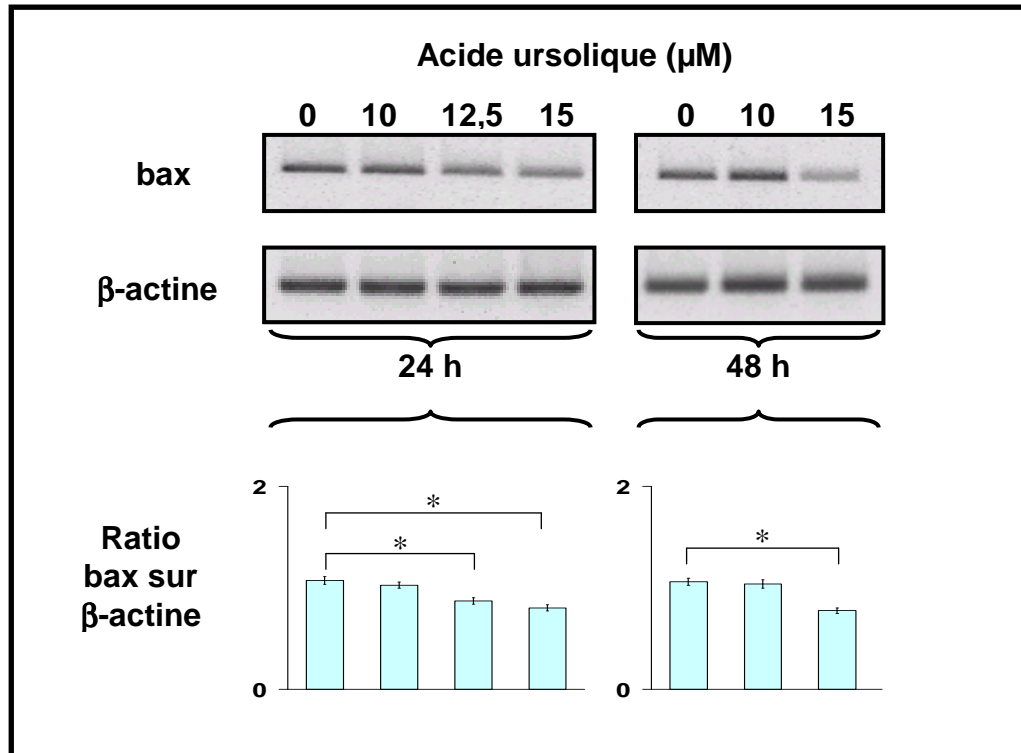
### **VII.1. Etude de Bax**

#### **VII.1.1. Expression de l'ARNm de Bax**

Les résultats représentés sur la figure 83 indiquent que l'acide ursolique, d'une manière dose dépendante, réprime l'expression du gène de la protéine Bax.

Après 24 heures de traitement, le ratio Bax /  $\beta$ -actine est de 1,07 pour les cellules non traitées et 0,80 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une diminution d'un facteur de 0,74.

Après 48 heures de traitement, le ratio est de 1,06 pour les cellules non traitées et de 0,78 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une diminution d'un facteur de 0,66.



**Figure. 83 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de Bax des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

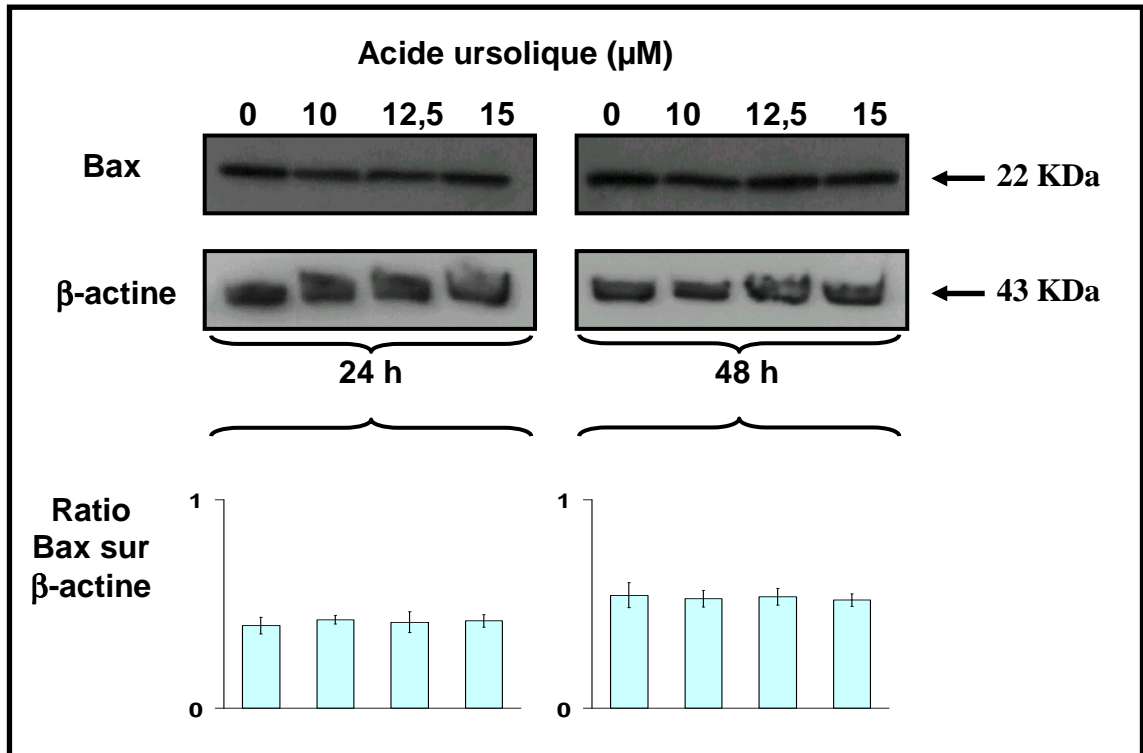
Technique RT-PCR (n=3) (\* P<0,05)

## VII.1.2. Expression de la protéine Bax

### VII.1.2.1. Expression de la protéine Bax par Western Blot

Après 24 et 48 heures de traitement, les résultats présentés sur la figure 84 ne font apparaître aucune différence significative dans l'expression de la protéine Bax entre les cellules témoins et les cellules traitées.

Cette étude ne corrobore pas celle faite avec la technique de RT-PCR qui a révélé une diminution de l'expression de Bax sur les cellules HaCaT traitées.



**Figure. 84 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine Bax des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

Technique de Western Blot (n=3)

#### VII.1.2.2. Expression de la protéine Bax par immunofluorescence indirecte

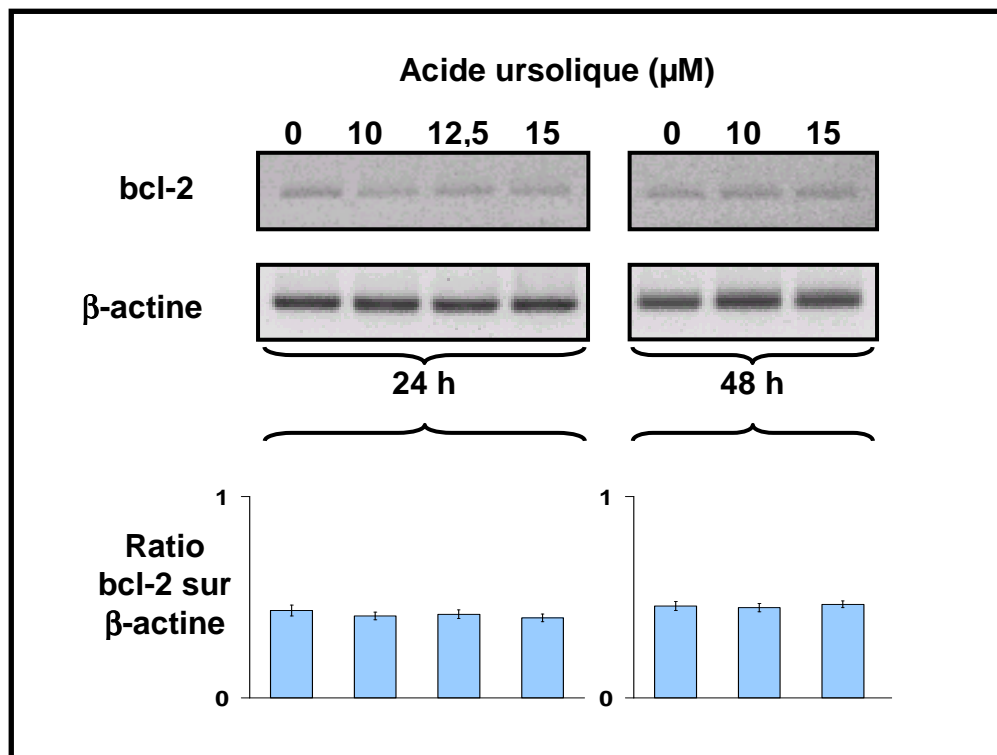
Nous avons effectué un marquage immunofluorescent indirect des cellules HaCaT à l'aide du même anticorps anti-Bax que celui utilisé avec la technique de Western Blot.

Les résultats obtenus par immunofluorescence indirecte ne sont pas présentés ici : la technique opératoire, même répétée plusieurs fois, ne nous a pas permis d'obtenir un marquage cohérent des cellules témoins, ni des cellules traitées.

## VII.2. Etude de Bcl-2

### VII.2.1. Expression de l'ARNm de Bcl-2

Que ce soit après 24 ou 48 heures de traitement, aucune différence significative dans l'expression de l'ARNm de Bcl-2 n'est mise en évidence entre les cellules témoins et les cellules traitées avec l'acide ursolique (Figure 85).



**Figure 85** : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de Bcl-2 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

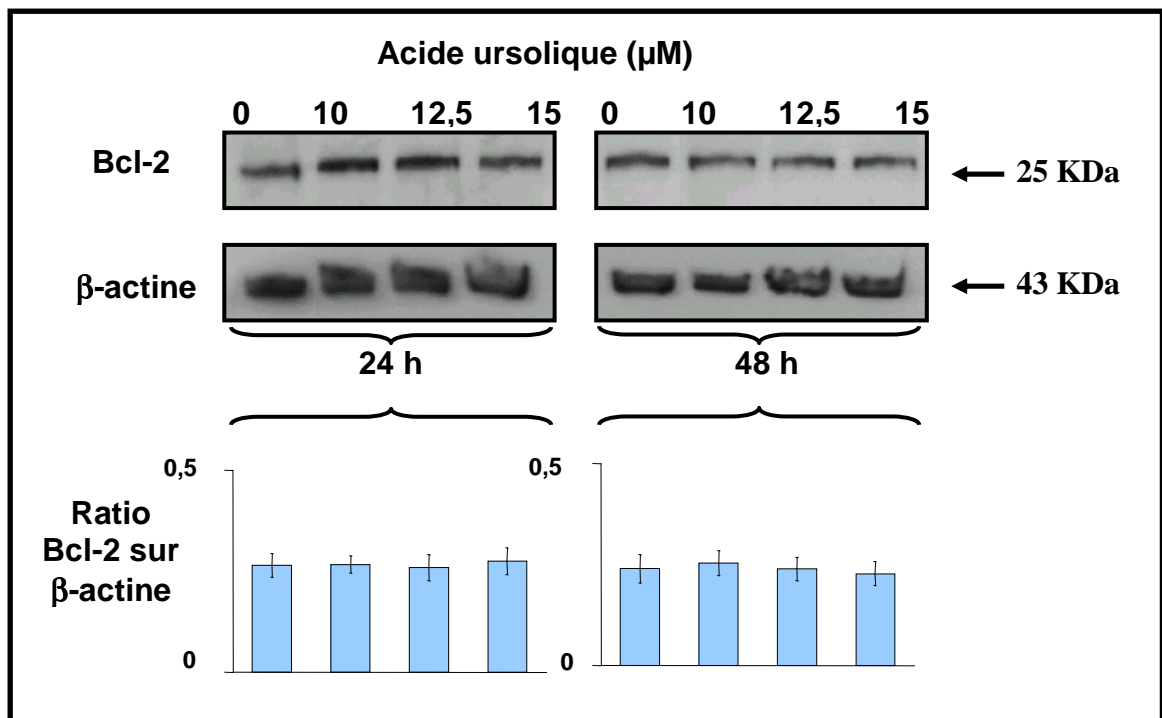
Technique RT-PCR (n=3)

### VII.2.2. Expression de la protéine Bcl-2

#### VII.2.2.1. Expression de la protéine Bcl-2 par Western Blot

Après 24 et 48 heures de traitement, aucune différence significative n'est mise en évidence dans l'expression de la protéine Bcl-2 entre les cellules témoins et les cellules traitées (Figure 86).

Ces résultats montrent que l'acide ursolique n'a aucun effet sur l'expression de la protéine Bcl-2 et sont en accord avec ceux obtenus avec la technique de RT-PCR.



**Figure. 86 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine Bcl-2 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.

Technique Western Blot (n=3).

#### VII.2.2.2. Expression de la protéine Bcl-2 par immunofluorescence indirecte

Nous avons effectué un marquage immunofluorescent indirect des cellules HaCaT à l'aide du même anticorps anti-Bcl-2 que celui utilisé avec la technique de Western Blot. Les résultats obtenus par immunofluorescence indirecte ne sont pas présentés ici : comme pour la protéine Bax, la technique utilisée, même répétée plusieurs fois, ne nous a pas permis de déterminer un marquage correct de Bcl-2 des cellules HaCaT traitées ou non avec l'acide ursolique.

### VII.3. Etude du ratio Bax / Bcl-2

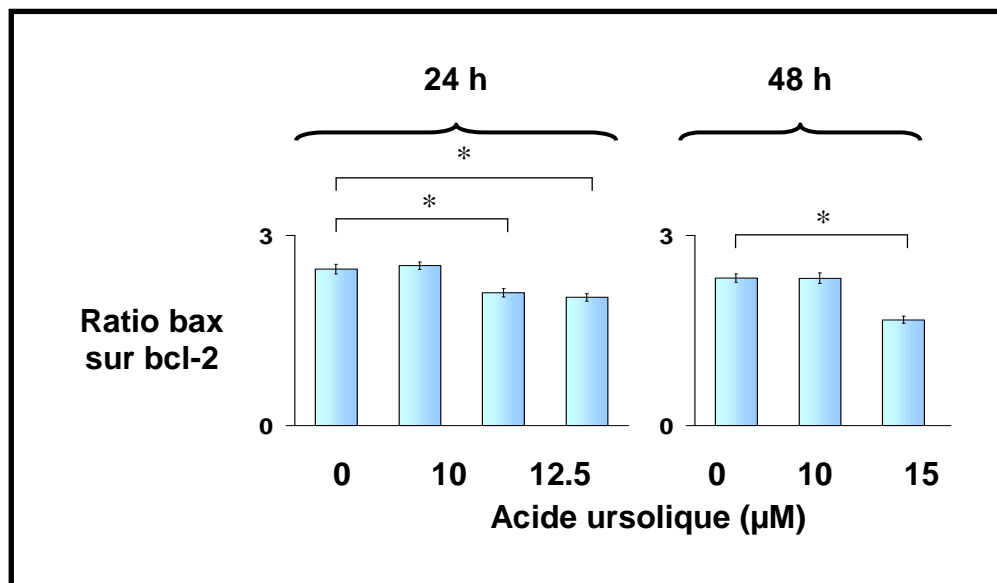
Le ratio de Bax sur Bcl-2 définit la tendance de l'effet pro- ou anti-apoptotique de l'acide ursolique sur les cellules HaCaT.

#### VII.3.1. Etude du ratio ARNm de bax sur ARNm de bcl-2

Nous observons une diminution significative du ratio ARNm de bax sur ARNm de bcl-2 des cellules traitées avec différentes concentrations d'acide ursolique à 24 et 48 heures de traitement (Figure 87).

A 24 heures le ratio décroît de manière dose-dépendante : 2,47 pour le témoin et 2,02 pour 15  $\mu$ M d'acide ursolique (soit une diminution d'un facteur de 1,22).

Il en est de même à 48 heures : 2,33 pour le témoin et 1,67 pour 15  $\mu$ M d'acide ursolique (soit une diminution d'un facteur de 1,39).

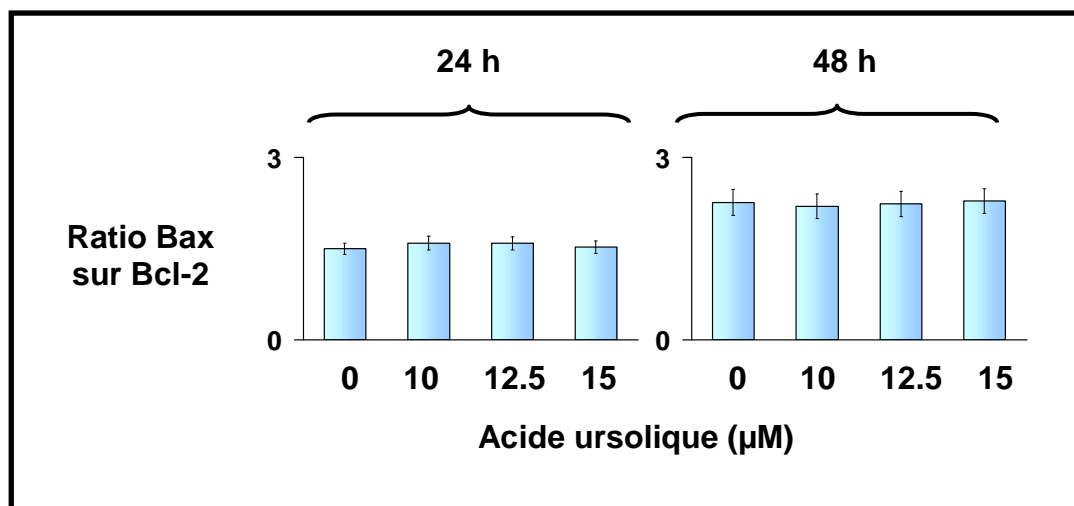


**Figure. 87** : Etude du ratio ARNm de bax sur ARNm de bcl-2 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

(n=3)

### VII.3.2. Etude du ratio protéine Bax sur protéine Bcl-2

Les ratios de la protéine Bax sur celle de Bcl-2, pour chaque concentration d'acide ursolique, ne présentent pas de variation significative par rapport au témoin ni à 24 h, ni à 48 heures de traitement (Figure 88).



**Figure 88** : Etude du ratio de protéine Bax sur protéine Bcl-2 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Les résultats de la technique de Western Blot ne corroborent pas ceux de la technique RT-PCR : l'acide ursolique ne fait pas varier le ratio Bax sur Bcl-2 des cellules HaCaT vers un effet pro ou anti- apoptotique, ni à 24 ni à 48 heures de traitement.

Pour résumer nos principaux résultats obtenus sur les cellules HaCaT, nous avons montré que l'acide ursolique induit un effet anti-prolifératif sur les cellules, avec une  $IC_{50}$  de 18  $\mu$ M et 12,5  $\mu$ M respectivement à 24 et 48 heures. Nous avons également montré un blocage du cycle cellulaire en phase G1, avec une augmentation de l'expression de p21. La présence d'une population sub-G1 indique que l'acide ursolique induit un processus pro-apoptotique. Nous avons mis en évidence une translocation de p53 phosphorylé dans le noyau, puis déterminé l'augmentation de l'activation des caspases-3 et -9, ce qui dans un premier temps nous a laissé supposer une implication de la voie mitochondriale. Nous avons montré que l'acide ursolique n'induit pas de importante la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, ni de variation dans l'expression des protéines Bax et Bcl-2. En revanche, nous avons observé un relargage de molécules apoptogènes telles que AIF et cytochrome c.

## CHAPITRE II : Lignée cellulaire M4Beu

### I. Evaluation du potentiel anti-prolifératif de l'acide ursolique

Comme dans l'étude précédente, relative à la lignée cellulaire HaCaT, nous avons utilisé les techniques du MTT et du bleu trypan pour évaluer, sur les cellules M4Beu, le potentiel anti-prolifératif de l'acide ursolique.

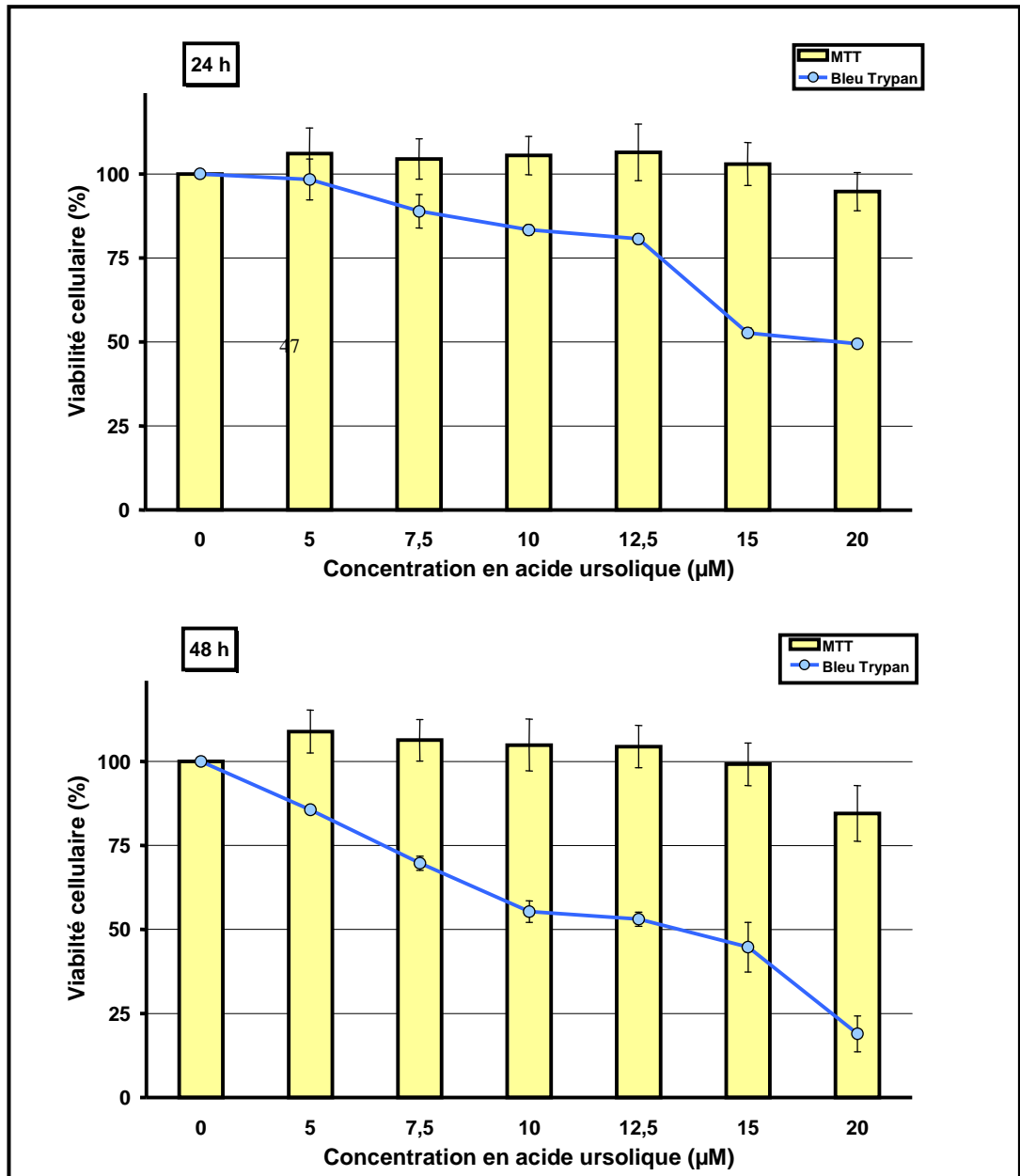
Dans ce travail, nous avons également constaté, que les résultats de la prolifération cellulaire obtenus par la technique du MTT ne reflétaient pas l'observation faite au microscope. Ainsi nous avons utilisé la technique du bleu trypan pour déterminer le potentiel anti-prolifératif de cette molécule.

Le comptage des cellules avec le bleu trypan fait apparaître un effet anti-prolifératif de l'acide ursolique dose et temps dépendants (Figure 89) :

- après 24 heures de traitement, la valeur de l'IC<sub>50</sub> est comprise entre 15 et 20 µM d'acide ursolique, avec respectivement 53 et 49 % de viabilité pour ces deux concentrations ;
- après 48 heures de traitement, la valeur de l'IC<sub>50</sub> est comprise entre 12,5 et 15 µM, avec respectivement 53 et 45 % de viabilité pour ces deux concentrations.

La figure 89 représente l'étude comparative de la prolifération des cellules M4Beu en présence d'acide ursolique, évaluée à l'aide des techniques du MTT et du bleu trypan. De la même façon que pour la lignée HaCaT, les résultats montrent sans ambiguïté que la technique du MTT est complètement inadaptée à l'étude de la prolifération des cellules M4Beu en présence d'acide ursolique : une diminution de la viabilité cellulaire est mise en évidence uniquement avec 20 µM et après 48 heures de traitement.





**Figure 89** : Analyse comparative de la viabilité cellulaire des cellules M4Beu en présence d'acide ursolique (24 et 48 heures de traitement).

Techniques du MTT et du bleu trypan (n=3).

## II. Analyse du cycle cellulaire des cellules M4Beu par cytométrie de flux

Après avoir mis en évidence l'activité anti-proliférative de l'acide ursolique sur la lignée M4Beu, nous avons recherché si cet effet antiprolifératif pouvait être la conséquence d'un arrêt du cycle cellulaire induit par cette molécule.

### II.1. Etude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire

Nous avons utilisé la cytométrie de flux pour déterminer la répartition des cellules dans les différentes phase du cycle. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique (Tableau 15).

Temps	Traitement	G0/G1	S	G2/M	Sub-G1	
24 h	Témoin	64,74±4,12	24,76±3,60 %	10,50±1,45 %	1,42±0,23 %	
	Acide ursolique	7,5 µM	49,04±5,25	24,45±3,82 %	26,51±2,21 %	1,25±0,27 %
		10 µM	62,14±4,34	22,70±2,24 %	15,16 ±1,98 %	1,42±0,29 %
		12,5 µM	62,065±5,33	23,70±2,54 %	14,24±1,51 %	1,88±0,94 %
		15 µM	64,62±3,62	19,78±2,57 %	15,61±1,88 %	1,73±1,14 %
		20 µM	57,81±3,52	16,11±2,14 %	19,78±1,84 %	<b>8,89±1,58 %</b>

Temps	Traitement	G0/G1	S	G2/M	Sub-G1	
48 h	Témoin	73,03±4,99 %	19,14±1,81 %	7,84±1,54 %	1,58±0,31 %	
	Acide ursolique	7,5 µM	72,65±4,21 %	16,52±1,52 %	10,84±1,55 %	<b>3,24±0,39 %</b>
		10 µM	73,92±4,43 %	15,34±1,74 %	10,74±1,44 %	<b>7,54±1,72 %</b>
		12,5 µM	74,73±5,15 %	12,57±1,67 %	12,72±1,83 %	<b>12,64±1,29 %</b>
		15 µM	73,18±4,79 %	15,95±1,54 %	10,87±1,98 %	<b>20,11±2,23 %</b>
		20 µM	77,42±5,02 %	15,57±1,74 %	19,67±2,17 %	<b>31,48±3,56 %</b>

**Tableau 15 :** Répartition des cellules M4Beu dans les différentes phases du cycle cellulaire après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Nous n'observons pas d'accumulation des cellules M4Beu dans une phase spécifiques du cycle ni à 24 ni à 48 heures d'incubation. Toutefois, dans chacune des phases, les taux de cellules témoins et de cellules traitées varie entre 24 et 48 heures (Tableau. 15).

Nous pouvons observer une faible augmentation de cellules dans la phase G1 à 48 heures par rapport à 24 heures et par conséquent une faible diminution dans la phase S et G2/M. Comme cette observation est identique pour chaque échantillon par rapport au témoin, nous en déduisons qu'entre le temps de traitement 24 heures et celui de 48 heures, il n'y a pas de variation de répartition des cellules (traitées ou témoins) dans une phase spécifique du cycle cellulaire.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'arrêt du cycle dans les cellules cancéreuses M4Beu traitées avec de l'acide ursolique.

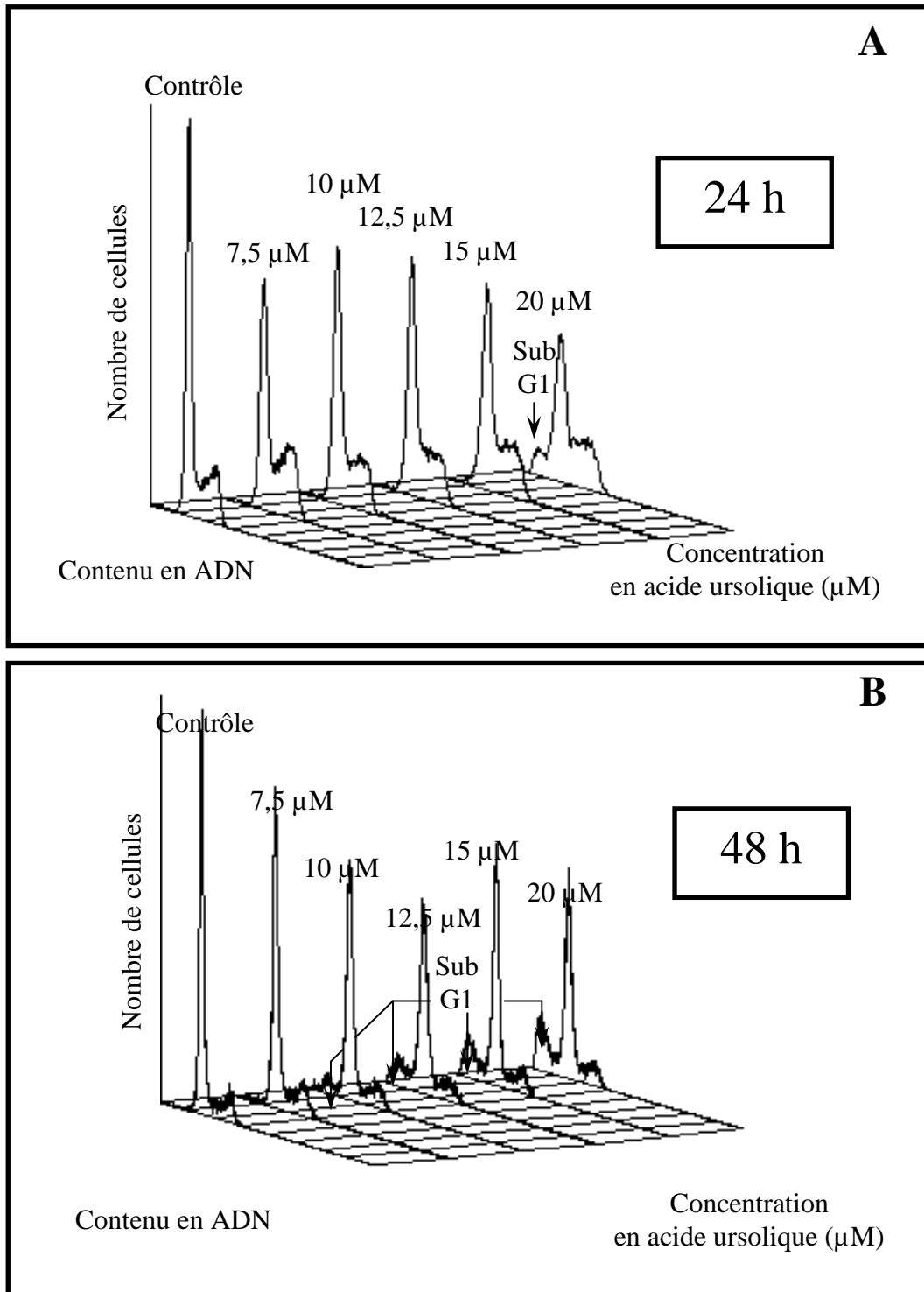
## **II.2. Mise en évidence d'une population cellulaire apoptotique : présence d'un pic sub-G1**

S'il n'y a pas d'accumulation dans une phase spécifique du cycle cellulaire, nous observons tout de même une accumulation cellulaire dans la phase sub-G1. En effet, l'analyse du cycle cellulaire met en évidence un pic sub-G1, caractéristique d'une population apoptotique, quand les cellules M4Beu sont traitées avec certaines concentrations d'acide ursolique (Tableau 15, Figure 90).

Après 24 heures de traitement, nous observons l'apparition d'un pic sub-G1 avec 20  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique (8,89% de cellules apoptotiques), (Tableau 15, Figure 90A).

Après 48 heures de traitement, le pic sub-G1 est mis en évidence dès 10  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique. Le pourcentage de cellules apoptotiques, calculé à partir de l'analyse en CMF, indique que l'acide ursolique induit l'apoptose sur les cellules M4Beu d'une manière dose-dépendante. Avec 20  $\mu\text{M}$ , le pourcentage de cellules apoptotiques est particulièrement significatif (31,48%), (Tableau 15, Figure 90B).

Cette analyse en CMF montre que dans nos conditions expérimentales l'acide ursolique est sans effet sur la régulation du cycle cellulaire des cellules cancéreuses M4Beu. En revanche, la présence très distincte de pics sub-G1 indique que l'acide ursolique induit le processus apoptotique et ce de manière dose-dépendante après 48 heures de traitement.



**Figure 90** : Etude de la répartition des cellules M4Beu dans les différentes phases du cycle cellulaire après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique par la technique de CMF.

Dans la suite de nos expérimentations, nous étudierons les effets de l'acide ursolique avec une gamme de concentrations resserrée autour des valeurs de l'IC<sub>50</sub>, c'est à dire 10 µM, 12,5 µM et 15 µM (sauf pour l'étude du potentiel transmembranaire mitochondrial où la concentration 20 µM sera également prise en considération).

### **III. Protéines p53 et p21. Etudes des expressions des ARNm et des protéines**

Les protéines p53 et p21 sont deux protéines majeures impliquées dans le processus apoptotique (p53) et dans la régulation du cycle cellulaire (p53, p21). Afin de déterminer si ces protéines sont impliquées dans ces deux processus, au cours du traitement des cellules M4Beu avec l'acide ursolique, nous avons étudié ces deux protéines avec les techniques de RT-PCR, de Western Blot et d'immunofluorescence par marquage indirect.

Dans toutes nos expérimentations de RT-PCR et de Western Blot, nous avons utilisé la  $\beta$ -actine comme référence pour quantifier l'expression des protéines étudiées.

#### **III.1. Etude de p53**

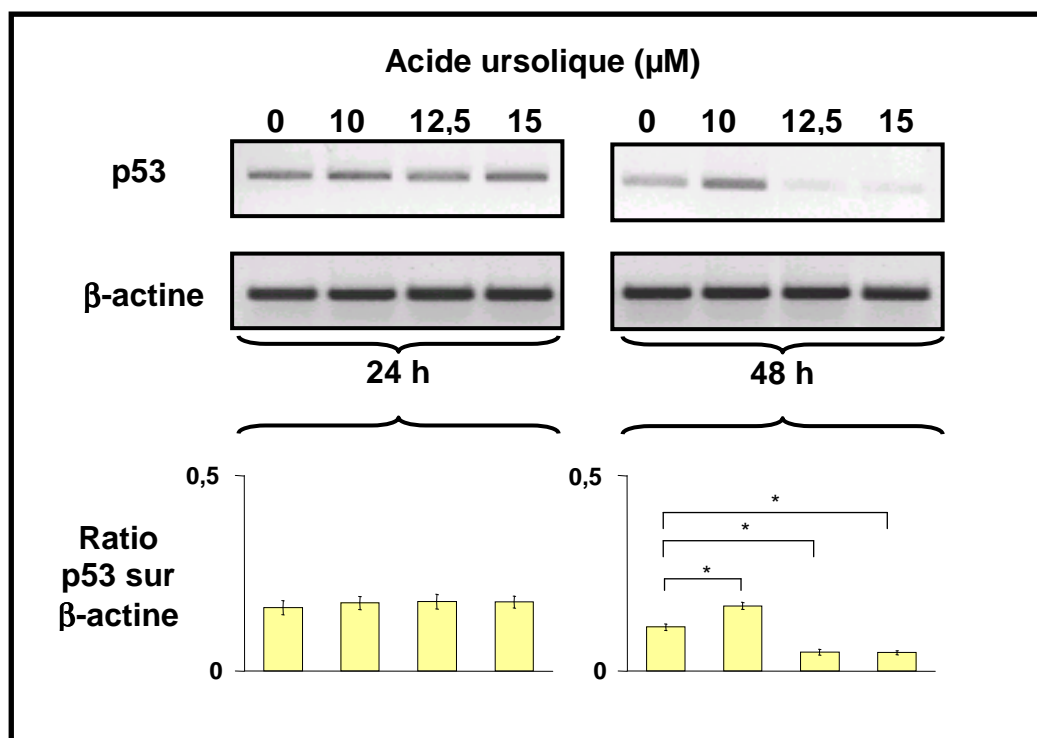
La présence de pics sub-G1, caractéristiques de corps apoptotiques semble indiquer que l'acide ursolique induit l'apoptose sur les cellules M4Beu. De ce fait, nous avons étudié p53, l'une des plus importantes protéines intervenant dans la régulation de la prolifération cellulaire et régulant un certain nombre de gènes impliqués dans le processus apoptotique.

##### **III.1.1 Expression de l'ARNm de p53**

L'expression de l'ARNm de p53 des cellules M4Beu a été mise en évidence à l'aide de la technique RT-PCR (Figure 91).

Après 24 heures d'incubation, aucune variation significative n'est mise en évidence dans l'expression de l'ARNm de p53, entre les cellules témoins et les cellules traitées.

Après 48 heures de traitement, le ratio de p53 /  $\beta$ -actine est de 0,11 pour les cellules témoins et de 0,17 pour les cellules traitées avec 10 µM d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,5. En revanche, pour les cellules traitées avec 12,5 et 15 µM d'acide ursolique, les ratios sont diminués d'un facteur de 2,2.



**Figure 91** : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de p53 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

Technique RT-PCR (n=3). (\* P<0,05).

### III.1.2. Expression de la protéine de p53

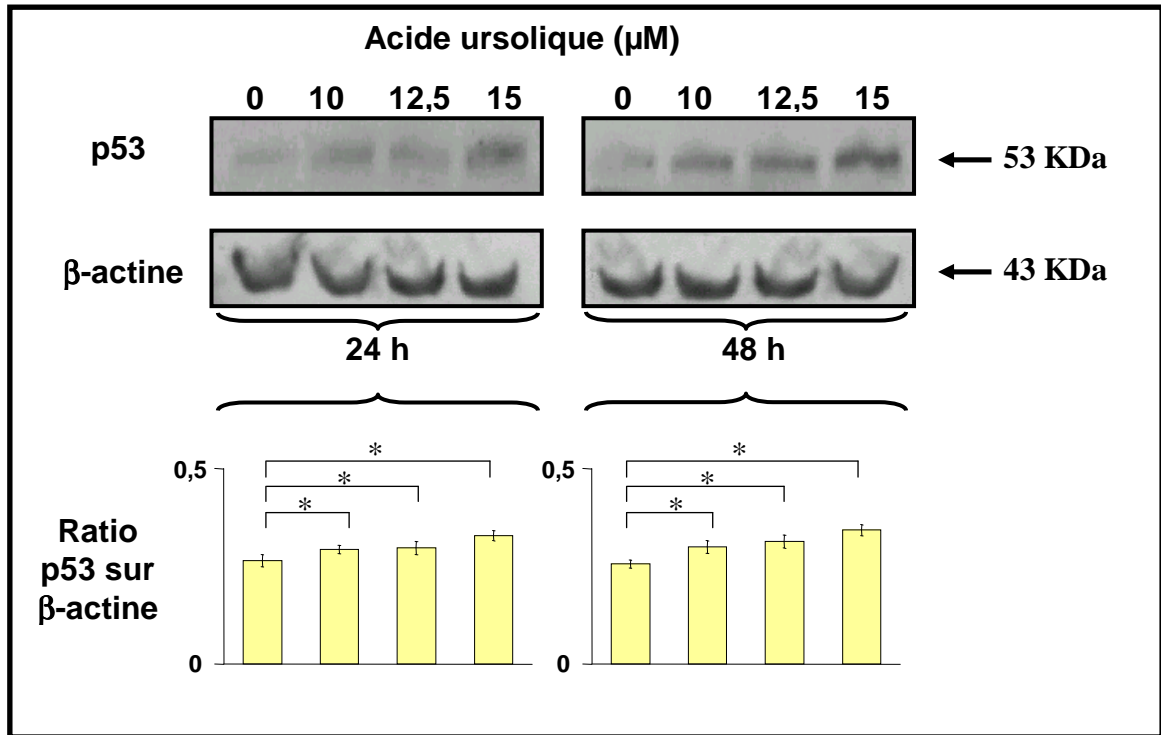
Nous avons étudié l'expression de la protéine p53 avec les techniques de Western Blot et d'immunofluorescence indirecte en utilisant respectivement un anticorps anti-p53 et un anticorps anti-p53 phosphorylé.

#### III.1.2.1. Expression de p53 par la technique Western Blot

L'acide ursolique induit sur les cellules M4Beu une augmentation dose-dépendante de l'expression de la protéine p53 (Figure 92).

Après 24 heures de traitement le ratio p53 / β-actine est de 0,26 pour les cellules témoins et de 0,33 pour les cellules traitées avec 15 μM d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,27.

Après 48 heures de traitement, le ratio est de 0,26 pour les cellules témoins et de 0,34 pour les cellules traitées avec 15 μM d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,31.



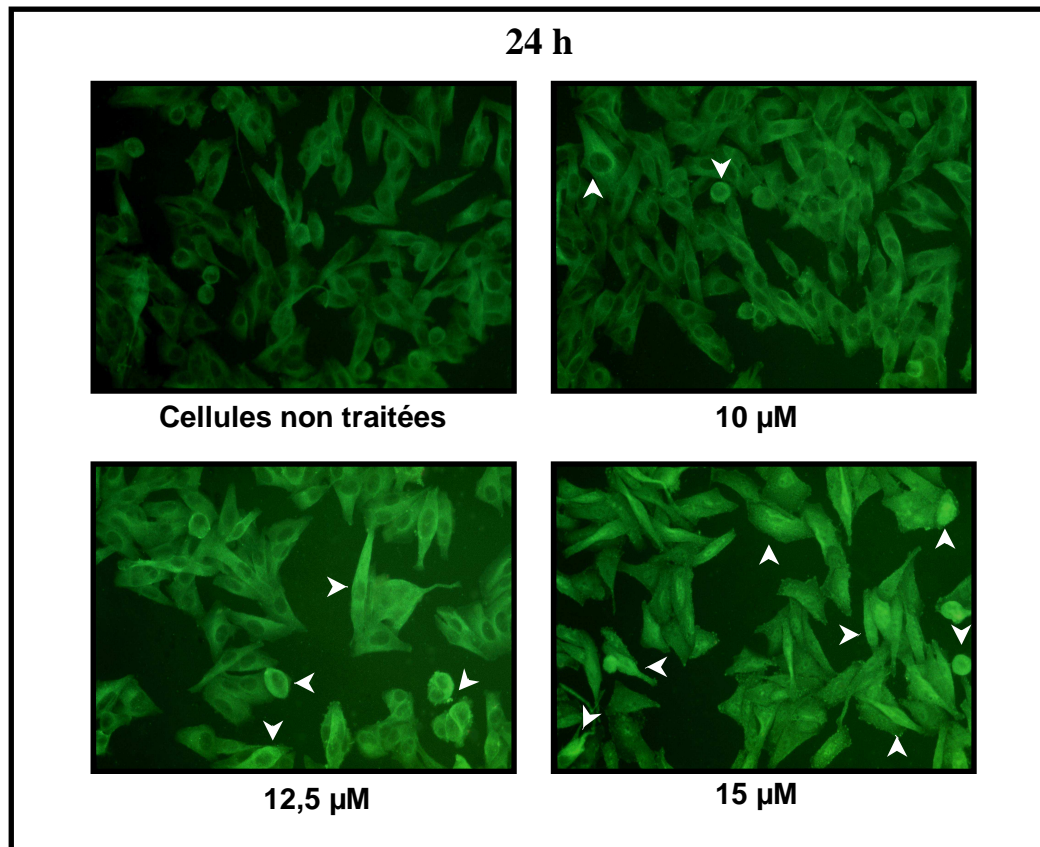
**Figure 92 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine p53 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement. Technique Western Blot (n=3). (\* P<0,05).

### III.1.2.2. Expression de p53 par immunofluorescence indirecte

Sur les différentes photographies de l'immunomarquage, les cellules témoins présentent une fluorescence verte, diffuse, qui caractérise le niveau basal de la protéine p53 dans les cellules (Figures 93 et 94).

Après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique, les cellules présentent au niveau de cytoplasme une fluorescence de plus en plus intense, en fonction de l'augmentation de la concentration de la molécule. Quand les cellules sont traitées avec 15 μM d'acide ursolique, cette fluorescence évolue très nettement du cytoplasme vers le noyau où elle semble s'intensifier, ce qui indique une forte localisation de la protéine p53 phosphorylée dans le noyau (Figure 93).

Après 48 heures de traitement, la fluorescence verte est globalement plus intense, ce qui suggère une plus grande activation de p53 phosphorylé. Les cellules traitées avec 12,5 et 15 μM d'acide ursolique présentent au niveau du noyau une fluorescence très prononcée, ce qui indique une très forte localisation de la protéine p53 dans le noyau (Figure 94).

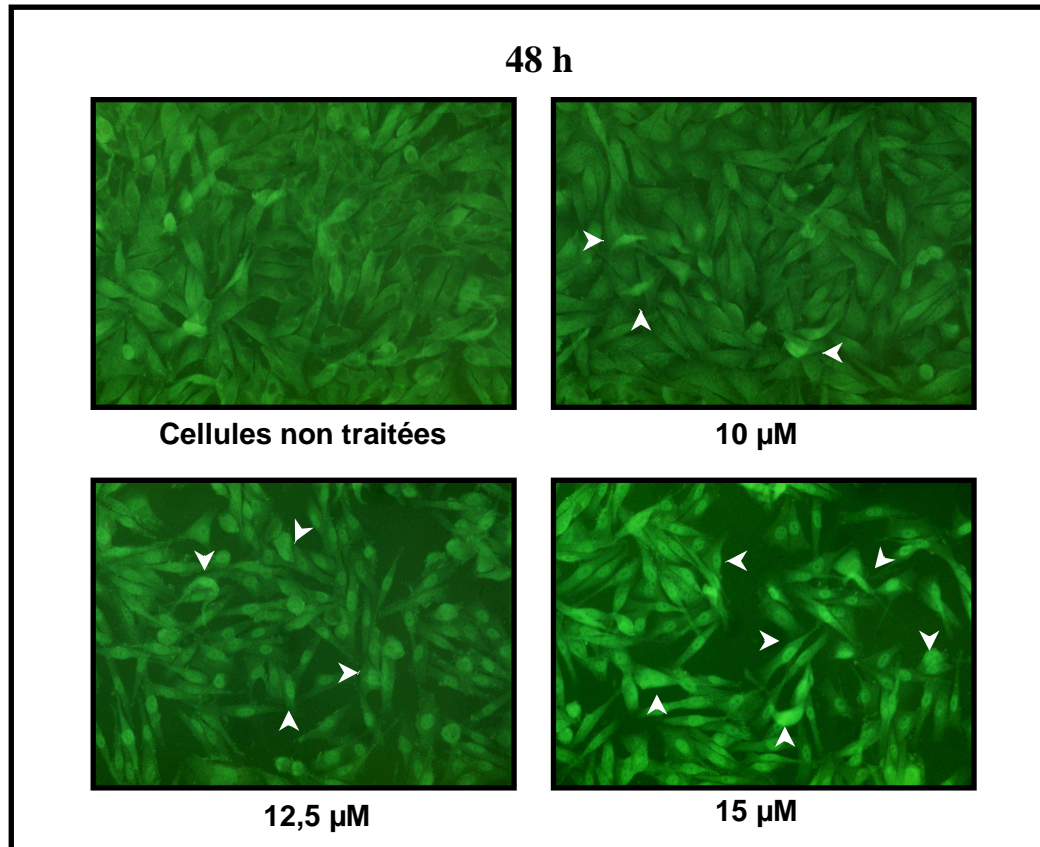


**Figure 93 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine p53 des cellules M4Beu après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations.

Grossissement x 200. (n=3).





**Figure 94 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine p53 des cellules M4Beu après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations. Grossissement x 200. (n=3).

La protéine p53 est activée par phosphorylation sur la sérine 392. Le marquage dans le noyau de p53 avec l'anticorps p53 phosphorylé sur la sérine 392 semble indiquer que la protéine p53 des cellules M4Beu, traitées avec l'acide ursolique, est tétramérisée et donc activée pour fragmenter l'ADN endommagé.

Le marquage immunofluorescent indirect nous indique que l'acide ursolique induit l'activation de p53 sur les cellules M4Beu : ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus avec la technique de Western Blot, montrant un effet dose dépendant de la molécule sur l'augmentation de l'expression de la protéine p53.

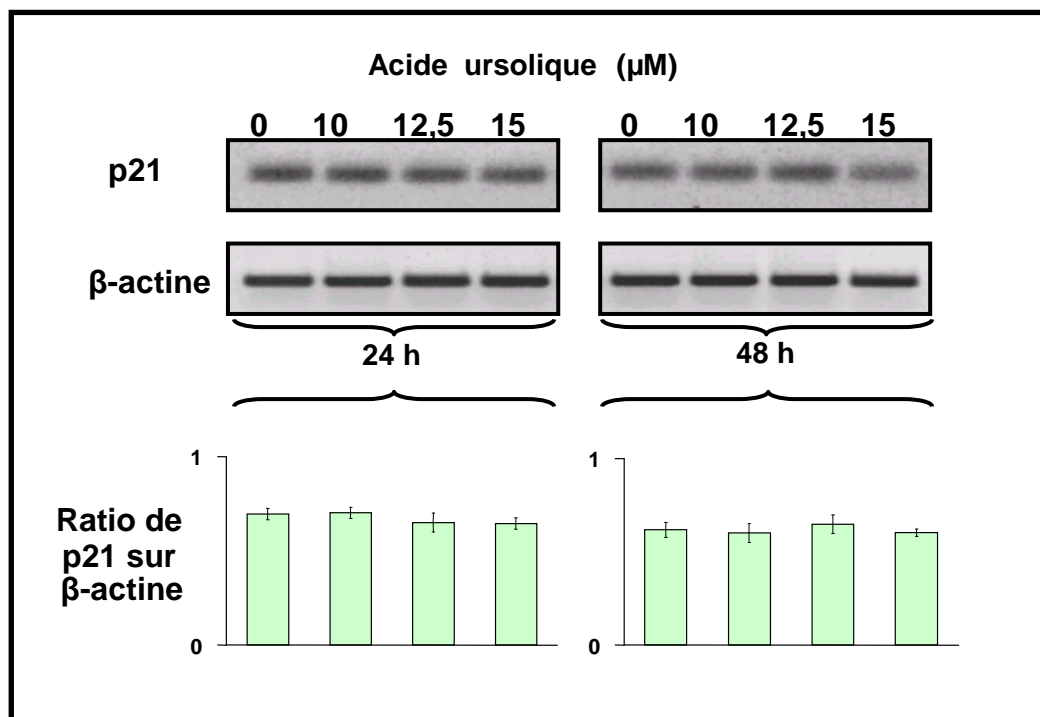
## III.2. Etude de p21

L'étude du cycle cellulaire des cellules M4Beu, précédemment effectuée dans ce travail, nous a montré qu'il n'y avait pas de blocage de celui-ci quand les cellules étaient traitées avec de l'acide ursolique. Pour confirmer ce résultat, nous avons étudié la protéine p21 : rappelons que celle-ci est sous le contrôle de p53, et que son activation induit un arrêt du cycle cellulaire.

Nous avons étudié cette protéine sur les cellules M4Beu à l'aide des techniques déjà employées : RT-PCR, Western Blot et marquage immunofluorescent indirect.

### III.2.1. Expression de l'ARNm de p21

Dans nos conditions expérimentales, cette étude nous indique que l'acide ursolique est sans effet sur l'expression de l'ARNm de p21 : aucune variation de l'expression de l'ARNm n'est mise en évidence entre les cellules témoins et les cellules traitées (Figure 95).



**Figure 95** : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de p21 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

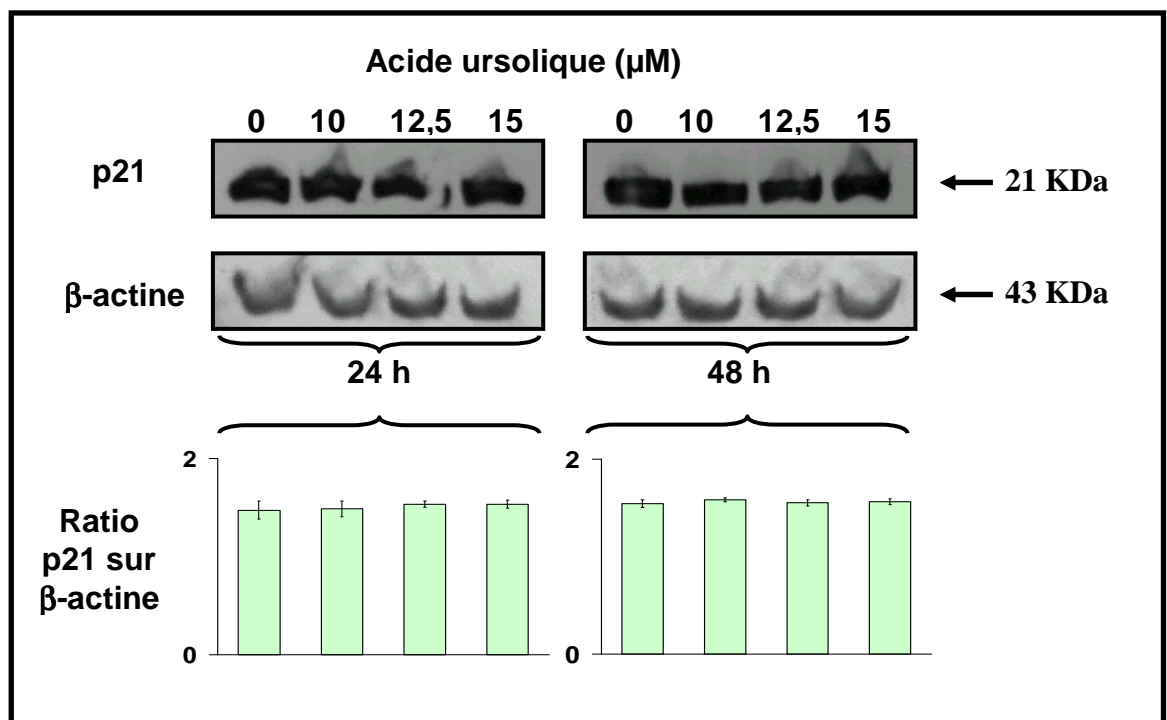
Technique RT-PCR (n=3).

### III.2.2. Expression de la protéine p21

Pour confirmer les résultats obtenus en RT-PCR, nous avons étudié l'expression de la protéine p21 par la technique Western Blot et par la technique d'immunofluorescence indirecte en utilisant dans les deux cas un anticorps anti-p21.

#### III.2.2.1. Expression de p21 par la technique Western Blot

L'observation des bandes protéiques de p21 obtenues ne montre aucune variation dans l'expression de p21 entre les cellules témoins et les cellules traitées avec de l'acide ursolique. Les ratios de p21 /  $\beta$ -actine confirment ce résultat (Figure 96).

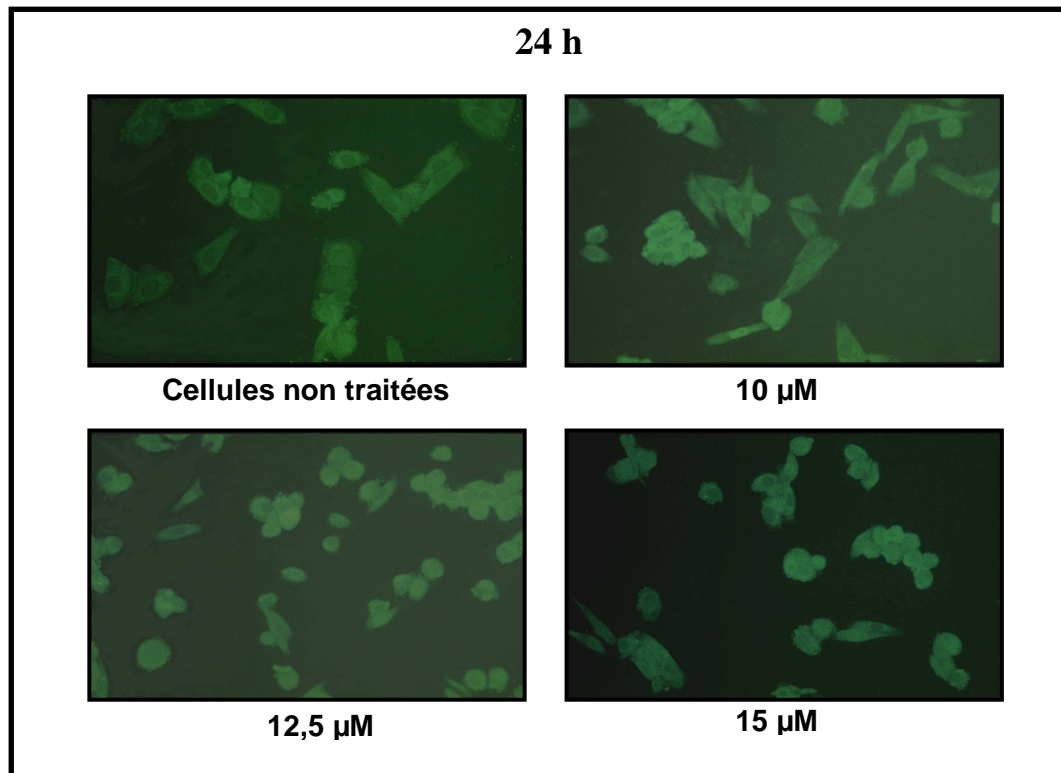


**Figure 96** : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine p21 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

Technique Western Blot (n=3).

### III.2.2.2. Expression de p21 par immunofluorescence indirecte

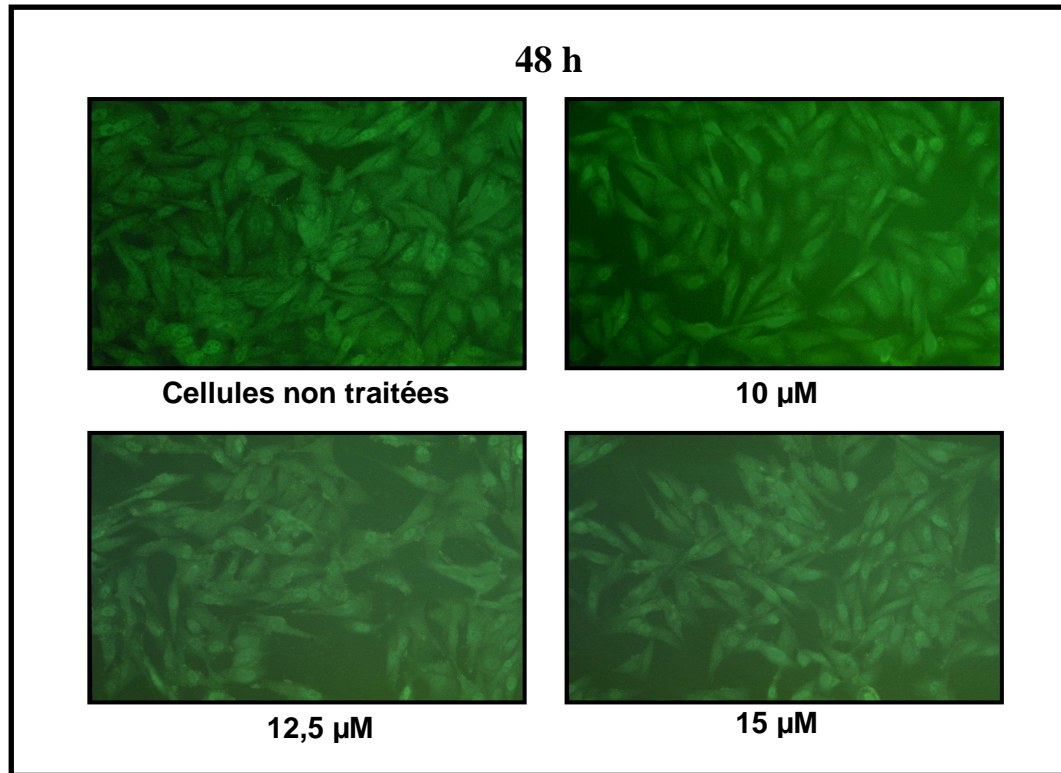
L'examen des photographies résultant du marquage immunofluorescent indirect ne révèle aucune différence d'intensité de fluorescence entre les cellules témoins et les cellules traitées avec l'acide ursolique. La fluorescence observée est celle du niveau basal de la protéine dans les cellules (Figure 97-98).



**Figure 97 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine p21 des cellules M4Beu après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations.

Grossissement x 200. (n=3).



**Figure 98 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine p21 des cellules M4Beu après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations. Grossissement x 200. (n=3).

Cette étude indique clairement que l'acide ursolique est sans effet sur l'expression de l'ARNm et de la protéine de p21, ce qui est en adéquation avec l'étude du cycle cellulaire pour laquelle aucune perturbation du cycle n'a été observée sur les cellules M4Beu traitées.

## **IV. Etude des activités caspases**

Dans les expérimentations précédentes sur les cellules M4Beu, nous avons mis en évidence :

- la présence d'une population apoptotique (pic Sub-G1), lors de l'analyse du cycle cellulaire ;
- l'augmentation de l'expression de la protéine p53, son activation et sa translocation vers le noyau.

Ainsi comme sur la lignée HaCaT, ces résultats nous ont conduit à approfondir le rôle de l'acide ursolique comme inducteur de l'apoptose.

Pour cela, nous nous sommes intéressés à la voie apoptotique dépendante de l'activation des caspases. Nous avons étudié successivement :

- la caspase-3 exécutive de la mort cellulaire par apoptose,
- la caspase-1 impliquée dans les événements inflammatoires mais qui peut aussi, dans certains cas, être impliquée dans l'activation de la caspase-3,
- la caspase-8 initiatrice de la voie des récepteurs,
- la caspase-9 initiatrice de la voie mitochondriale.

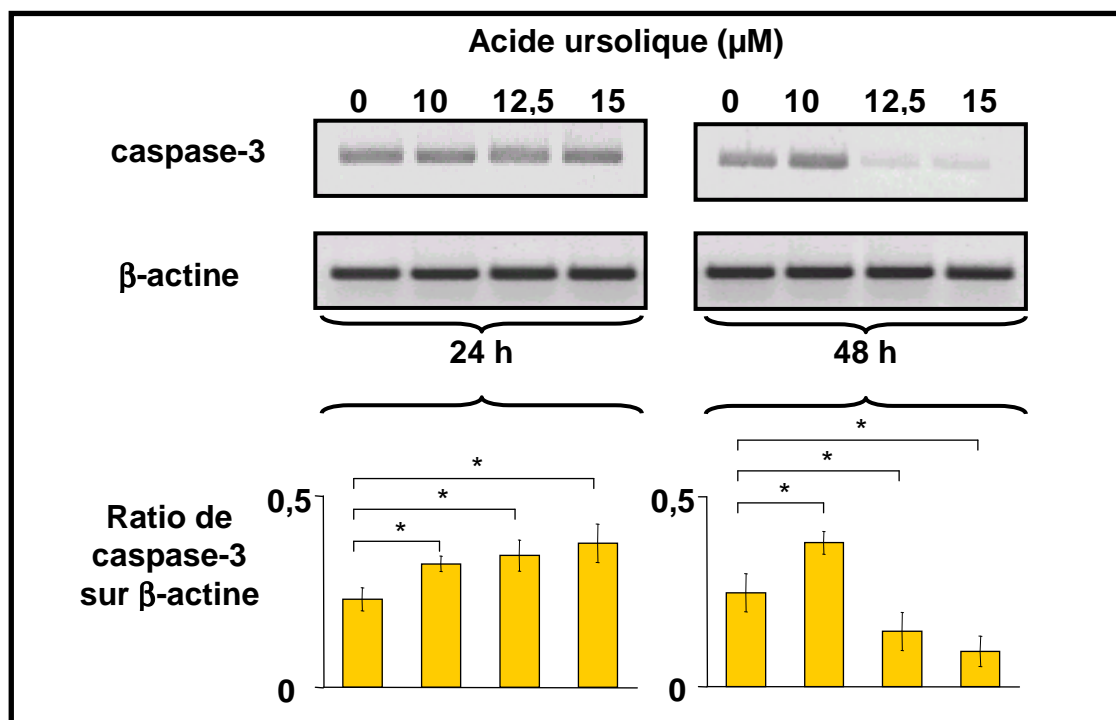
Nous avons étudié l'expression de l'ARNm de chacune de ces caspases par la technique RT-PCR, puis effectué par spectrofluorimétrie le dosage de leur activité enzymatique.

### **IV.1. Etude de la caspase-3**

#### **IV.1.1. Expression de l'ARNm de la caspase-3**

Après 24 heures de traitement, l'acide ursolique induit une augmentation dose dépendante de l'expression de l'ARNm de la caspase-3. Avec 15  $\mu$ M, cette augmentation est très significative : le ratio caspase-3 /  $\beta$ -actine est de 0,23 pour les cellules témoins et de 0,38 pour les cellules traitées, soit une augmentation d'un facteur de 1,65 (Figure 100).

Après 48 heures de traitement, nous observons successivement une augmentation de l'expression de l'ARNm, d'un facteur de 1,52 avec 10  $\mu$ M d'acide ursolique, puis une diminution de cette expression d'un facteur de 1,66 et de 2,77 quand les cellules sont traitées respectivement avec 12,5 et 15  $\mu$ M (Figure 99).



**Figure 99** : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-3 après 24 et 48 heures de traitement sur les cellules M4Beu.

Technique RT-PCR (n=3). (\* P<0,05)

#### IV.1.2. Activité enzymatique de la caspase-3

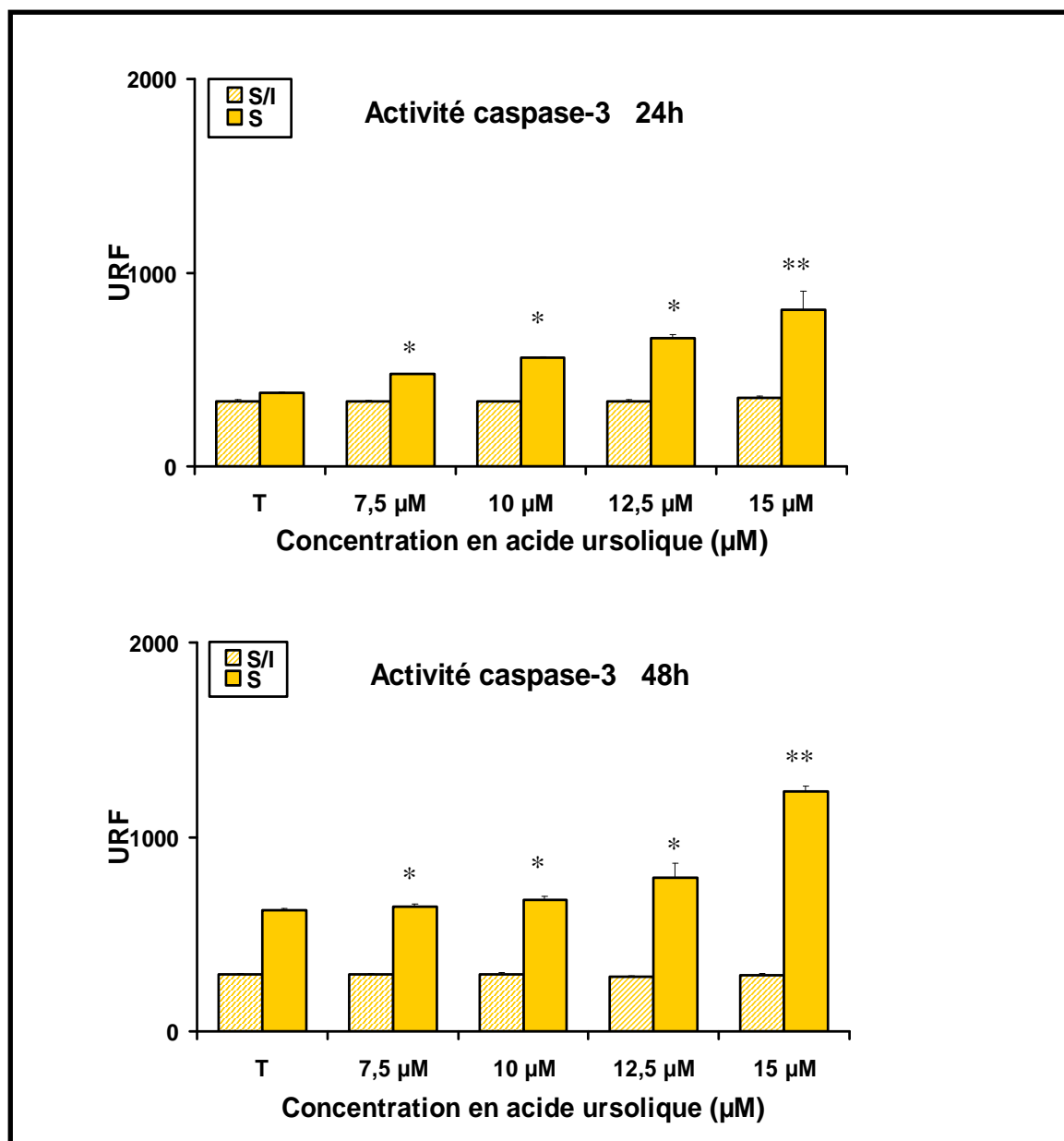
Nous avons mesuré l'activité enzymatique de la caspase-3 par spectrofluorimétrie à l'aide d'un substrat spécifique de la caspase-3 (Ac-DEVD-AMC). Nous avons également utilisé un inhibiteur spécifique de cette caspase (Ac-DEVD-CHO) ce qui nous permet de confirmer la spécificité du couple substrat/inhibiteur utilisé pour la caspase-3 et ainsi que l'activité mesurée est bien celle de la caspase-3. Les valeurs des activités enzymatiques sont exprimées en unité relative de fluorescence (URF) (Figure 100).

Après 24 heures de traitement, l'acide ursolique induit progressivement une augmentation de l'activité enzymatique :

- cellules non traitées : 381 URF ;
- cellules + 12,5 μM d'acide ursolique : 664 URF soit une augmentation d'un facteur de 1,74 ;
- cellules + 15 μM d'acide ursolique : 809 URF, soit une augmentation d'un facteur de 2,12.

Après 48 heures de traitement, l'acide ursolique induit une augmentation de l'activité enzymatique similaire à celle mesurée après 24 heures :

- cellules non traitées : 624 URF ;
- cellules + 12,5  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique : 792 URF soit une augmentation d'un facteur de 1,27 ;
- cellules + 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique : 1234 URF soit une augmentation d'un facteur de 1,98.



Cellules M4Beu en présence du substrat spécifique de caspase-3

Ac-DEVD-AMC

Cellules M4Beu en présence du couple substrat/inhibiteur spécifique de caspase-3

Ac-DEVD-AMC / Ac-DEVD-CHO

**Figure 100 :** Activité enzymatique de la caspase-3 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

(n=3). (\* P<0,05 ; \*\* P<0,01).



Parallèlement, pour chaque point expérimental, la fluorescence mesurée avec le couple substrat / inhibiteur reste constante, ce qui confirme que l'activité mesurée est celle de la caspase-3.

L'augmentation de l'activité de la caspase-3, mesurée après 24 heures de traitement avec différentes concentrations d'acide ursolique, est en adéquation avec l'augmentation de l'expression de l'ARNm mise en évidence au terme de la même période de traitement.

Après 48 heures de traitement, les concentrations 12,5 et 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique induisent une activation de la caspase-3, en revanche dans le même temps et pour ces deux concentrations, l'expression de l'ARNm de la caspase est diminuée.

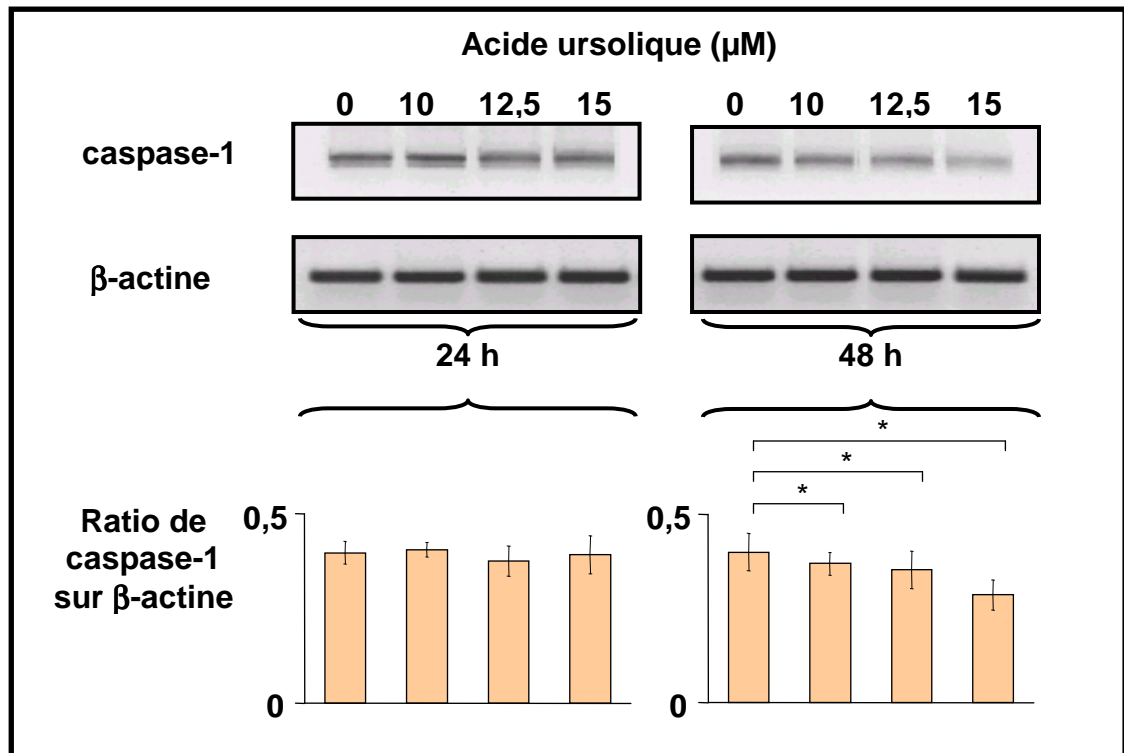
## **IV.2. Etude de la caspase-1**

La caspase-1 est majoritairement impliquée dans des événements inflammatoires qui conduisent à la nécrose cellulaire; cependant dans certains cas elle peut aussi activer la caspase-3 et ainsi induire l'apoptose (Choi *et al.*, 2004). Nous avons évalué l'expression de l'ARNm de la caspase-1, ainsi que son activité enzymatique.

### **IV.2.1. Expression de l'ARNm de la caspase-1**

Après 24 heures de traitement avec les différentes concentrations d'acide ursolique, aucune variation significative de l'expression de l'ARNm de la caspase-1 n'est mise en évidence par rapport aux cellules témoins (Figure 101).

Après 48 heures de traitement, l'acide ursolique diminue d'une manière dose-dépendante l'expression de l'ARNm de la caspase-1 : le ratio caspase-1 /  $\beta$ -actine est de 0,40 pour les cellules témoins et de 0,29 pour les cellules traitées avec 15  $\mu\text{M}$ , soit une diminution d'un facteur de 1,38 (Figure 101).



**Figure 101 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-1 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

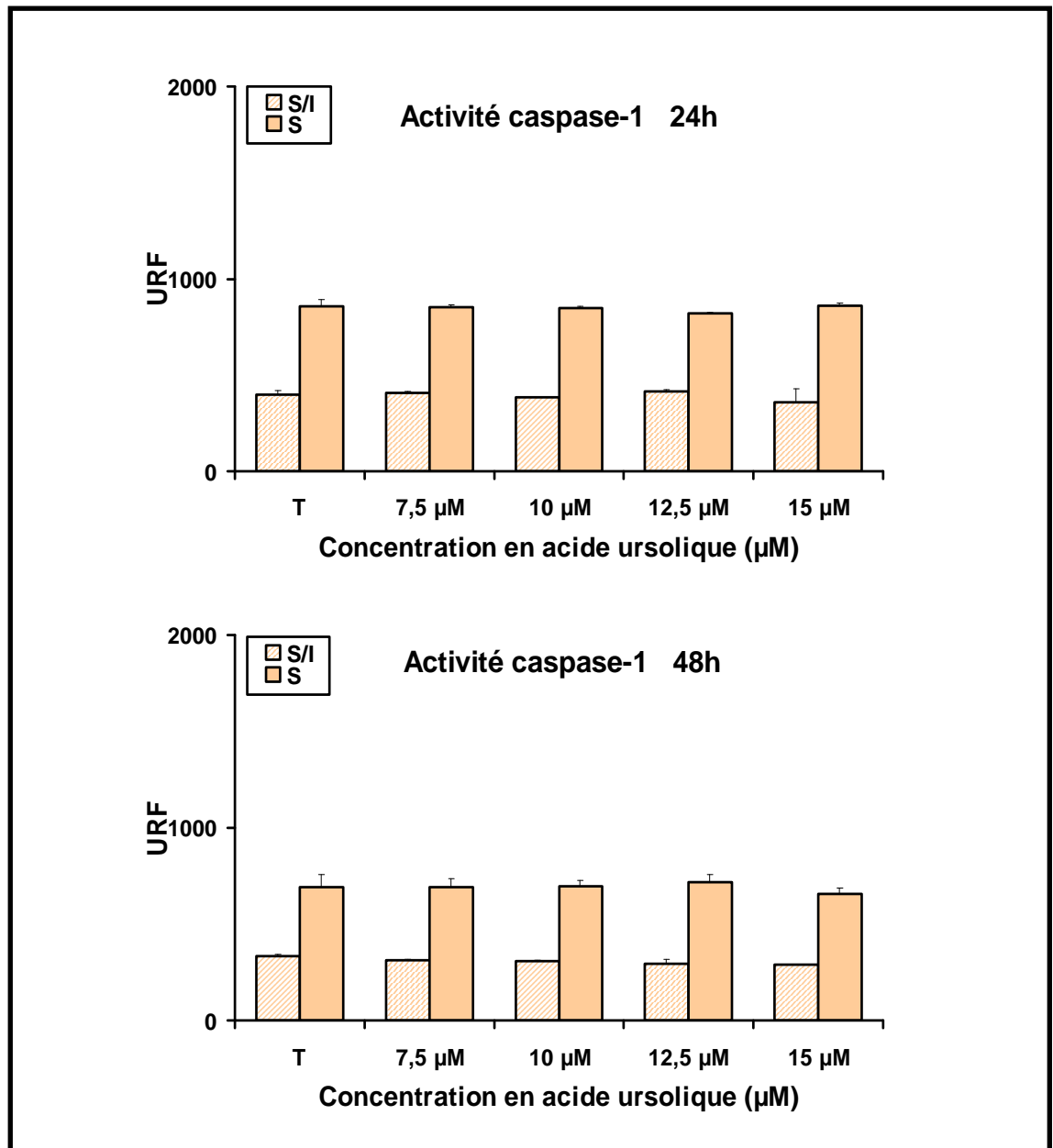
Technique RT-PCR (n=3). (\* P<0,05).

#### IV.2.2. Activité enzymatique de la caspase-1

Les expérimentations ont été réalisées en utilisant un substrat spécifique de la caspase-1 (Ac-YVAD-AMC) (Figure 102).

L'acide ursolique entraîne aucune variation significative de l'activité de la caspase-1, quelque soit la concentration utilisée et quelque soit la durée de traitement.

L'activité mesurée est bien celle de la caspase-1 puisque la présence de l'inhibiteur spécifique (Ac-YVAD-CHO) réprime cette activité.



Cellules M4Beu en présence du substrat spécifique de caspase-1

Cellules M4Beu en présence du couple substrat/inhibiteur spécifique de caspase-1

 Ac-YVAD-AMC

 Ac-YVAD-AMC / Ac-YVAD-CHO

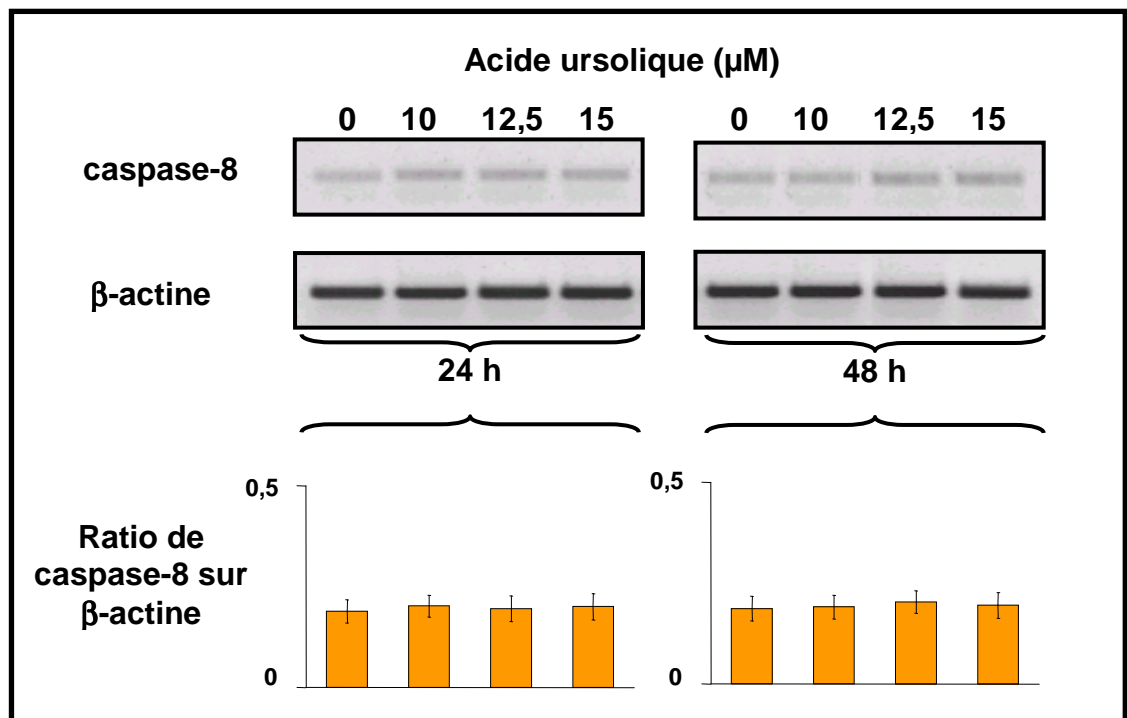
**Figure 102 :** Activité enzymatique de la caspase-1 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

### IV.3. Etude de la caspase-8

La caspase-8 est une caspase initiatrice de la voie des récepteurs ou voie extrinsèque.

#### IV.3.1. Expression de l'ARNm de la caspase-8

L'observation des bandes obtenues en RT-PCR après 24 et 48 heures d'incubation ne montrent pas de variation significative de l'expression des ARNm de la caspase-8 entre les cellules témoins et les cellules traitées (Figure 103). La quantification de ces bandes en évaluant les ratios de l'expression des ARNm de la caspase-8 par rapport à celle de la  $\beta$ -actine, confirme ces résultats.

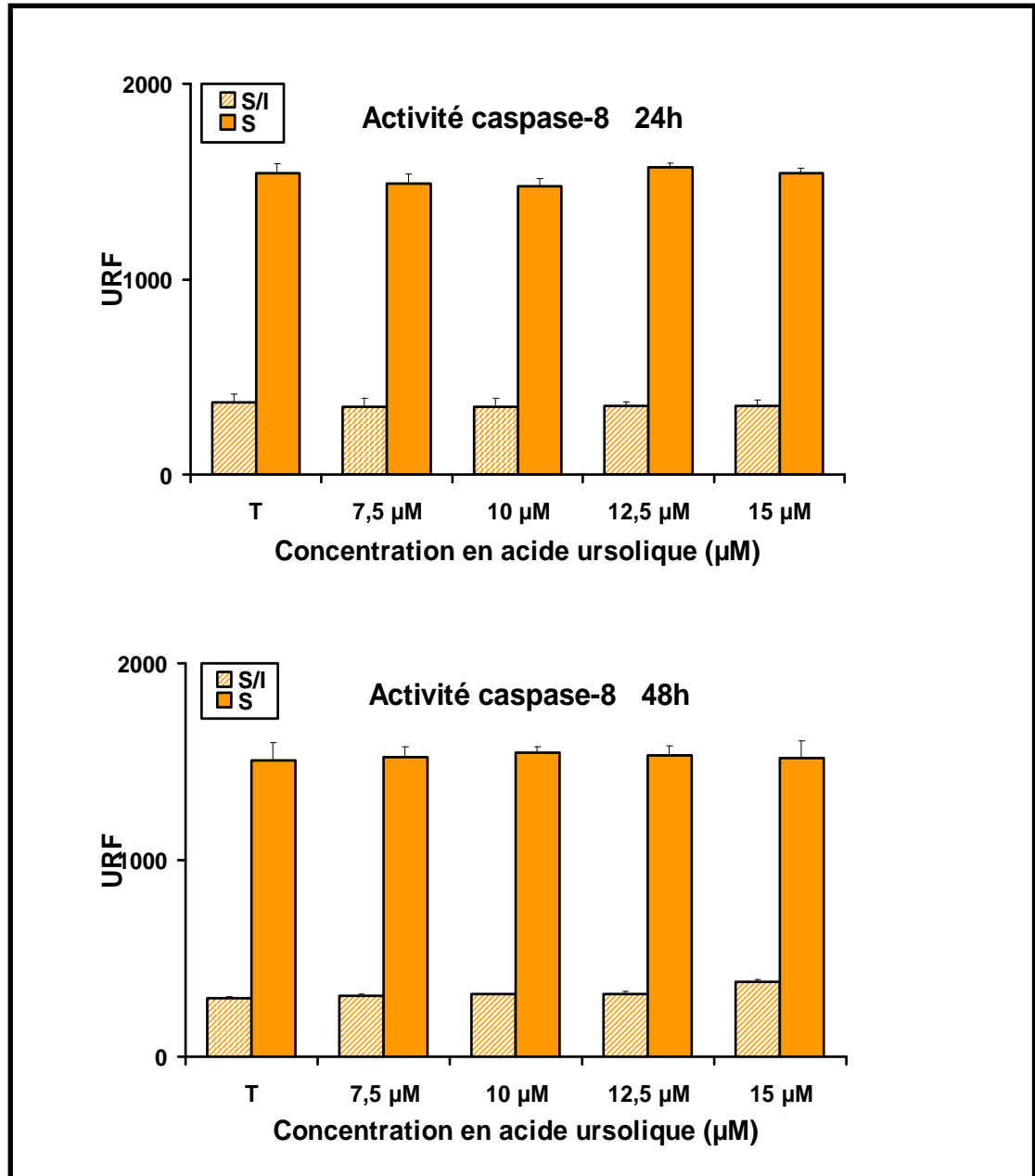


**Figure 103 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-8 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

Technique RT-PCR (n=3).

### IV.3.2. Activité enzymatique de la caspase-8

Les expérimentations ont été réalisées en utilisant un substrat spécifique de la caspase-8 (Ac-IETD-AMC) et un inhibiteur spécifique (Ac-IETD-CHO) (Figure 104).



Cellules M4Beu en présence du substrat spécifique de caspase-8

Cellules M4Beu en présence du couple substrat/inhibiteur spécifique de caspase-8

Ac-IETD-AMC

Ac-IETD-AMC / Ac-IETD-CHO

**Figure 104 :** Activité enzymatique de la caspase-8 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique.

Après 24 et 48 heures d'incubation, aucune variation de l'activité enzymatique n'est mise en évidence quand les cellules sont traitées avec de l'acide ursolique (Figure 104).

La présence de l'inhibiteur réprime l'activité de la caspase-8, ce qui vérifie la spécificité du substrat de la caspase-8. La présence de l'inhibiteur met également en évidence une activité basale de la caspase-8 relativement élevée.

L'étude de l'expression de l'ARNm de la caspase-8, ainsi que le dosage de son activité, montrent que l'acide ursolique est sans effet sur cette caspase, et semblent écarter ainsi la voie des récepteurs quand à leur implication dans l'apoptose des cellules M4Beu.

#### **IV.4. Etude de la caspase-9**

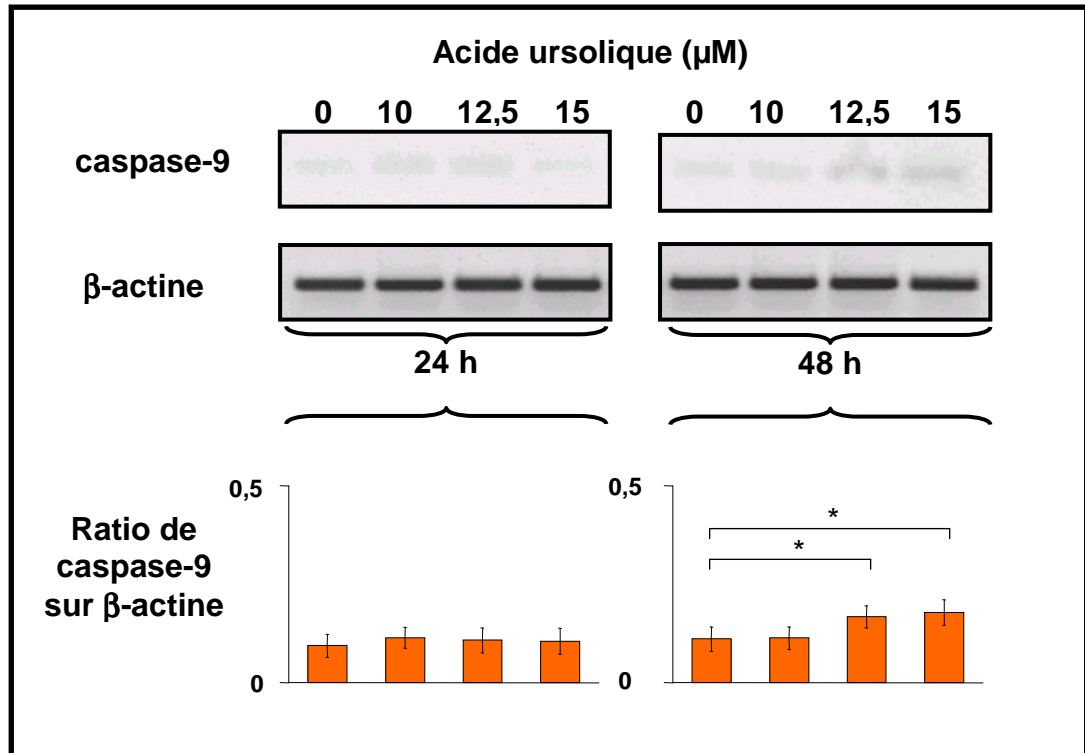
La caspase-9 caractérise la voie apoptotique intrinsèque ou voie mitochondriale.

##### **IV.4.1. Expression de l'ARNm de la caspase-9**

Après 24 heures d'incubation et par rapport aux cellules témoins, les différentes concentrations d'acide ursolique ne modifient pas l'expression de l'ARNm de la caspase-9 (Figure 105).

Après 48 heures de traitement, nous observons une augmentation de l'expression de l'ARNm avec 12,5 et 15  $\mu$ M d'acide ursolique :

- avec 12,5  $\mu$ M le ratio caspase-9 /  $\beta$ -actine est de 0,17 pour les cellules traitées et de 0,11 pour les cellules témoins, soit une augmentation de 1,54
- avec 15  $\mu$ M, le ratio est de 0,18 soit une augmentation de 1,64.

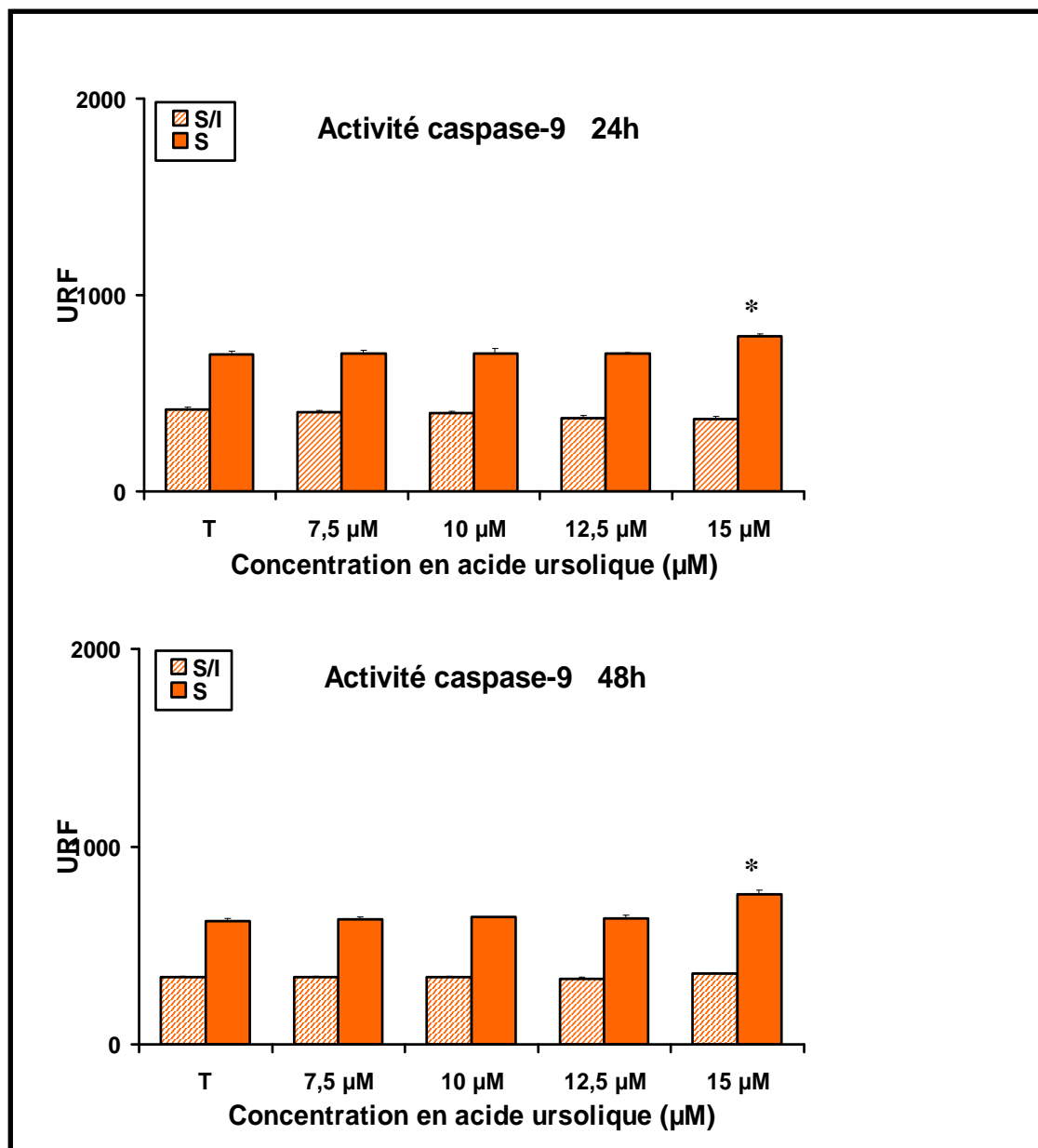


**Figure 105 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-9 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

Technique RT-PCR (n=3). (\*  $P < 0,05$ ).

#### IV.4.2. Activité enzymatique de la caspase-9

Les expérimentations ont été réalisées en utilisant un substrat spécifique de la caspase-9 (Ac-LEHD-AMC) et un inhibiteur spécifique (Ac-LEHD-CHO) (Figure 106).



Cellules M4Beu en présence du substrat spécifique de caspase-9

Cellules M4Beu en présence du couple substrat/inhibiteur spécifique de caspase-9

 Ac-LEHD-AMC

 Ac-LEHD-AMC / Ac-LEHD-CHO

**Figure 106 :** Activité enzymatique de la caspase-9 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique (n=3). (\* p<0,05).



Après 24 et 48 heures d'incubation, l'activité enzymatique de la caspase-9 n'est pas modifiée quand les cellules M4Beu sont traitées avec 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  et 12,5  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique par rapport aux cellules témoins. En revanche pour ces deux périodes d'incubation, une faible augmentation de l'activité enzymatique est mise en évidence avec 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique (Figure 106).

Après 24 heures de traitement :

- cellules non traitées : 697 URF ;
- cellules + 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique : 790 URF soit une augmentation d'un facteur de 1,13.

Après 48 heures de traitement,

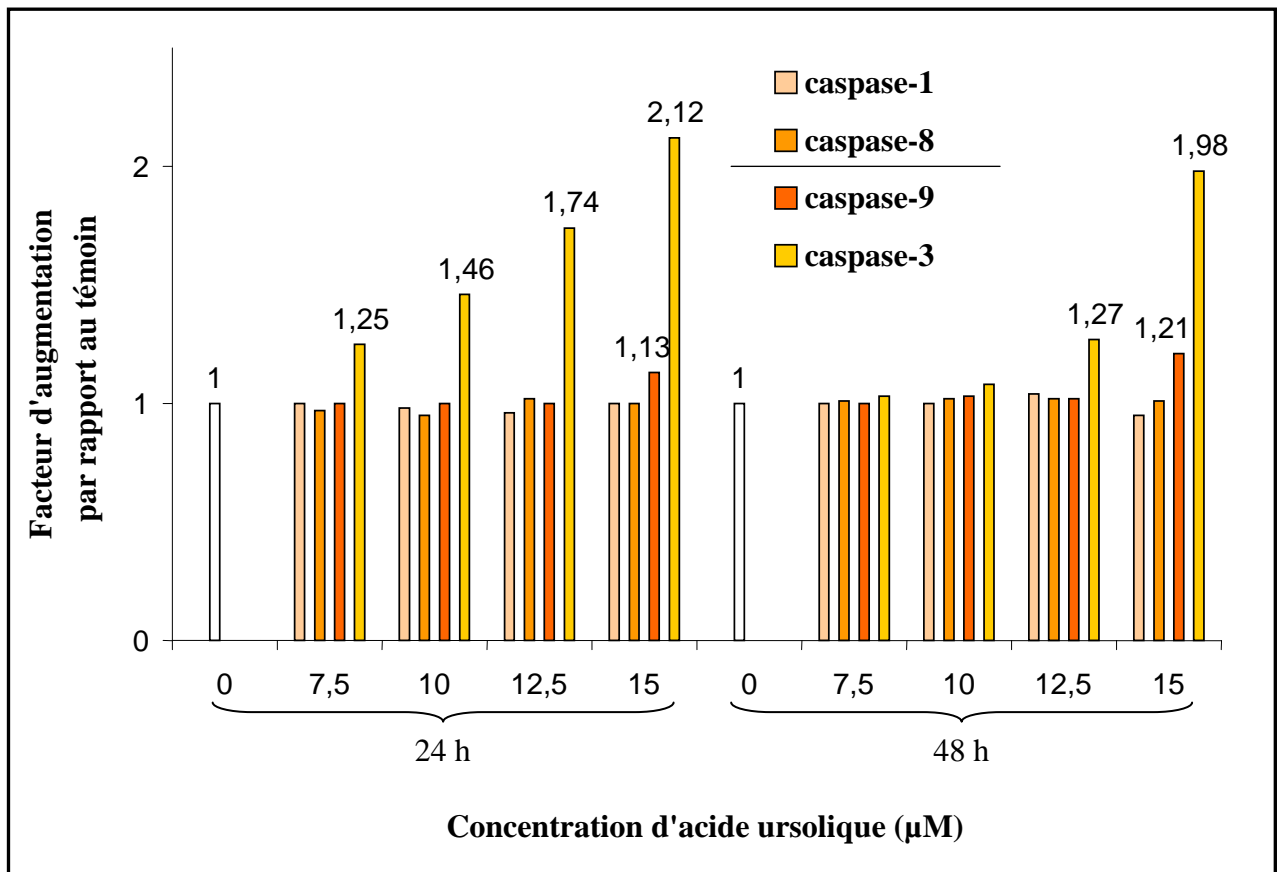
- cellules non traitées : 625 URF ;
- cellules + 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique : 759 URF soit une augmentation d'un facteur de 1,21.

La présence de l'inhibiteur spécifique réprime complètement l'activité de la caspase-9, ce qui confirme que l'activité mesurée est bien celle de la caspase-9.

#### **IV.5. Etude comparative de l'activité enzymatique des caspases étudiées**

Dans nos conditions expérimentales, le dosage de l'activité enzymatique de chacune des caspases montre que l'acide ursolique est sans effet sur la caspase-1 et sur la caspase-8 des cellules M4Beu. En revanche, l'acide ursolique induit l'activation de la caspase-3 et de la caspase-9 après 24 et 48 heures de traitement. L'activité très significative de la caspase-3 est mise en évidence à partir de 12,5  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, alors que l'activité plus modérée de la caspase-9 est mise en évidence avec 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique (Figure 107).

Ces résultats suggèrent que la voie mitochondriale pourrait être la voie initiatrice principale du processus apoptotique induit par l'acide ursolique sur les cellules M4Beu.



**Figure 107 :** Etude comparative des facteurs d'augmentation de l'activité des caspases des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

## V. Etude du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Ayant mis en évidence l'activation de la caspase-9, suggérant l'implication de la voie mitochondriale dans le processus apoptotique, nous avons étudié l'évolution du potentiel mitochondrial des cellules M4Beu traitées avec de l'acide ursolique. En effet la chute du potentiel mitochondrial est la première perturbation cellulaire détectable au cours du processus apoptotique issu de la voie mitochondriale.

### V.1 Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial par marquage *in situ* avec le fluorochrome JC-1

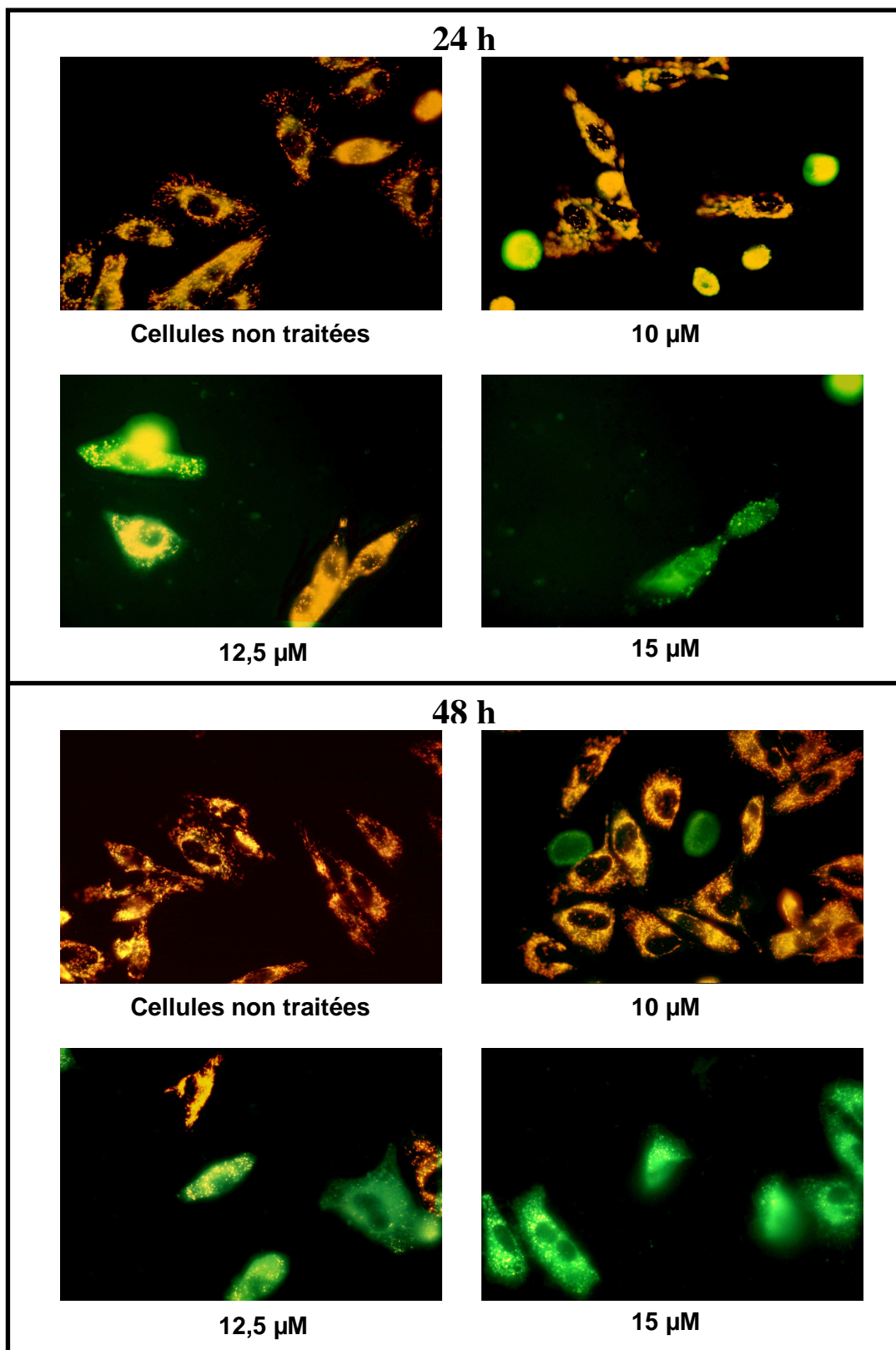
Nous avons effectué un marquage *in situ* avec le fluorochrome JC-1 sur les cellules M4Beu pour avoir une vision qualitative du potentiel mitochondrial de ces cellules quand elles sont traitées avec de l'acide ursolique. Le marquage est opéré uniquement sur les cellules vivantes, adhérentes au support de la boîte de culture ; les cellules mortes sont éliminées par lavage lors du protocole opératoire.

Le fluorochrome JC-1 permet de montrer par spectrofluorimétrie l'état du potentiel mitochondrial des cellules vivantes : parmi celles-ci, les cellules vivantes, non apoptotiques, à haut potentiel mitochondrial, émettent une fluorescence dans le orange, alors que les cellules vivantes à bas potentiel, comme les cellules en cours d'apoptose, émettent une fluorescence dans le vert.

Après 24 et 48 heures d'incubation, les cellules non traitées présentent majoritairement une fluorescence orange, ce qui indique la présence de cellules vivantes, non apoptotiques, à haut potentiel mitochondrial (Figure 108).

Pour les mêmes périodes d'incubation, les cellules traitées présentent une hétérogénéité intra-cellulaire entre les fluorescences orange et verte, ce qui traduit une évolution du potentiel mitochondrial dans une même cellule. Nous pouvons également observer que le nombre de cellules qui fluorescent dans le vert augmente très significativement en fonction de la concentration en acide ursolique et de la durée du traitement.

Ces résultats montrent que l'acide ursolique induit une chute du potentiel mitochondrial des cellules M4Beu, ce qui conforte l'hypothèse du rôle de la voie mitochondriale dans ce processus apoptotique.



**Figure 108 :** Marquage *in situ* du potentiel mitochondrial membranaire des cellules M4Beu avec le fluorochrome JC-1 après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations.

Grossissement x 400. (n=3).

## **V.2. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial en cytométrie de flux**

Afin de quantifier la chute du potentiel mitochondrial mis en évidence par le marquage *in situ*, mais aussi pour déterminer le taux d'apoptose induit par l'acide ursolique sur les cellules M4Beu, nous avons utilisé la cytométrie de flux et effectué un double marquage cellulaire :

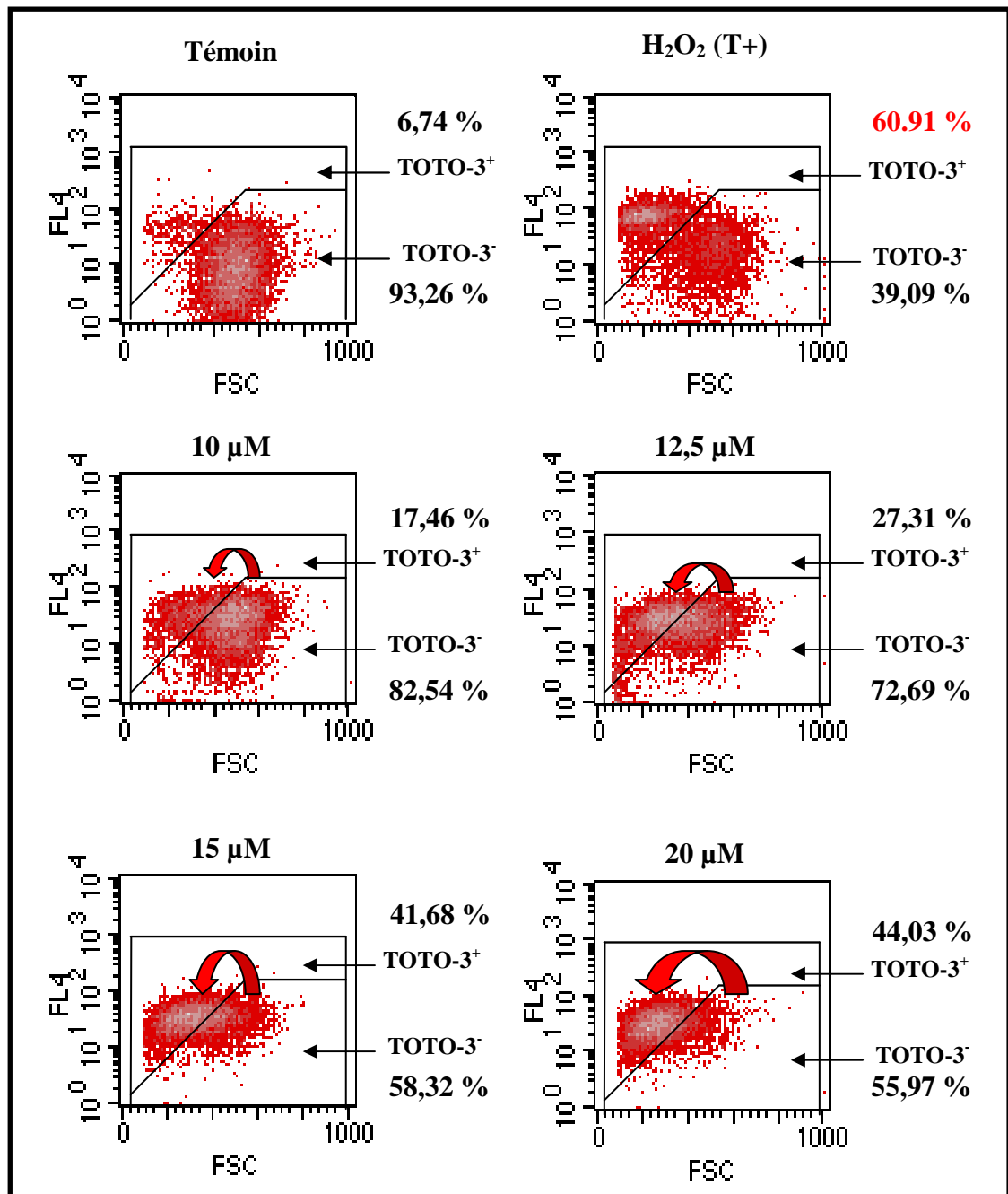
- à l'aide du fluorochrome TOTO-3, afin de réaliser une discrimination entre les cellules mortes et les cellules vivantes (cellules non apoptotiques et cellules en cours d'apoptose) ;
- à l'aide du fluorochrome JC-1, afin d'étudier l'évolution du potentiel mitochondrial transmembranaire des cellules vivantes discriminées ;
- à l'aide des fluorochromes TOTO-3 et JC-1, afin de déterminer le taux d'apoptose sur la population cellulaire totale.

### **V.2.1. Discrimination entre les cellules vivantes et les cellules mortes avec le fluorochrome TOTO-3**

Les cellules mortes qui ont perdu leur intégrité membranaire laissent pénétrer le fluorochrome TOTO-3 qui s'intercale alors dans l'ADN nucléaire. Cette population cellulaire qui englobe les cellules en état de nécrose ou en apoptose secondaire va émettre une fluorescence dans le rouge. Une analyse en CMF va permettre de discriminer ces cellules mortes, appelées TOTO-3<sup>+</sup>, et les cellules vivantes appelées TOTO-3<sup>-</sup>.

Les figures 109 et 110 représentent, à partir des cellules M4Beu traitées avec de l'acide ursolique, les cytogrammes de répartition des cellules mortes et des cellules vivantes.

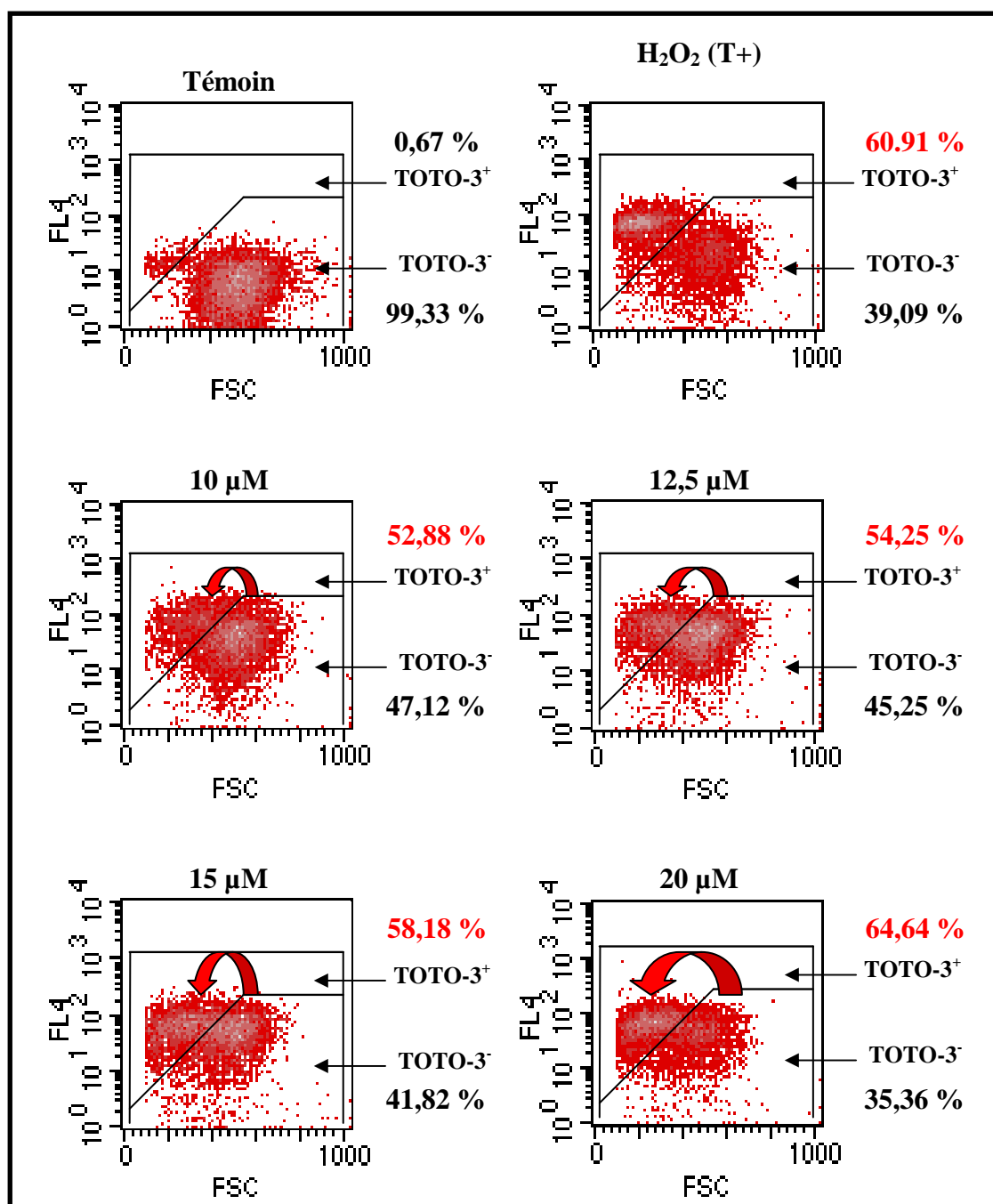
Comme dans l'étude précédente sur la lignée HaCaT, le fluorochrome TOTO-3 en discriminant les cellules mortes et les cellules vivantes met également en évidence l'effet anti-prolifératif dose et temps dépendants de l'acide ursolique. L'IC<sub>50</sub> est légèrement supérieur à 20 µM d'acide ursolique après 24 heures de traitement, et proche de 10 µM d'acide ursolique après 48 heures.



**Figure 109 :** Cytogrammes de répartition des cellules M4Beu mortes (TOTO-3<sup>+</sup>) et vivantes (TOTO-3<sup>-</sup>) après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique.

FSC (Forward Scatter) en fonction de FL4 (l'intensité relative de fluorescence rouge en TOTO-3). (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Témoïn positif).

Cytogrammes représentatifs de l'une des trois expérimentations (n=3).



**Figure 110 :** Cytogrammes de répartition des cellules M4Beu mortes (TOTO-3<sup>+</sup>) et vivantes (TOTO-3<sup>-</sup>) après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

FSC (Forward Scatter) en fonction de FL4 (l'intensité relative de fluorescence rouge en TOTO-3). (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Témoin positif).

Cytogrammes représentatifs de l'une des trois expérimentations (n=3).

### **V.2.2. Evolution du potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules vivantes (TOTO-3') à l'aide du fluorochrome JC-1**

Le fluorochrome JC-1 permet de montrer l'état du potentiel mitochondrial transmembranaires des cellules vivantes.

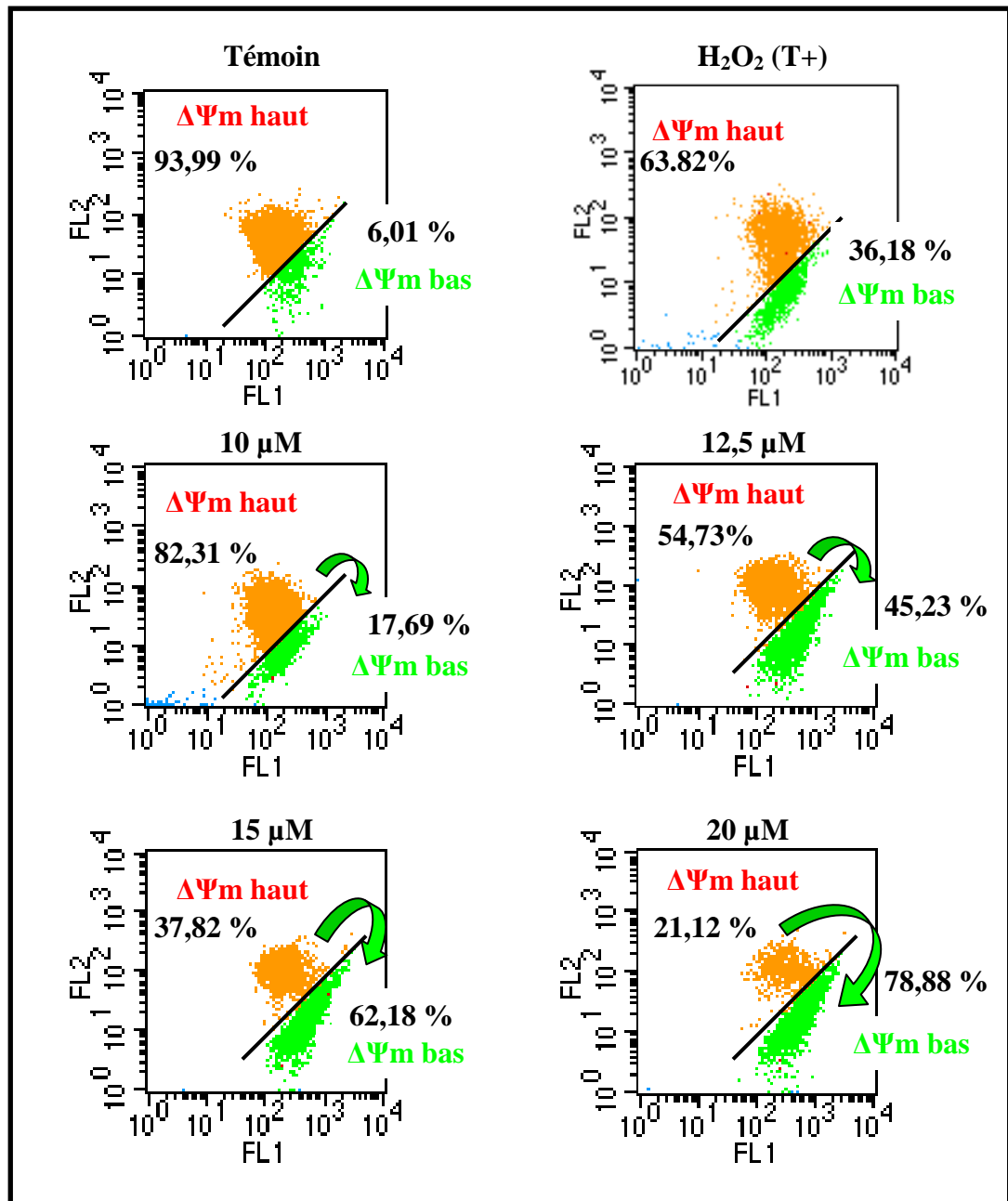
Les figures 111 et 112 représentent les cytogrammes de répartition des cellules M4Beu à haut et à bas potentiel mitochondrial.

Après 24 heures de traitement, l'acide ursolique induit de manière dose dépendante la chute du potentiel mitochondrial. Avec 20  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, 78,88% de cellules présentent un bas potentiel mitochondrial (Figure 111).

Après 48 heures de traitement, le pourcentage de cellules à bas potentiel augmente très significativement de 17,69% pour les cellules témoins à 53% pour les cellules traitées avec 10  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique. En revanche pour les concentrations 12,5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$ , nous pouvons observer une diminution de ce nombre de cellules à bas potentiel mitochondrial, avec respectivement, 12,37%, 12,1% et 14,41% (Figure 112).

L'évolution du pourcentage de cellules à haut et bas potentiel, en fonction de la concentration d'acide ursolique est représentée sur la figure 113.





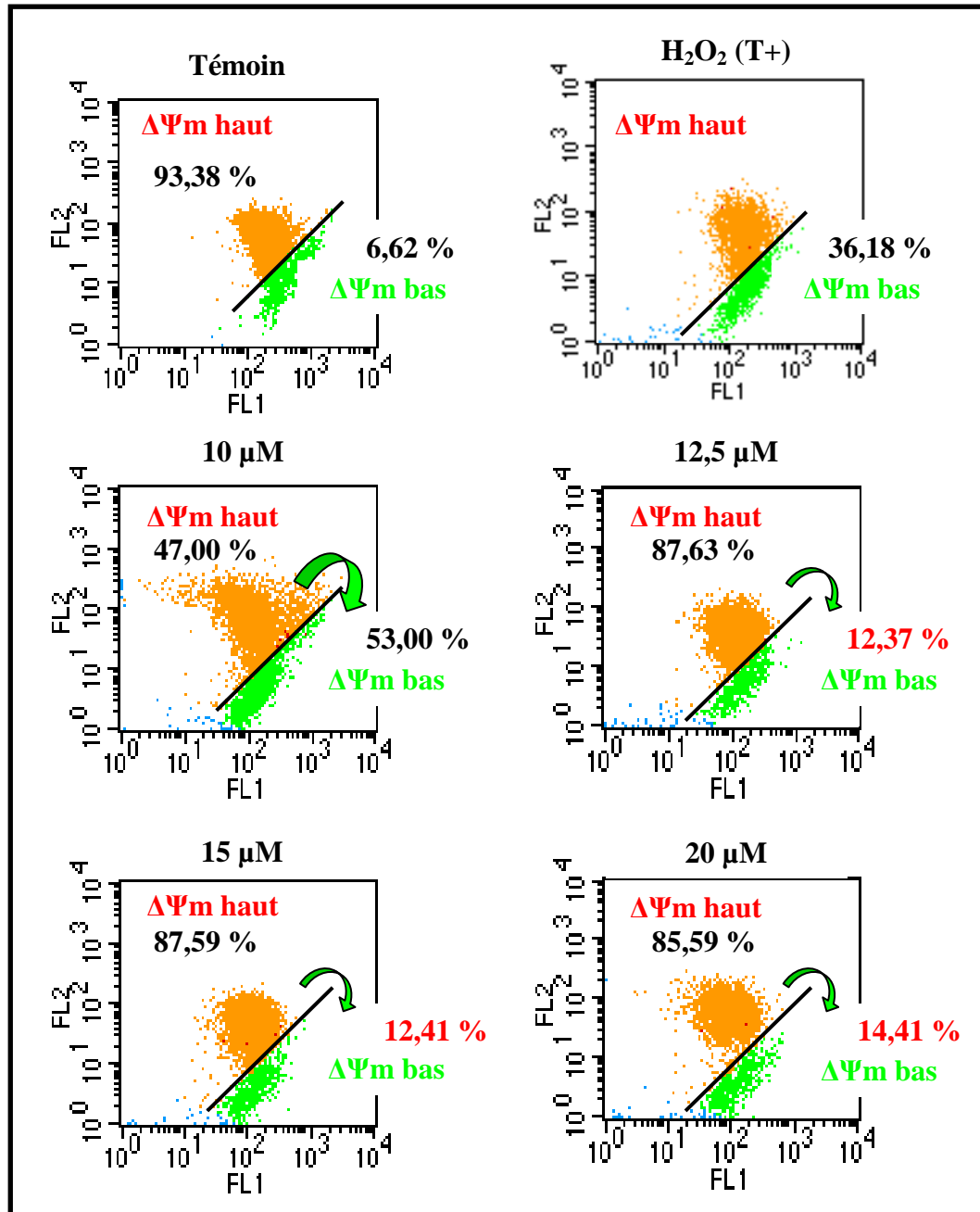
**Figure 111 :** Sur les cellules M4Beu vivantes (TOTO-3<sup>-</sup>), cytogrammes de répartition des cellules à haut potentiel et des cellules à bas potentiel transmembranaire mitochondrial après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Analyse en CMF avec JC-1. (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Témoïn positif)

FL1 : intensité relative de fluorescence verte du JC-1

FL2 : intensité relative de fluorescence orange du JC-1

Cytogrammes représentatifs de l'une des trois expérimentations (n=3).



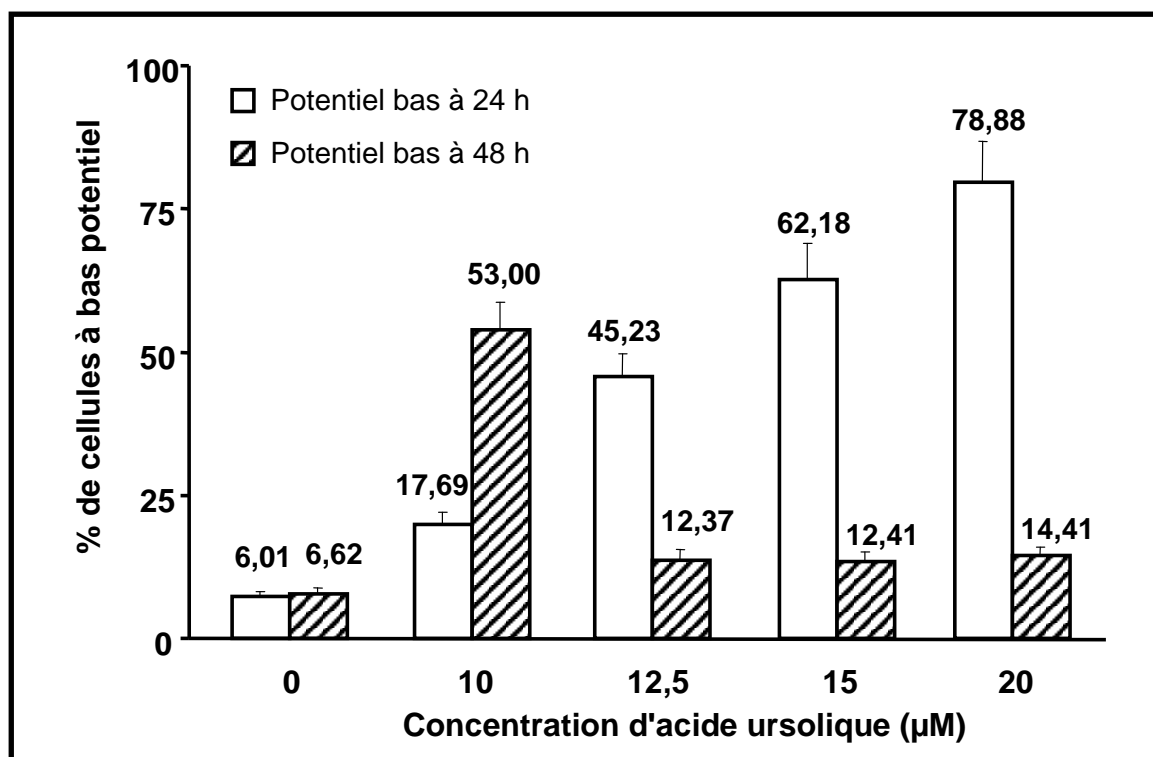
**Figure 112 :** Sur les cellules M4Beu vivantes (TOTO-3<sup>-</sup>), cytogrammes de répartition des cellules à haut potentiel et des cellules à bas potentiel transmembranaire mitochondrial après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

Analyse en CMF avec JC-1. (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Témoin positif)

FL1 : intensité relative de fluorescence verte du JC-1

FL2 : intensité relative de fluorescence orange du JC-1

Cytogrammes représentatifs de l'une des trois expérimentations (n=3).



**Figure 113 :** Histogrammes de répartition du pourcentage des cellules M4Beu possédant des mitochondries à bas potentiel transmembranaire après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

### **V.2.3. Détermination du taux d'apoptose sur la population cellulaire M4Beu totale à l'aide du double marquage TOTO-3 et JC-1 en CMF**

Le pourcentage de cellules à bas potentiel mitochondrial, mis en évidence avec le fluorochrome JC-1 sur la population cellulaire vivante, correspond également, pour la même population, au pourcentage de cellules en cours d'apoptose. Cependant pour déterminer le pourcentage réel de cellules en cours d'apoptose induit par l'acide ursolique sur les cellules M4Beu, nous devons prendre en compte la population cellulaire totale et pas uniquement la population cellulaire vivante. C'est ainsi que nous avons effectué une analyse en CMF à partir des trois sous types de population :

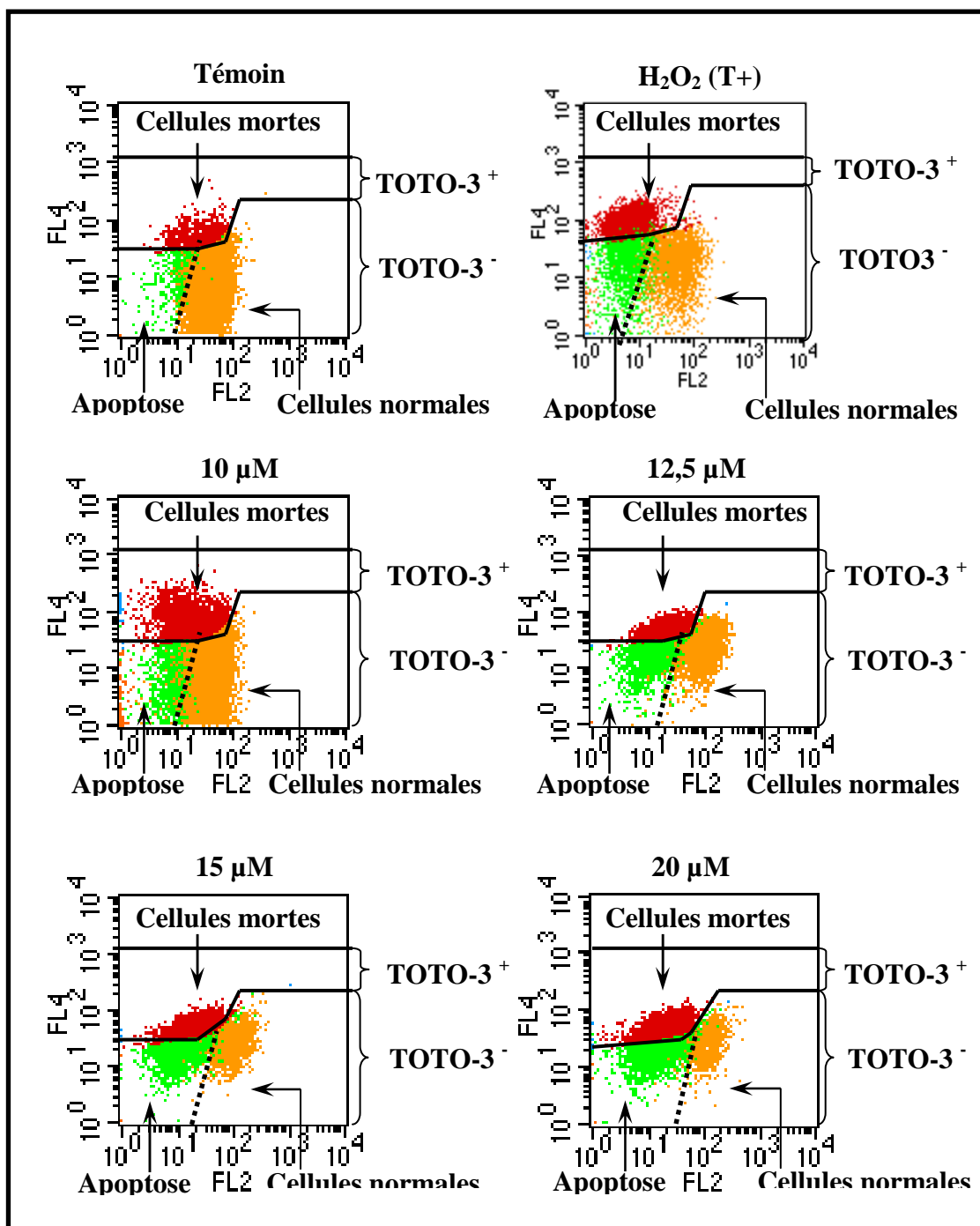
- cellules mortes, TOTO-3<sup>+</sup>,
- cellules vivantes, TOTO-3<sup>-</sup> à haut potentiel mitochondrial,
- cellules vivantes en cours d'apoptose, TOTO-3<sup>-</sup> à bas potentiel mitochondrial.

Les figures 114 et 115 représentent les cytogrammes de répartition des trois sous types de population après 24 et 48 heures de traitement. Les différentes valeurs de cette répartition de population sont présentées dans le tableau 16.

Après 24 heures de traitement, l'acide ursolique induit de manière dose-dépendante le processus apoptotique sur les cellules M4Beu : le pourcentage de cellules en cours d'apoptose est de 12,26% pour les cellules témoins et atteint 21,94% pour les cellules traitées avec 10  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique. Le pourcentage de cellules apoptotiques est particulièrement important à la concentration 20  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique avec un taux de 40,45% (Tableau 16).

Après 48 heures de traitement et par rapport à 24 heures, le pourcentage de cellules apoptotique n'évolue pas avec 10  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique avec respectivement 21,94 et 21,43% pour les deux périodes de traitement. Pour les concentrations 12,5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, et toujours par rapport à 24 heures, le pourcentage de cellules apoptotiques diminue et est de l'ordre de 10% (Tableau 16).

Cette analyse en CMF fait apparaître de manière indiscutable que la voie mitochondriale est la voie de transduction principale du processus apoptotique induit par l'acide ursolique sur les cellules M4Beu.



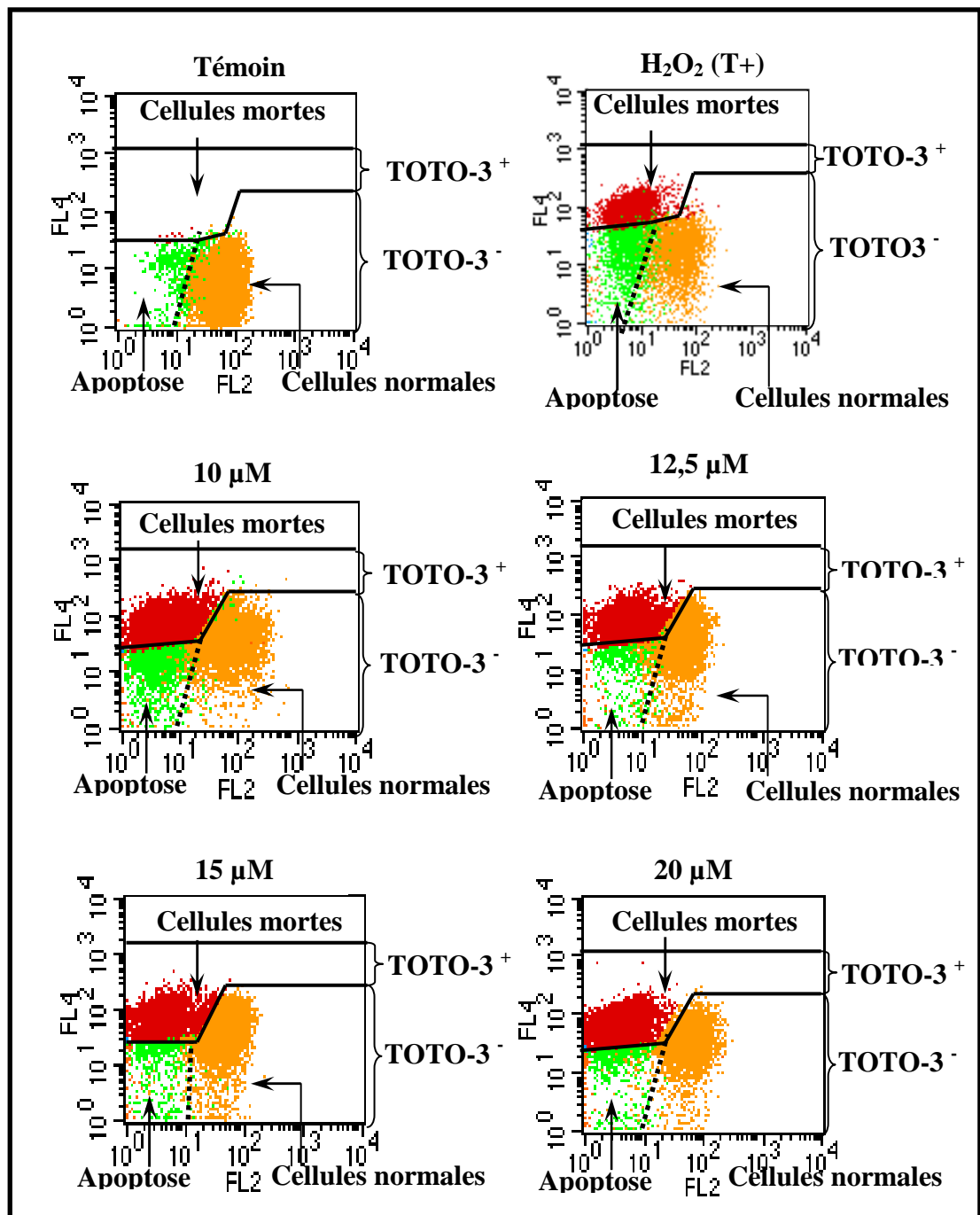
FL2 : Fluorescence orange vs FL4 : Fluorescence rouge ( $H_2O_2$ =Témoïn positif).

**Figure 114 :** Cytogrammes de répartition des trois sous-populations des cellules M4Beu à partir de la population cellulaire totale après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique. Analyse en CMF avec TOTO-3 et JC-1.

TOTO-3<sup>+</sup> : cellules mortes (nécrose + apoptose II<sup>ère</sup>)

TOTO-3<sup>-</sup> : cellules vivantes « normales » = haut potentiel mitochondrial et cellules vivante en apoptose I<sup>ère</sup> = bas potentiel mitochondrial.

Cytogrammes représentatifs de l'une des trois expérimentations (n=3).



FL2 : Fluorescence orange vs FL4 : Fluorescence rouge ( $H_2O_2$ =Témoïn positif).

**Figure 115 :** Cytogrammes de répartition des trois sous-populations des cellules M4Beu à partir de la population cellulaire totale après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. Analyse en CMF avec TOTO-3 et JC-1.

TOTO-3<sup>+</sup> : cellules mortes (nécrose + apoptose II<sup>ère</sup>)

TOTO-3<sup>-</sup> : cellules vivantes « normales » = haut potentiel mitochondrial et cellules vivante en apoptose I<sup>ère</sup> = bas potentiel mitochondrial.

Cytogrammes représentatifs de l'une des trois expérimentations (n=3).

Temps	Traitement		Cellules vivantes (%) (TOTO-3)		Cellules mortes (%) (TOTO-3 <sup>+</sup> )	Population Totale (%)
			Apoptose (~ΔΨ <sub>m</sub> bas)	Normales (~ΔΨ <sub>m</sub> haut)		
-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (T+)		18,67±2,42	22,50±1,66	58,83±1,56	100,00
<b>24 h</b>	Témoin		12,26±1,47	78,74±4,52	9,00±1,02	100,00
	[UA] (μM)	10	21,94±1,69	55,57±3,21	22,49±1,73	100,00
		12,5	<b>31,80±2,20</b>	40,71±2,68	27,49±1,77	100,00
		15	<b>33,15±2,41</b>	23,83±1,87	<b>43,02±2,41</b>	100,00
		20	<b>40,45±2,11</b>	<b>15,46±1,45</b>	<b>44,09±2,86</b>	100,00

Temps	Traitement		Cellules vivantes (%) (TOTO-3)		Cellules mortes (%) (TOTO-3 <sup>+</sup> )	Population Totale (%)
			Apoptose (~ΔΨ <sub>m</sub> bas)	Normales (~ΔΨ <sub>m</sub> haut)		
-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (T+)		18,67±2,42	22,50±1,66	58,83±1,56	100,00
<b>48 h</b>	Témoin		8,27±1,13	83,16±3,49	8,57±0,87	100,00
	[UA] (μM)	10	<b>21,43±2,07</b>	<b>26,42±1,36</b>	<b>52,15±3,66</b>	100,00
		12,5	10,66±1,28	<b>35,27±1,85</b>	<b>54,07±3,41</b>	100,00
		15	11,35±1,32	<b>29,76±1,42</b>	<b>58,89±3,87</b>	100,00
		20	8,61±0,93	<b>27,82±1,24</b>	<b>63,57±4,01</b>	100,00

**Tableau 16 :** Sur la population totale des cellules M4Beu, analyse de la répartition des cellules mortes et vivantes « normales » et les cellules vivantes en cours d'apoptose. Analyse en CMF avec les fluorochromes TOTO-3 et JC-1.

## **VI. Etude des molécules apoptogènes libérées à partir de la mitochondrie : cytochrome c et « Apoptosis Inducing factor » (AIF)**

La chute du potentiel transmembranaire mitochondrial qui a lieu lors du processus apoptotique s'accompagne généralement d'une libération dans le cytoplasme de molécules apoptogènes dont le cytochrome c et l'AIF.

Dans notre étude, la voie mitochondriale semble prépondérante dans le processus apoptotique induit par l'acide ursolique puisque la chute du potentiel mitochondrial observée est significative. Ainsi, afin de mettre en évidence l'expression des protéines AIF et cytochrome c, nous avons étudié l'expression de ces protéines à l'aide de la technique Western Blot. Nous avons aussi réalisé un marquage immunofluorescent indirect afin de mettre en évidence un relargage éventuel dans le cytoplasme de ces deux molécules apoptogènes.

### **VI.1. Etude du cytochrome c par immunofluorescence indirecte**

Dans la signalisation de la voie mitochondriale, le cytochrome c joue un rôle essentiel comme co-facteur : en effet, libéré par la mitochondrie, le cytochrome c se lie dans le cytosol à la protéine régulatrice « Apoptosis Protein Activating Factor-1 » (APAF-1) et à la pro-caspase-9; le complexe ainsi formé, l'apoptosome, induit l'activation de la caspase-9.

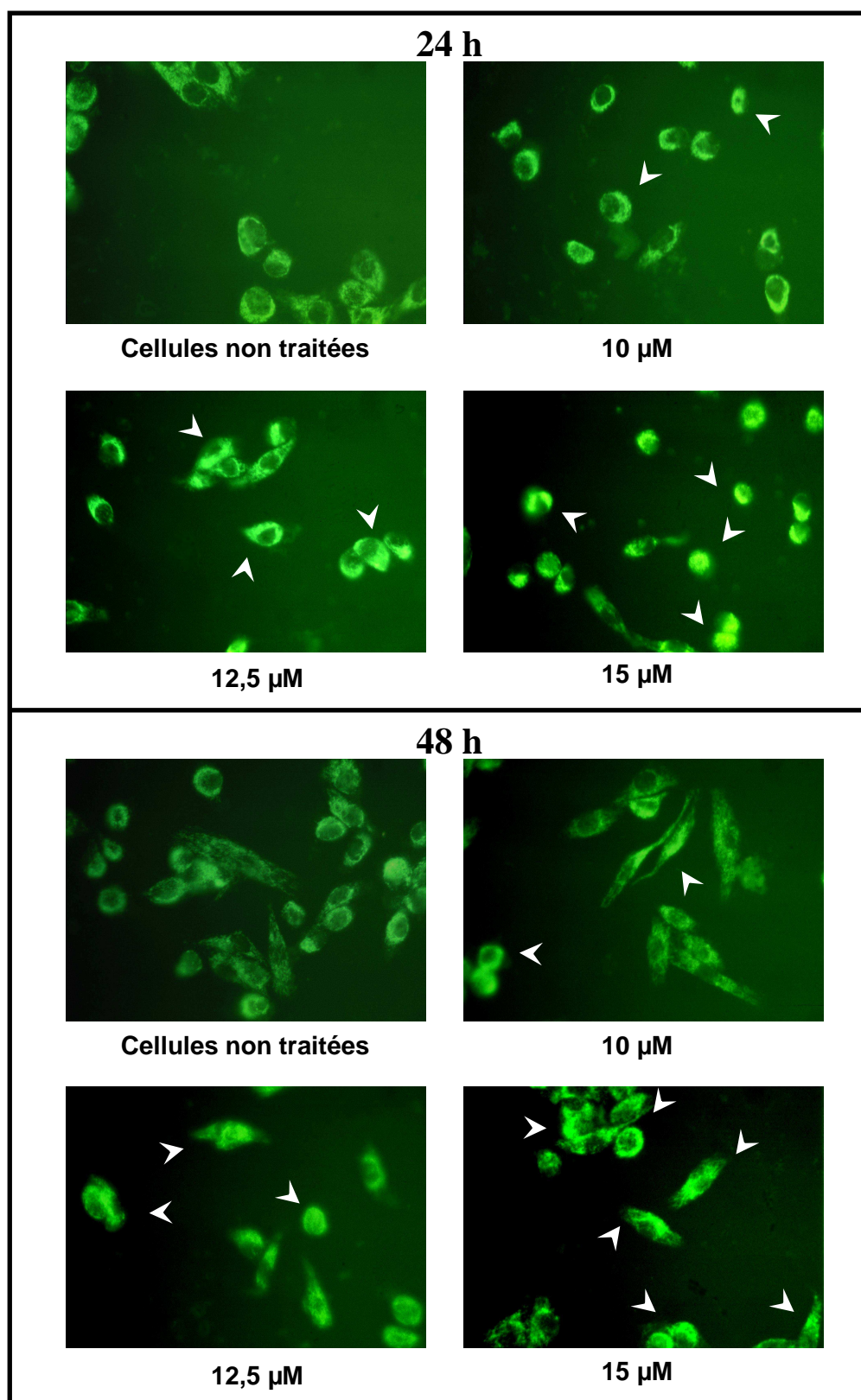
Dans cette étude, pour mettre en évidence la libération du cytochrome c, nous avons effectué sur les cellules M4Beu un marquage immunofluorescent indirect avec un anticorps de souris anti-cytochrome c humain et un anticorps anti-souris couplé au fluorochrome FITC.

Après 24 et 48 heures de traitement et par rapport aux cellules non traitées, l'acide ursolique induit de manière dose et temps dépendants la libération du cytochrome c : le nombre de cellules, mais aussi l'intensité de fluorescence au niveau du cytoplasme augmentent en fonction de la concentration de l'acide ursolique et de la durée du traitement (Figure 116).

NB : Nous avons étudié l'expression de la protéine cytochrome c par Western Blot.

Les résultats obtenus ne sont pas présentés ici : la technique opératoire, même répétée plusieurs fois, ne nous a pas permis d'obtenir un marquage cohérent des cellules traitées, mais également des cellules témoins.





**Figure 116 :** Immunofluorescence indirecte du cytochrome c des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique. Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations. Grossissement x 200. (n=3).

## VI.2. Etude de l'« Apoptosis Inducing Factor » (AIF)

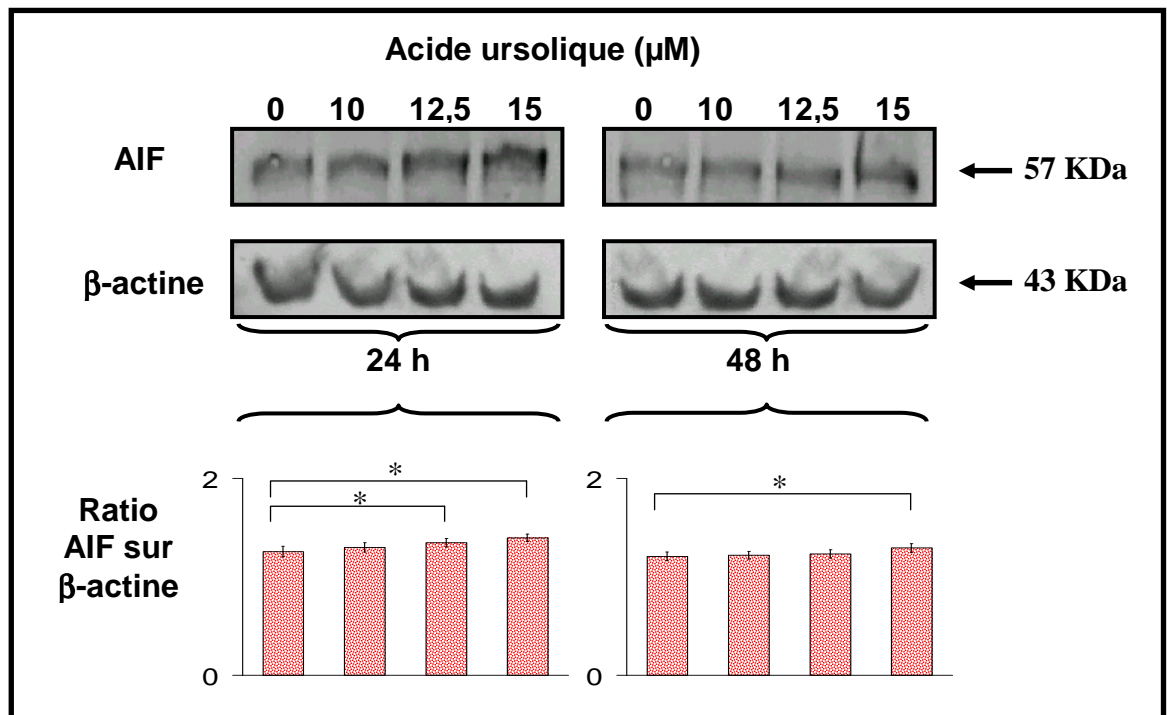
Lors de l'apoptose, l'AIF est libérée par la mitochondrie dans le cytoplasme. Cette protéine est ensuite transloquée dans le noyau où elle va se fixer à l'ADN pour le fragmenter.

Pour mettre en évidence la libération de l'AIF, nous avons étudié l'expression de cette protéine par Western Blot et par marquage immunofluorescent indirect à l'aide d'un anticorps anti-AIF, mais sur lequel nous fixons un second anticorps couplé au fluorochrome FITC.

### VI.2.1. Expression de la protéine AIF par la technique Western Blot

Après 24 et 48 heures d'incubation, nous pouvons observer une faible augmentation de l'expression de la protéine AIF en fonction de la concentration d'acide ursolique (Figure 117).

Le calcul des ratios AIF /  $\beta$ -actine confirme cette observation.



**Figure 117 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine AIF des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

Technique Western Blot (n=3). (\* P<0,05).

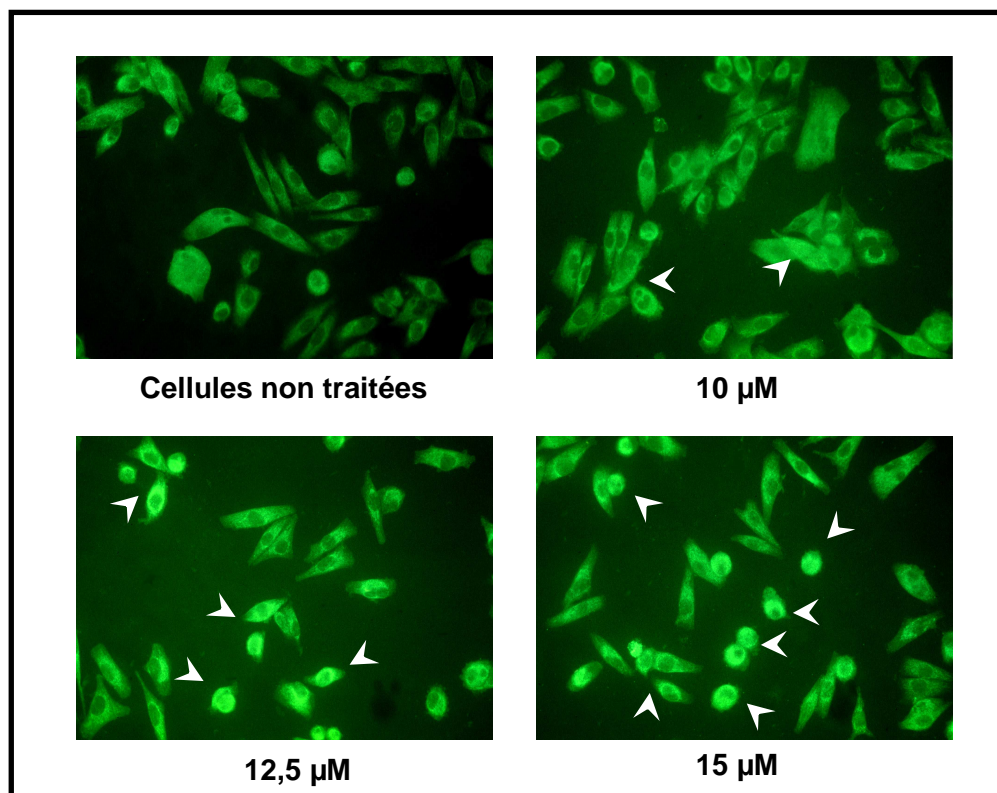
Après 24 heures de traitement, le ratio est de 1,26 pour les cellules témoins et de 1,30, 1,35 et 1,40 pour les cellules traitées avec 10, 12,5 et 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, respectivement. Soit une augmentation d'un facteur de 1,03, 1,07 et 1,11.

Après 48 heures de traitement, le ratio est de 1,21 pour les cellules témoins et de 1,22, 1,23 et 1,29 pour les cellules traitées avec 10, 12,5 et 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, respectivement. Soit une augmentation d'un facteur de 1,01, 1,02 et 1,07.

Nous pouvons en déduire une faible augmentation de l'expression de AIF dose-dépendante dans les cellules M4Beu traitées avec de l'acide ursolique durant 24 et 48 heures.

### VI.2.2. Expression de la protéine AIF par immunofluorescence indirecte

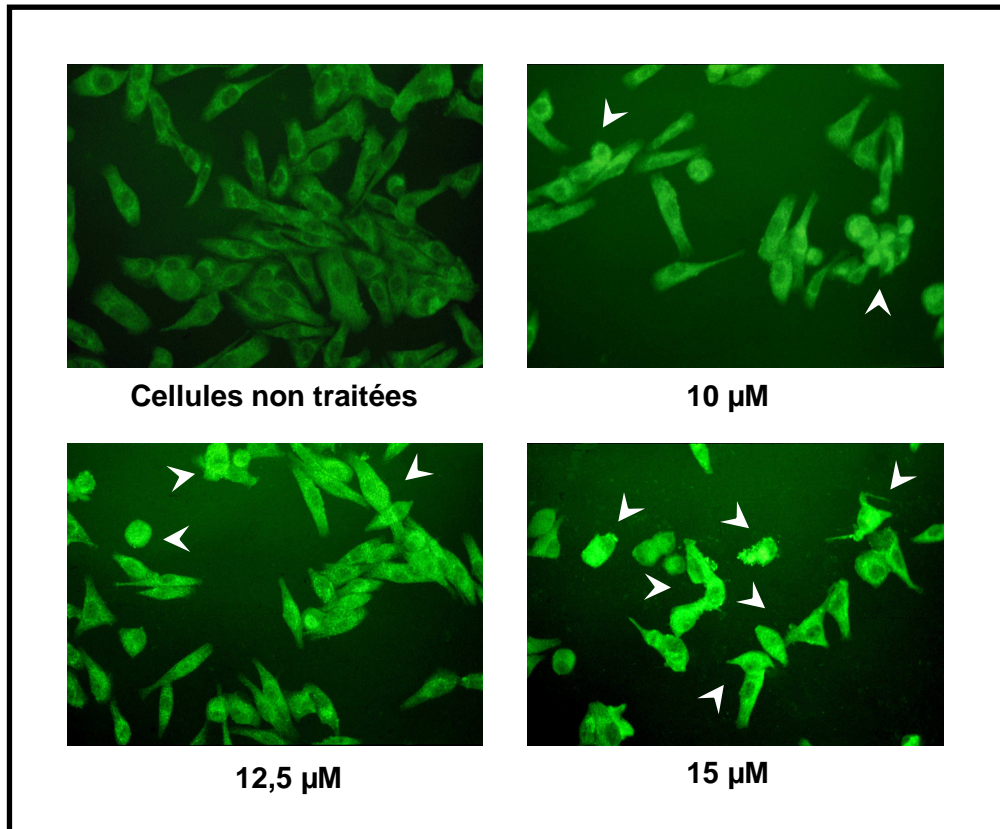
Les différentes photographies des figures 118 et 119 font apparaître une fluorescence verte intense au niveau du cytoplasme des cellules M4Beu de manière dose-dépendante après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.



**Figure 118 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine AIF des cellules M4Beu après 24 heures de traitement avec de l'acide ursolique.

Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations.

Grossissement x 200. (n=3).



**Figure 119 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine AIF des cellules M4Beu après 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique. Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations. Grossissement x 200. (n=3).

L'intensité de fluorescence augmente en fonction de la concentration d'acide ursolique, ce qui semble indiquer une libération dose-dépendante de l'AIF.

Ces résultats confirment ceux obtenus par la technique Western Blot :

- augmentation (modérée) de l'expression de la protéine AIF, en fonction de la concentration d'acide ursolique.

L'étude de molécules apoptogènes cytochrome c et AIF par immunofluorescence indirecte fait apparaître que l'acide ursolique induit l'augmentation de l'expression protéique de ces molécules apoptogènes à partir de la mitochondrie des cellules M4Beu traitées, et semble suggérer une libération de l'AIF et du cytochrome c par la mitochondrie.

## **VII. Protéines Bax et de Bcl-2 : études des expressions des ARNm et des protéines**

Les protéines Bax (pro-apoptotique) et Bcl-2 (anti-apoptotique) régulent notamment l'ouverture des pores de la mitochondrie permettant ainsi le relargage des molécules apoptogènes.

Pour étudier l'implication des protéines Bax et Bcl-2 dans le processus apoptotique induit par l'acide ursolique sur les cellules M4Beu, nous avons étudié l'expression de leur ARNm par la technique RT-PCR.

Nous avons également étudié l'expression de ces protéines par Western Blot et par marquage immunofluorescent indirect.

Pour compléter cette étude, nous avons analysé, pour chaque période de traitement et pour chaque concentration d'acide ursolique, les ratios Bax / Bcl-2. Ces ratios résultant de l'étude des protéines en Western Blot, permettent de définir une tendance pro- ou anti-apoptotique de l'acide ursolique sur les cellules M4Beu.

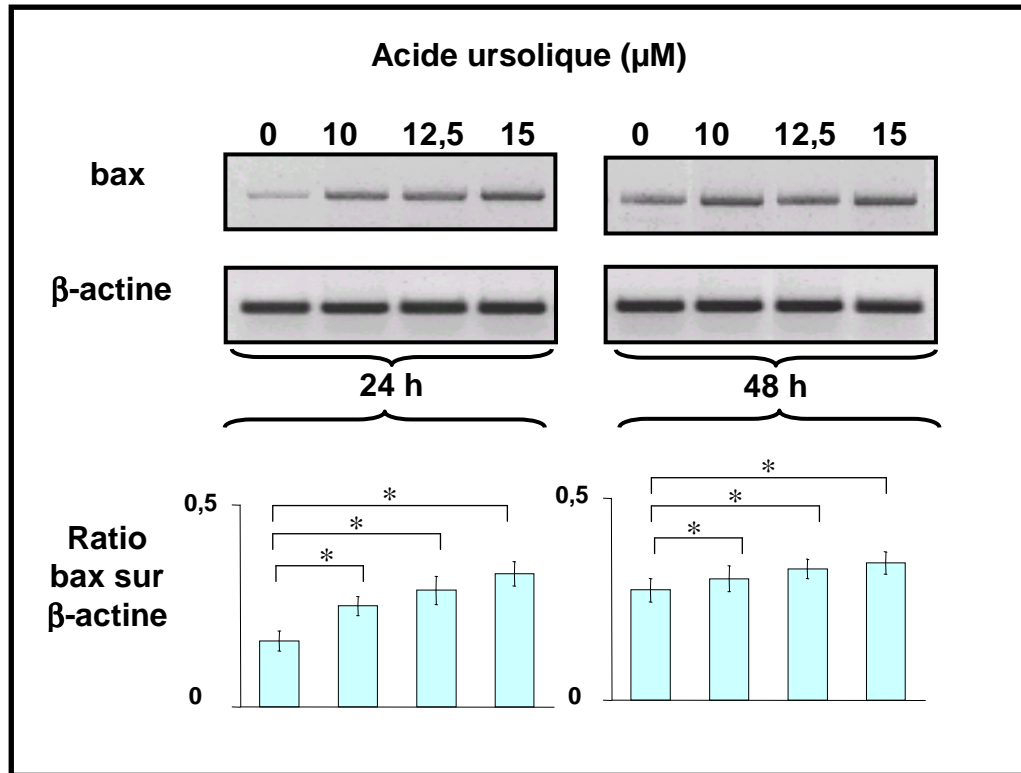
### **VII.1. Etude de Bax**

#### **VII.1.1. Expression de l'ARNm de bax**

Les résultats présentés sur la figure 120 font apparaître une augmentation dose-dépendante de l'expression de l'ARNm de bax quand les cellules sont traitées avec de l'acide ursolique. Cette augmentation est beaucoup plus importante après 24 heures d'incubation qu'après 48 heures.

Après 24 heures de traitement, le ratio de l'expression de l'ARNm de bax sur celle de la  $\beta$ -actine est de 0,16 pour les cellules non traitées et de 0,33 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 2,06.

Après 48 heures de traitement, le ratio est de 0,27 pour les cellules non traitées et de 0,34 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,26.



**Figure 120 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de bax des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

Technique RT-PCR (n=3). (\* P<0,05).

L'acide ursolique induit une augmentation sur l'expression de l'ARNm de bax des cellules M4Beu de manière dose-dépendante après 24 et 48 heures de traitement.

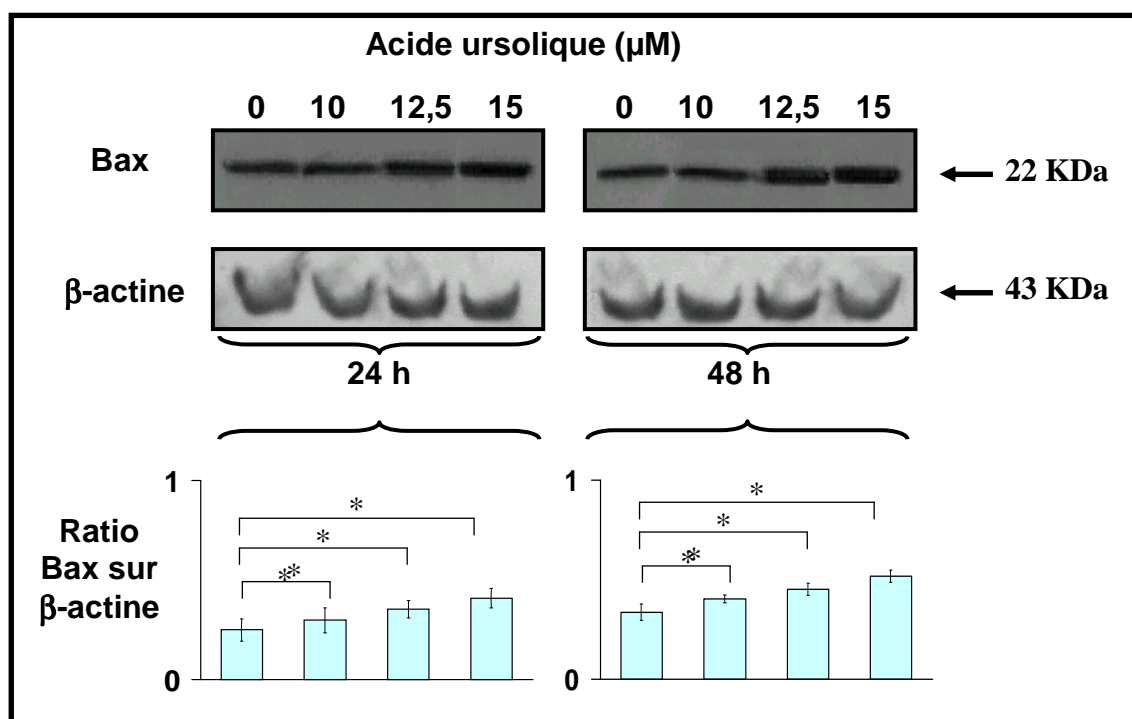
## VII.1.2. Expression de la protéine Bax

### VII.1.2.1. Expression de la protéine Bax par la technique Western Blot

L'acide ursolique induit de manière dose-dépendante une augmentation de l'expression de la protéine Bax dans les cellules M4Beu (Figure 121).

Après 24 heures de traitement, le ratio Bax /  $\beta$ -actine est de 0,25 pour les cellules non traitées et de 0,41 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,64.

Après 48 heures de traitement, le ratio Bax /  $\beta$ -actine est de 0,38 pour les cellules non traitées et de 0,52 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,37.



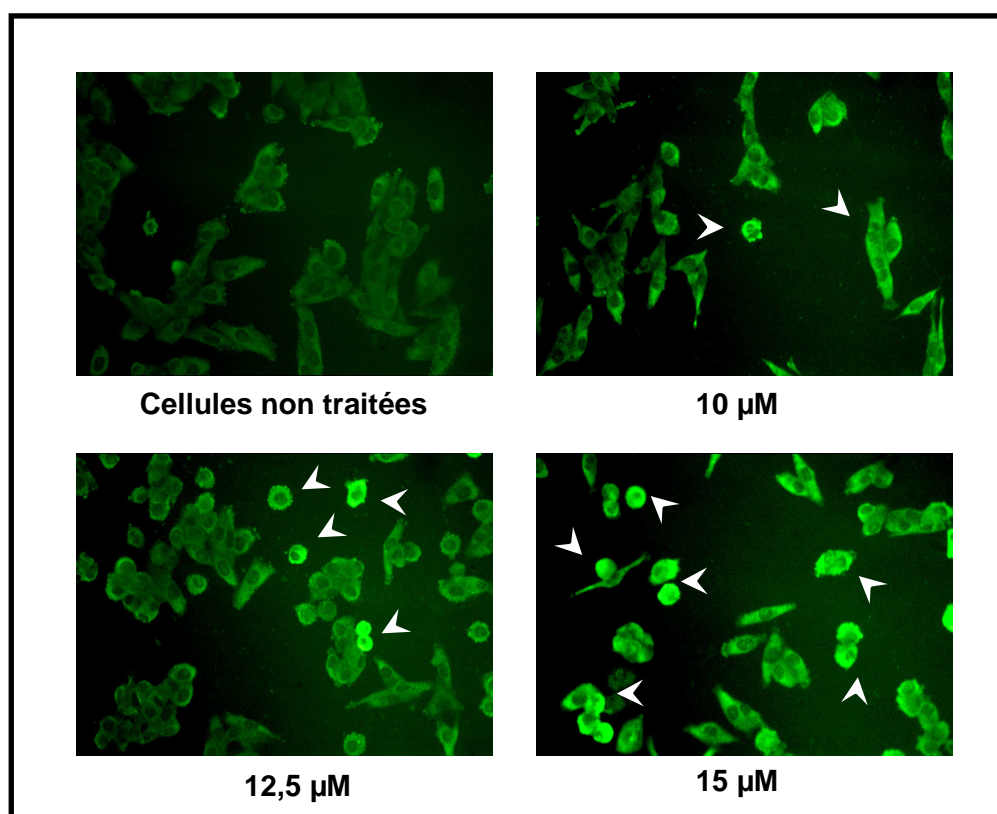
**Figure 121 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine Bax des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

Technique Western Blot (n=3). (\* P<0,05).

### VII.1.2.2. Expression de la protéine Bax par immunofluorescence

#### indirecte

Après 24 et 48 heures d'incubation, seules les cellules traitées présentent distinctement, au niveau du cytoplasme, une fluorescence verte, et ce pour les deux périodes. L'intensité de la fluorescence augmente en fonction de la concentration de l'acide ursolique, ce qui indique que la protéine Bax est exprimée par la biomolécule. Seuls les résultats obtenus après 24 heures de traitement sont présentés sur la figure 122.



**Figure 122 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine Bax des cellules M4Beu après 24 heures de traitement avec de l'acide ursolique.

Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations.

Grossissement x 200. (n=3).

Les résultats obtenus avec les différentes techniques utilisées au cours de cette étude convergent pour indiquer que l'acide ursolique induit une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax sur les cellules M4Beu.



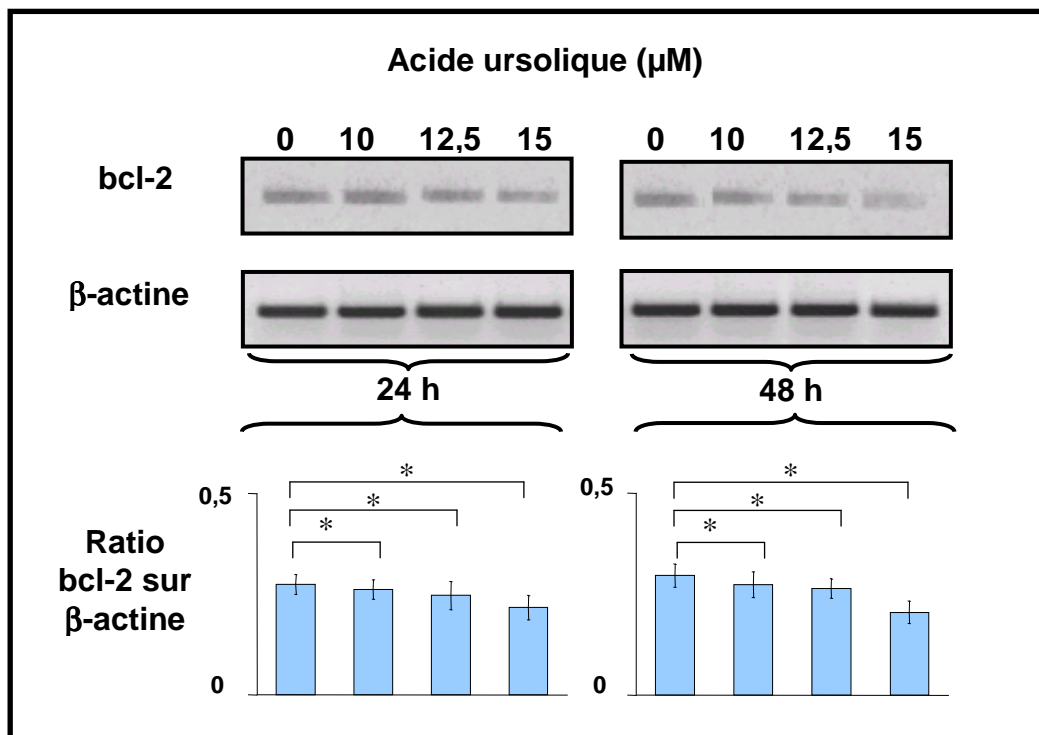
## VII.2. Etude de Bcl-2

### VII.2.1. Expression de l'ARNm de bcl-2

L'acide ursolique réprime de manière dose et temps dépendants l'expression de l'ARNm de bcl-2 des cellules M4Beu (Figure 123).

Après 24 heures de traitement, le ratio ARNm de bcl-2 /  $\beta$ -actine est de 0,27 pour les cellules non traitées et de 0,22 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une diminution d'un facteur de 1,23.

Après 48 heures de traitement, le ratio ARNm de bcl-2 /  $\beta$ -actine est de 0,30 pour les cellules non traitées et de 0,21 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une diminution d'un facteur de 1,43.



**Figure 123 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de bcl-2 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

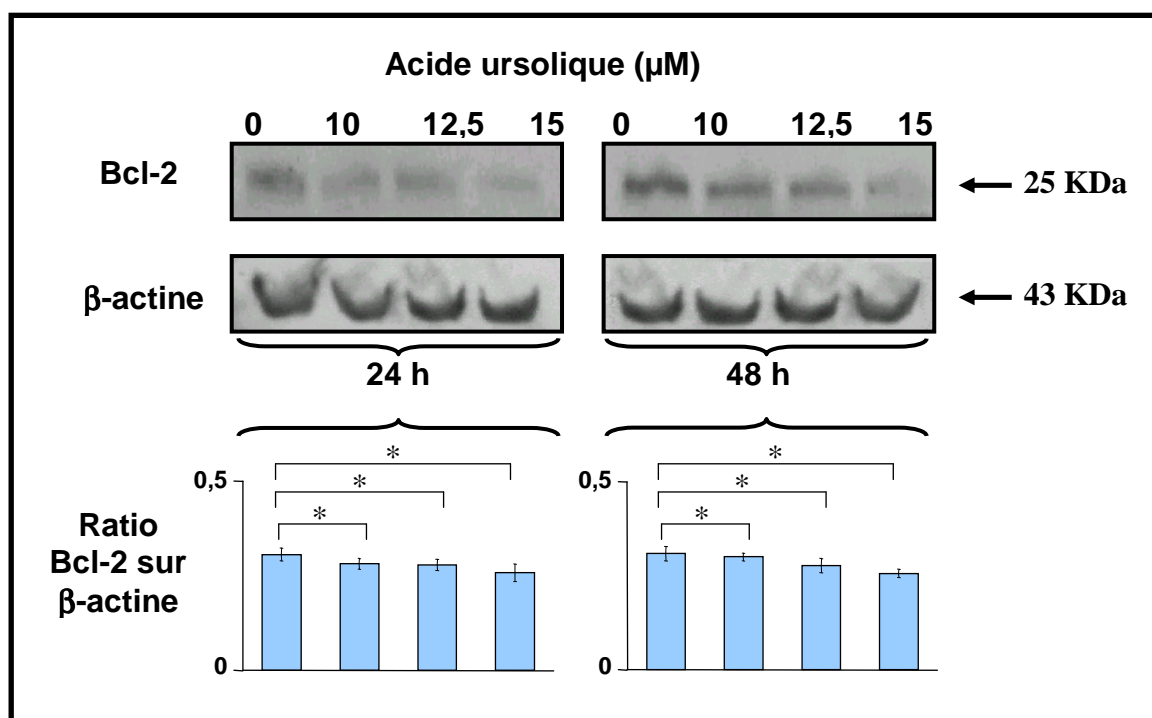
Technique de RT-PCR (n=3).

## VII.2.2. Expression de la protéine Bcl-2

### VII.2.2.1. Expression de la protéine Bcl-2 par la technique Western Blot

L'acide ursolique réprime l'expression de la protéine Bcl-2 d'une manière dose-dépendante (Figure 124).

Après 24 ou 48 heures de traitement avec 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, l'expression de la protéine Bcl-2 est diminuée d'un facteur de 1,2 par rapport à l'expression de la protéine dans les cellules témoins.



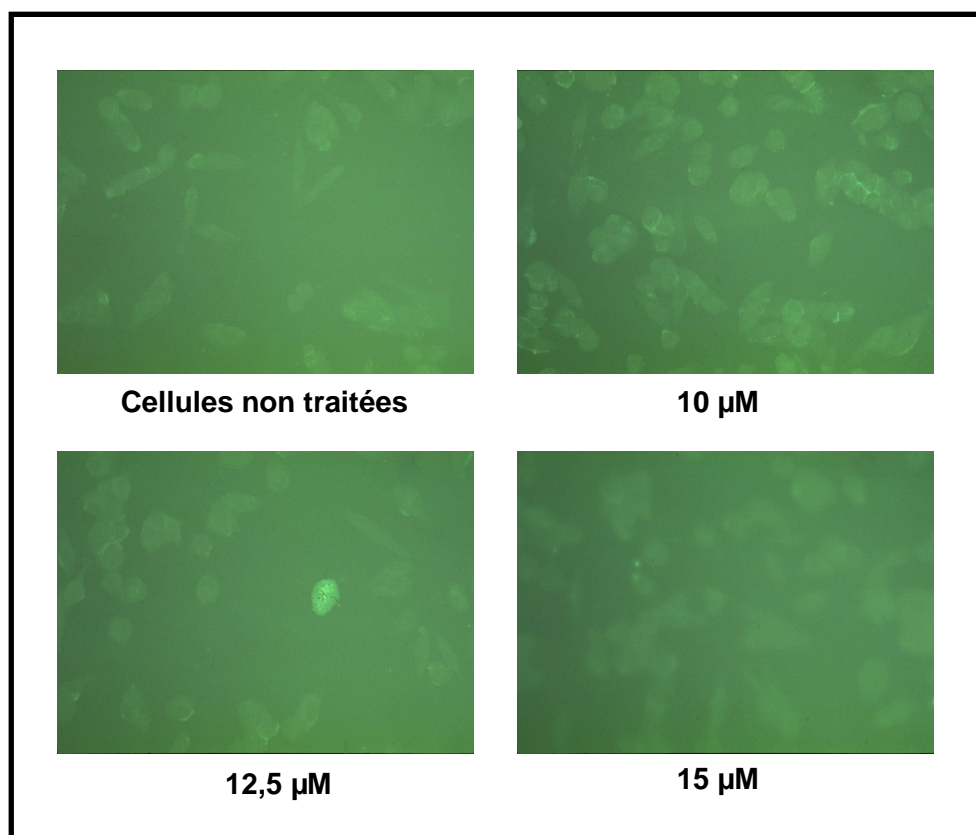
**Figure. 124 :** Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine Bcl-2 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.

Technique Western Blot (n=3). (\* P<0,05).

### VII.2.2.2. Expression de la protéine Bcl-2 par immunofluorescence

#### indirecte

Que ce soit après 24 ou 48 heures d'incubation, les résultats obtenus par marquage immunofluorescent indirect ne font apparaître aucune différence significative dans l'intensité de fluorescence entre les cellules témoins et les cellules traitées avec de l'acide ursolique. Ainsi, nous présenterons que les résultats obtenus à 24 heures de traitements. La fluorescence verte diffuse, mise en évidence, représente le niveau basal de la protéine dans les cellules (Figure 125).



**Figure 125 :** Immunofluorescence indirecte de la protéine Bcl-2 des cellules M4Beu après 24 heures de traitement avec de l'acide ursolique. Photographies représentatives de l'une des trois expérimentations. Grossissement x 200. (n=3).

Lors de cette étude, les résultats obtenus avec les techniques de RT-PCR, de Western Blot et d'immunofluorescence indirecte montrent que la molécule n'induit pas de variation de l'expression de Bcl-2 dans les cellules M4Beu.

### VII.3. Etude du ratio Bax / Bcl-2

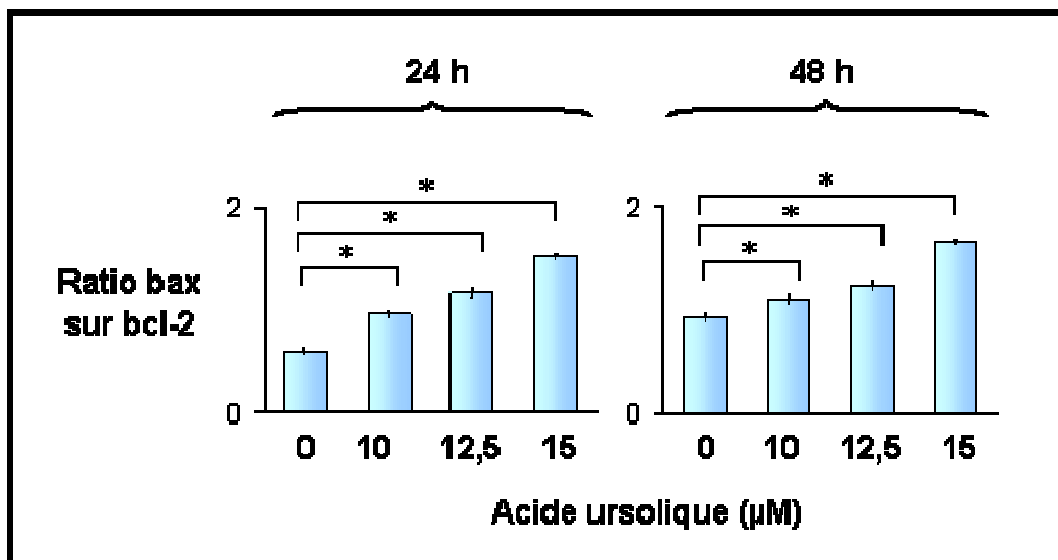
Les résultats obtenus précédemment nous ont montré que l'acide ursolique induisait sur les cellules M4Beu une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et aucune variation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Il est généralement admis que la tendance pro- ou anti-apoptotique d'un effecteur se définit par le rapport entre l'expression de la protéine Bax et l'expression de la protéine Bcl-2.

#### VII.3.1. Etude du ratio de l'expression de l'ARNm de Bax sur l'expression de l'ARNm de Bcl-2

Nous observons une augmentation significative dans l'expression du ratio de l'ARNm de Bax sur l'ARNm de Bcl-2 des cellules M4Beu traitées à différentes concentrations d'acide ursolique par rapport au témoin à 24 h et à 48 heures de traitement (Figure 126).

A 24 heures de traitement, le ratio croît de manière dose-dépendante : 0,60 pour le témoin et de 1,52 pour 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique (soit une augmentation d'un facteur de 2,53).

A 48 heures, le ratio augmente de 0,92 pour le témoin et de 1,66 pour 15  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique (soit une augmentation d'un facteur de 1,80).



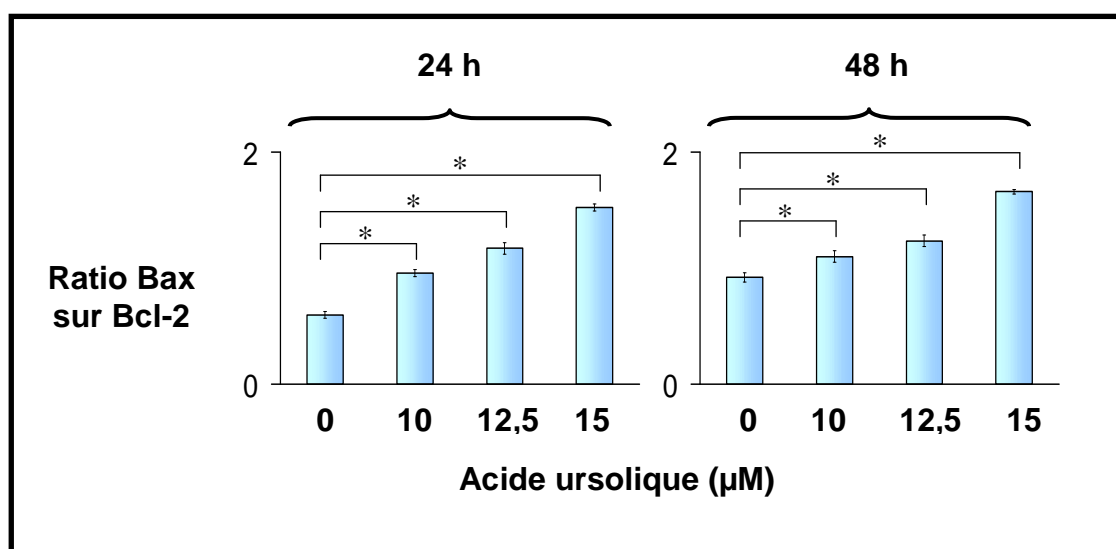
**Figure 126 :** Etude du ratio de l'expression de l'ARNm de Bax sur celle de l'ARNm de Bcl-2 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.

### VII.3.2 Etude du ratio de l'expression protéique de Bax / l'expression protéique de Bcl-2

L'acide ursolique induit d'une manière dose et temps dépendants une tendance pro-apoptotique très prononcée sur les cellules M4Beu (Figure 127).

Après 24 heures de traitement, le ratio Bax / Bcl-2 est de 0,89 pour les cellules non traitées et de 1,59 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,94.

Après 48 heures de traitement, le ratio Bax / Bcl-2 est de 1,09 pour les cellules non traitées et de 2,05 pour les cellules traitées avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique, soit une augmentation d'un facteur de 1,84.



**Figure 127 :** Ratio de l'expression de Bax sur celle de Bcl-2 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique.

Technique Western Blot (n=3). (\* P<0,05).

Les résultats des techniques RT-PCR et Western Blot montrent que l'acide ursolique induit une augmentation dose-dépendante du ratio de Bax sur Bcl-2 des cellules M4Beu à 24 et 48 heures de traitement.

Pour résumer nos principaux résultats obtenus sur les cellules M4Beu, nous avons montré que l'acide ursolique induit un effet anti-prolifératif sur les cellules traitées avec une  $IC_{50}$  de 18  $\mu$ M et 12,5  $\mu$ M, respectivement à 24 et 48 heures de traitement. Nous n'avons pas observé de blocage du cycle cellulaire. En revanche, la présence d'une population sub-G1 indique que l'acide ursolique induit un processus pro-apoptotique. Nous avons observé une translocation de p53 phosphorylé dans le noyau et déterminé une augmentation de l'activation des caspases-3 et -9. La chute du potentiel transmembranaire mitochondrial est très importante et le ratio Bax/Bcl-2 obtenu après traitement est en faveur d'un processus pro-apoptotique, impliquant la mitochondrie comme voie du signal apoptotique. Nous avons également observé un relargage des molécules apoptogènes AIF et cytochrome c.

# **DISCUSSION**

Nous nous sommes intéressés à l'action de l'acide ursolique sur deux lignées cellulaires de la peau humaine *in vitro*, la lignée HaCaT non-cancéreuse et la lignée M4Beu cancéreuse. La lignée cellulaire HaCaT est constituée de cellules immortalisées dérivées de kératinocytes (Fusenig & Boukamp, 1998 ; Boukamp *et al.*, 1994 ; Boukamp *et al.*, 1995). La lignée cellulaire M4Beu est une lignée cancéreuse obtenue à partir d'une métastase ganglionnaire d'un mélanome humain. Cette lignée est hétérogène, c'est-à-dire qu'elle est constituée de cellules pauvrement tumorigènes mais hautement métastatiques *in vitro* et hautement tumorigènes mais pauvrement métastatiques *in vivo* (Dore *et al.*, 1987).

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'acide ursolique sur la croissance cellulaire de ces deux lignées. Pour cela, deux techniques ont été employées, la technique du MTT et la méthode d'exclusion du bleu trypan.

La technique du MTT est couramment utilisée pour effectuer des tests de prolifération. Les résultats obtenus pour les deux lignées dans les conditions testées ne démontrent pas d'effet anti-prolifératif et ne permettent pas de déterminer une IC<sub>50</sub>. Ces résultats ne corroborent pas l'examen visuel. Ainsi, nous pouvons en conclure que pour les deux lignées traitées avec l'acide ursolique, la technique du MTT ne semble pas adaptée pour étudier l'effet anti-prolifératif de l'acide ursolique.

La deuxième technique utilisée est la méthode d'exclusion du bleu trypan. Les résultats obtenus sur les deux lignées traitées avec l'acide ursolique ont permis d'observer l'effet anti-prolifératif dose et temps dépendants de cette molécule, et ainsi de déterminer un IC<sub>50</sub> de 18 µM à 24 heures de traitement, et une IC<sub>50</sub> de 12,5 µM à 48 heures de traitement pour les deux lignées. Nous pouvons donc en déduire un effet anti-prolifératif de l'acide ursolique sur les deux lignées cellulaires étudiées.

La technique du MTT ne convient pas à notre étude pour déterminer un effet anti-prolifératif, car elle minimise cet effet. Le test du MTT est réalisé selon la méthode décrite par Mosmann, en 1983. Ce test donne une indication sur l'état du bon fonctionnement mitochondrial. Le principe du test du MTT consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT (ou Bromure de 3(4.5-diméthylthiazol-2-yl)-2.5-diphényltétrazolium), de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus. Nos résultats montrent que l'activité déshydrogénase n'est pas proportionnelle au nombre de cellules vivantes. D'autres auteurs ont montré sur des lignées cellulaires telles que les cellules mammaires MCF-7 (Es-saady *et al.*, 1996b) et les cellules U87 issues de glioblastome humain multiforme (Lee *et al.*, 2001), que la



technique du MTT ne permet pas toujours de déterminer le nombre réel de cellules viables. En 1993, Pagliacci et coll. ont démontré par comptage direct du nombre de cellules au bleu trypan que la génistéine arrête la croissance cellulaire de plusieurs lignées malignes (MCF-7, Jurkat et L-929). En revanche, par la technique du MTT, ces mêmes auteurs ont observé dans ces trois types cellulaires une stimulation de la production de formazan qui masque complètement l'action inhibitrice de la génistéine et donc l'effet anti-prolifératif de cette molécule est sous-estimé. Nous constatons sur nos deux lignées que l'acide ursolique minimise l'effet anti-prolifératif à l'identique de la génistéine sur les cellules MCF-7 grâce à la technique du MTT. Comme la génistéine et l'acide ursolique sont deux inhibiteurs potentiels de la tyrosine kinase et de la topoisomérase II (Pagliacci *et al.*, 1993 ; Hollosy *et al.*, 2000 ; Mizushima *et al.*, 2000), nous pouvons spéculer que les différences observées entre les résultats obtenus avec le bleu trypan et ceux obtenus avec le MTT pourraient être la conséquence d'un effet inhibiteur potentiel de l'acide ursolique sur la tyrosine kinase et/ou sur la topoisomérase II, sans pour autant expliquer le lien entre ces enzymes et les déshydrogénases mitochondriales.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué l'analyse du cycle cellulaire et l'étude de l'expression des ARNm et des protéines p21 et p53, protéines régulant le cycle cellulaire.

Pour élucider les mécanismes d'inhibition de la prolifération cellulaire provoqués par l'acide ursolique dans les lignées cellulaires HaCaT et M4Beu, nous avons analysé par cytométrie en flux, la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Dans notre étude, nous observons, pour les cellules HaCaT traitées, une progressive accumulation des cellules en phase G1, alors que le nombre de cellules décroît en phase G2. Pour la lignée M4Beu, l'acide ursolique n'induit pas d'arrêt du cycle cellulaire.

Nos résultats sont en accord avec de précédents travaux réalisés dans notre laboratoire, démontrant que l'acide ursolique induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 sur des cellules cancéreuses mammaires humaines MCF-7 et sur des cellules de mélanomes de souris B16 (Es-Saady *et al.*, 1996a ; Es-Saady *et al.*, 1996b).

Ces premiers résultats démontrent que l'acide ursolique agit différemment sur les deux lignées cellulaires étudiées. Nous pouvons suggérer que l'arrêt du cycle cellulaire, observé dans le cas des cellules HaCaT, permettrait à la cellule de réparer certains dommages de l'ADN. En revanche, dans le cas des cellules M4Beu, l'action de l'acide ursolique n'entraîne pas d'arrêt du cycle cellulaire, soit parce que les dommages dans l'ADN sont minimes, soit parce que l'acide ursolique ne modifie pas l'intégrité du génome, soit parce que les

dommages sont trop conséquent. Ainsi, pour les cellules HaCaT, l'effet anti-prolifératif de l'acide ursolique s'explique partiellement par un blocage en phase G1 ; sur les cellules M4Beu, l'effet anti-prolifératif de l'acide ursolique s'expliquerait par un autre mécanisme.

L'analyse du cycle cellulaire met aussi en évidence la présence d'une population sub-G1 dans les deux lignées cellulaires traitées. Ce pic correspond à des cellules dont le contenu en ADN est diminué par perte de fragments d'ADN clivés au cours de l'apoptose (Leers *et al.*, 1999; Szmit *et al.*, 2002). Nous supposons d'après le pic sub-G1 étroit que la population cellulaire traitée a perdu le même contenu en ADN, donc ces cellules ont toutes des fragments de tailles égales. Il est très rare d'observer une régularité des courbes représentant le pic sub-G1 ; cette régularité exprime une fragmentation très nette et très précise de l'ADN, ce qui n'a jamais été mis en évidence au cours des précédentes études sur les lignées cellulaires cancéreuses traitées avec l'acide ursolique.

Pour les cellules HaCaT, l'apparition d'un pic sub-G1 à 20  $\mu$ M d'acide ursolique après 24 et 48 heures de traitement montre que cette molécule induit une augmentation significative du nombre de cellules dans la phase sub-G1. Pour les cellules M4Beu, l'apparition d'un pic sub-G1 observée est importante à 20  $\mu$ M d'acide ursolique dès 24 heures. L'apparition d'un pic sub-G1 à 48 heures est observée quelles que soient les concentrations d'acide ursolique testées. Les cellules M4Beu seraient plus sensibles à l'effet pro-apoptotique de l'acide ursolique que les cellules HaCaT.

La présence d'un pic sub-G1 dans les cellules traitées indique que l'acide ursolique induit un processus apoptotique. L'effet anti-prolifératif de l'acide ursolique s'expliquerait par un blocage du cycle en phase G1 avec induction du processus apoptotique dans les cellules HaCaT. Pour les cellules M4Beu, cet effet anti-prolifératif serait dû uniquement à une induction du processus apoptotique.

Il est établi que la protéine suppresseur de tumeur p53 inhibe la croissance cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose (Levine, 1997). Dans les cellules épithéliales de la prostate humaine (Choi *et al.*, 2000), l'acide ursolique induit l'expression de la protéine p53. Cette dernière active la transcription et la synthèse de la protéine p21, un inhibiteur du cycle cellulaire (El-Deiry *et al.*, 1993 ; Kim, 1997). La protéine p21 appartient à la famille Cip/Kip qui contrôle le point de transition G1/S dans le cycle cellulaire, en inhibant l'activité des complexes cycline D/CDK (Levine, 1997). C'est une des cibles transcriptionnelles majeures de p53 et un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire (Waldman *et al.*, 1995).

Dans les cellules HaCaT traitées par l'acide ursolique, nous avons montré, par différentes techniques de biologie moléculaire, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de p21, et de la protéine p21. En revanche, nous n'avons observé aucune variation de l'expression de l'ARNm de p53, ni celle de la protéine p53. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Kim et coll. en 1997, qui ont montré que, sur les cellules REF (Rat Embryo Fibroblast cells) traitées par l'acide ursolique, l'expression de la protéine p21 croît alors que celle de la protéine p53 ne varie pas. DE même avec une autre molécule, Pellizzaro et coll., en 2001, ont montré que le butyrate de sodium bloque la croissance cellulaire des cellules cancéreuses de poumons avec une faible augmentation de l'expression de p21 alors que l'expression protéique de p53 ne varie pas.

A l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine p53 phosphorylée sur la sérine 392, nous avons observé par immunocytochimie une fluorescence intense au niveau du noyau des cellules HaCaT traitées par l'acide ursolique. Nous constatons aussi que l'intensité de fluorescence du marquage augmente au niveau du noyau avec des concentrations d'acide ursolique croissantes, suggérant l'activation de la protéine p53 par phosphorylation sur la sérine 392, et la translocation de p53 dans le noyau. En 1997, Sakaguchi et coll. et Shieh et coll., ont démontré que la phosphorylation sur la sérine 392 stabilise le tétramère p53, c'est-à-dire la forme active de cette protéine. La protéine p53 peut alors fonctionner comme un facteur de transcription dans le noyau où elle active l'expression de nombreux gènes (Jaiswal & Narayan, 2001). En 1995, Katayose et coll. ont montré sur des cellules AoVSMC (Aortic Vascular Smooth Muscle Cells) que l'expression de p21 provoque un arrêt du cycle cellulaire en G1, alors que l'expression de p53 induit à la fois l'arrêt du cycle et l'accumulation de cellules apoptotiques en phase sub-G1. Dans les cellules HaCaT traitées, nous supposons que l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 est régulé par l'expression de la protéine p21, cible transcriptionnelle de p53, et que l'apparition du pic sub-G1 serait due à l'activation de p53 car p53 est active dans le noyau.

Dans la lignée cellulaire M4Beu traitées par l'acide ursolique, nous n'observons pas d'arrêt du cycle cellulaire, ni de variation de l'expression des ARNm de p21, ni de variation de l'expression de la protéine p21. Toutefois, l'apparition d'un pic sub-G1 s'observe dès 24 heures pour la plus forte concentration d'acide ursolique, et à 48 heures pour toutes les concentrations d'acide ursolique testées. A 24 et 48 heures de traitement, nous avons de plus montré que l'acide ursolique induit une augmentation significative de l'expression des ARNm de p53 et de l'expression de la protéine p53. Comme pour les cellules HaCaT, l'observation de la présence de p53 phosphorylée sur la sérine 392 dans le noyau des cellules M4Beu

traitées, suggère que p53 est activée. Autant pour les cellules HaCaT et que pour les cellules M4Beu, cette observation pourrait expliquer la forte accumulation de cellules apoptotiques en phase sub-G1 à 24 et 48 heures de traitement aux fortes concentrations d'acide ursolique.

L'analyse du cycle cellulaire ainsi que l'étude de l'expression des protéines p53 et p21 montrent des différences entre les cellules HaCaT et M4Beu traitées par l'acide ursolique. Nous pensons que l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules HaCaT traitées permettrait aux cellules de réparer leur ADN endommagé. Cet arrêt pourrait être dû à une augmentation de l'expression de p21. En revanche, cet arrêt n'est pas observé pour les cellules M4Beu, et l'apparition du pic sub-G1 est plus important que pour les cellules HaCaT. L'augmentation de l'expression de p53 induirait une accumulation en phase sub-G1 des cellules HaCaT et M4Beu traitées.

L'acide ursolique semble donc avoir un effet pro-apoptotique sur les deux lignées cellulaires, mais avec un effet plus marqué et plus précoce pour les cellules M4Beu.

Dans un troisième temps, nous avons analysé les voies apoptotiques activées par l'acide ursolique dans chacune des deux lignées. Existe-t-il une voie propre à chaque lignée ou l'acide ursolique a-t-il un effet unique quelle que soit la lignée cellulaire ?

Nous nous sommes intéressés tout particulièrement aux voies apoptotiques dépendantes des caspases, protéases spécifiques de l'apoptose, caractérisées par la voie de transduction extrinsèque qui fait intervenir la caspase-8 et la voie de transduction intrinsèque qui fait intervenir la caspase-9 (Hentgartner, 2000) : ces deux voies convergent en aval, vers l'activation commune de la caspase exécutive majeure spécifique de l'apoptose, la caspase-3 (Green & Kroemer, 1998). La voie inflammatoire impliquant la caspase-1 (Amarande-Mendes & Green, 1999 ; Earnshaw *et al.*, 1999), qui peut aussi dans certaines conditions activer la caspase-3 par clivage et ainsi induire l'apoptose (Gupta *et al.*, 2002), a également été analysée. Nous avons étudié l'expression des ARNm des caspases-1,-3,-8 et -9 par RT-PCR, puis l'activité enzymatique de chaque caspase en utilisant des couples substrat / inhibiteur spécifiques de chacune d'entre elles (Duval *et al.*, 2002).

Dans les cellules HaCaT, l'expression des ARNm de la caspase-3 augmente aussi bien à 24 heures qu'à 48 heures de traitements pour toutes les concentrations d'acide ursolique. Nous montrons que l'acide ursolique n'induit pas de variation de l'activité caspase-3 après 24 heures de traitement ; mais à 48 heures, cette activité augmente fortement surtout avec 15  $\mu$ M d'acide ursolique.

En revanche, dans les cellules M4Beu, l'expression des ARNm de la caspase-3 augmente significativement quelles que soient les concentrations d'acide ursolique à 24 heures, alors qu'elle diminue pour les plus fortes concentrations d'acide ursolique à 48 heures de traitement. Nous avons aussi observé que l'expression des ARNm de p53 dans les mêmes conditions de temps et de concentrations diminue ; ceci peut suggérer un état apoptotique avancé de la cellule. Nous supposons que ces cellules n'expriment plus ni p53, ni caspase-3, ce qui n'empêche pas l'activité de caspase-3. Cette activité de la caspase-3 augmente par rapport aux cellules non traitées à 24 heures comme à 48 heures de traitement ; et ceci quelles que soient les concentrations d'acide ursolique.

Dans les cellules HaCaT, l'augmentation de l'activité de la caspase-3 est plus importante mais tardive que celle observée dans les cellules M4Beu traitées ; alors que, dans les cellules M4Beu, elle augmente précocement mais reste constante. Cette augmentation d'activité s'observe au même moment que l'accumulation des cellules en phase sub-G1. En accord avec Hengartner (2000), nos résultats montrent que la caspase-3 est activée avant l'apparition des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose. L'activation de la caspase-3 est un phénomène irréversible du processus apoptotique. L'acide ursolique engendre un effet pro-apoptotique sur les deux lignées. De nouveau, nous constatons que le processus apoptotique est plus important dans les cellules cancéreuses M4Beu que dans les cellules HaCaT dérivées de kératinocytes.

Nous avons analysé l'activité de la caspase-1, qui est impliquée dans des événements inflammatoires conduisant à la nécrose cellulaire (Earnshaw *et al.*, 1999). Dans certains cas, elle peut activer par clivage la caspase-3 pour induire l'apoptose (Gupta *et al.*, 2002).

Pour les cellules HaCaT, nous constatons aucune variation de l'expression des ARNm de la caspase-1 à 24 heures comme à 48 heures de traitement. L'acide ursolique n'induit pas l'activité de la caspase-1, hormis une légère augmentation à 15  $\mu$ M après 48 heures de traitement. Ceci pourrait s'expliquer peut-être par un effet feed-back de la caspase-3 sur la caspase-1 pour accélérer le processus apoptotique.

Dans les cellules M4Beu, l'expression des ARNm de la caspase-1 diminue fortement à 48 heures, soutenant l'hypothèse d'un état d'apoptose avancée que nous avons déjà évoqué avec les profils d'expression des ARNm de p53 et de caspase-3. En revanche, l'activité de la caspase-1 ne varie pas après les deux temps de traitement étudiés et quelles que soient les concentrations.

Nous supposons qu'il n'y a aucun phénomène inflammatoire dans notre système car l'acide ursolique n'induit pas d'activations de la caspase-1 dans les deux lignées. La caspase-3 n'est

donc ni clivée, ni activée par la caspase-1. Cette dernière n'est donc pas impliquée dans l'apoptose médiée par l'acide ursolique.

La présence de pics sub-G1 dans les cellules traitées après analyse par CMF, la translocation dans le noyau de la protéine p53 et l'activation de la caspase-3 confirment l'effet pro-apoptotique de l'acide ursolique sur les cellules HaCaT et M4Beu, en culture. L'acide ursolique possède un effet anti-prolifératif mais aussi un effet pro-apoptotique sur ces cellules ; le premier effet est la conséquence du deuxième.

Le processus apoptotique se caractérise par une cascade d'évènements biochimiques et moléculaires. Ces mécanismes constituent des programmes apoptotiques performants, présents dans la plupart des types cellulaires : ils peuvent être initiés par une variété de signaux intra- ou extra-cellulaires. L'activation de la voie de transduction du signal pro-apoptotique dépend du type cellulaire et d'éléments sub-cellulaires spécifiques de chaque stress. Les récepteurs membranaires activent la voie extrinsèque ou voie des récepteurs (Salvesen & Dixit, 1997; Salvesen & Dixit, 1999) et les mitochondries sont au centre de l'activation de la voie intrinsèque (Amarande-Mendes & Green, 1999 ; Gupta, 2003). Mais quelles que soient les voies de transduction en amont, celles-ci convergent toujours vers une voie finale effectrice commune (Thompson, 1995), impliquant la caspase-3. La caspase-8 est activée après liaison d'un ligand à son récepteur spécifique. Elle est la caspase principale de la voie extrinsèque. La caspase-9 est aussi une caspase initiatrice impliquée dans la voie intrinsèque ou mitochondriale. Les caspases-8 et -9 sont des caspases initiatrices, c'est-à-dire qu'elles activent en aval la caspase-3 (Hengartner, 2000). Afin de déterminer quelles sont les voies de transduction qui activent la caspase-3, nous avons analysé l'expression de l'ARNm et les activités des caspase-8 et -9 dans les cellules HaCaT et M4Beu traitées.

Dans les cellules HaCaT, nous constatons que l'expression des ARNm de la caspase-8 ne varie pas à 24 et 48 heures. De même, l'analyse de son activité à l'aide du couple substrat / inhibiteur spécifique montre qu'elle est très peu active dans les cellules HaCaT traitées, par rapport aux cellules témoins. Une très faible augmentation d'activité est observée dans ces cellules après 48 heures de traitement avec la plus forte concentration d'acide ursolique. Cette activité tardive pourrait être due à un feed-back positif de la caspase-3 sur la caspase-8, afin d'accélérer le processus apoptotique.

Dans les cellules M4Beu, nous constatons que l'expression des ARNm de la caspase-8 ne varie pas, ni à 24, ni à 48 heures de traitement. De même, l'analyse de l'activité de la caspase-8, à l'aide du couple substrat / inhibiteur spécifique montre qu'elle n'est pas active dans les cellules M4Beu.

Nous pouvons en déduire que la caspase-8 n'est pas impliquée dans l'activation de la caspase-3. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'acide ursolique ne semble pas induire l'apoptose sur ces deux lignées *via* la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.

Dans les cellules HaCaT, une augmentation de l'activité de la caspase-9 est observée uniquement pour les cellules traitées pendant 48 heures, alors que l'expression des ARNm ne varie pas. L'intensité de l'activité de la caspase-9 par rapport à celle de la caspase-8 est plus importante.

Dans les cellules HaCaT traitées, une implication préférentielle de la voie intrinsèque mitochondriale dans l'induction de l'apoptose est supposée. Dans les cellules M4Beu traitées, hormis à 24 heures, l'acide ursolique induit une augmentation significative de l'expression des ARNm de la caspase-9. En ce qui concerne l'activité de la caspase-9, elle augmente aussi bien à 24 qu'à 48 heures de traitement, à la plus forte concentration d'acide ursolique. Ces résultats suggèrent un effet pro-apoptotique de l'acide ursolique sur la mitochondrie, *via* l'induction de la voie intrinsèque mitochondriale.

Sur les deux lignées cellulaires HaCaT et M4Beu traitées avec l'acide ursolique, la voie de transduction du signal apoptotique impliquée serait la voie intrinsèque mitochondriale.

Nous avons donc, dans un quatrième temps, exploré l'implication de la mitochondrie dans l'apoptose induite par l'acide ursolique.

La mitochondrie joue un rôle central dans les mécanismes apoptotiques (Hengartner, 2000). La première perturbation cellulaire détectable au cours du processus apoptotique est une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial. Quand la mitochondrie subit certains stimuli d'agression, elle réagit par une chute du potentiel membranaire ; ce dernier s'accompagne du relargage de molécules confinées dans l'espace intermembranaire mitochondrial, comme APAF-1, la pro-caspase-9, mais aussi l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et le cytochrome c. Ces molécules sont relarguées par des pores mitochondriaux dont l'ouverture est régulée par les membres de la famille Bcl-2 (Gross *et al.*, 1999), dont les plus étudiés sont Bax, proto-oncogène pro-apoptotique, et Bcl-2, molécule anti-apoptotique (Borner, 2003). Bax et Bcl-2 régulent l'ouverture des pores modifiant la perméabilité membranaire mitochondriale (Ravagnan *et al.*, 2002). Bax serait responsable de l'ouverture des pores mitochondriaux entraînant la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial (Borner, 2003). Par contre, Bcl-2 assurerait le bon fonctionnement de la fermeture des pores et empêcherait le relargage du cytochrome c, favorisant la survie cellulaire. La protéine Bcl-2 permettrait la séquestration de la pro-caspase-9 et donc l'inactivation de la caspase-9, ce qui

pourrait inhiber l'activation des caspases (Susin *et al.*, 1996 ; Tsujimoto, 2003). Le cytochrome c est libéré de la mitochondrie pour se lier à APAF-1 dans le cytosol et permettre l'activation de la caspase-9. L'AIF, une fois libérée, migre dans le noyau de la cellule en apoptose où elle induit une fragmentation de l'ADN en fragment de hauts poids moléculaires (Susin *et al.*, 1999a ; Susin *et al.*, 1999b). Elle agirait par liaison directe avec l'ADN (Ye *et al.*, 2002). En revanche, l'ordre de relargage de ces deux molécules varie en fonction du stimulus et du type cellulaire (Candé *et al.*, 2002a ; Candé *et al.*, 2002b). La mitochondrie, délimitée par une double membrane, est le théâtre d'échanges d'ions, de protéines et de solutés. L'isolement relatif de la mitochondrie lui permet de maintenir, au niveau de sa membrane interne, un potentiel électrochimique élevé qui est nécessaire à ses fonctions métaboliques. Des modifications majeures de la perméabilité mitochondriale semblent déterminantes dans le déclenchement de la mort cellulaire programmée (Kroemer & Reed, 2000). En effet, au cours de l'apoptose, la mitochondrie subit des modifications de la perméabilité de ses deux membranes, ces modifications se produisent bien avant l'activation des caspases (Green & Kroemer, 1998). La dissipation du potentiel de la membrane interne mitochondriale est un événement précoce de l'apoptose (Vayssière *et al.*, 1994 ; Zamzami *et al.*, 1996).

Pour mettre en évidence cette chute, nous avons effectué, à l'aide du fluorochrome JC-1, une étude *in situ* de l'état du potentiel transmembranaire mitochondrial. Puis nous avons effectué un double marquage à l'aide de deux fluorochromes TOTO-3 et JC-1, suivi d'une analyse par CMF sur cellules en suspension (Zuliani *et al.*, 2003). Le marquage *in situ* a été réalisé afin de visualiser de manière qualitative la chute du potentiel transmembranaire. Après 24 et 48 heures d'incubation, les cellules témoins des deux lignées présentent toutes une fluorescence orange, ce qui indique que les cellules sont vivantes, non apoptotiques, et possèdent un haut potentiel mitochondrial. Pour les mêmes temps d'incubation, les cellules HaCaT et M4Beu traitées présentent une hétérogénéité intra-cellulaire entre les fluorescences orange et verte, ce qui traduit une évolution du potentiel mitochondrial dans une même cellule. Le nombre de cellules qui fluoresce dans le vert augmente très significativement en fonction de la concentration en acide ursolique et de la durée du traitement quelles que soient les cellules étudiées. L'acide ursolique induit une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial dans les cellules HaCaT et M4Beu.

Nous avons ensuite effectué une analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial par double marquage (TOTO-3 / JC-1) suivie d'une analyse par CMF. Contrairement à l'étude *in situ*, cette analyse est quantitative, elle s'effectue sur des cellules



mises en suspension. L'analyse par CMF des cellules de la lignée HaCaT présente un taux peu élevé de cellules à bas potentiel, quels que soient le temps de traitement et la concentration d'acide ursolique. Ces résultats ne confirment pas ceux observés lors du marquage *in situ*. Nous pouvons supposer que ces cellules réagissent différemment selon qu'elles sont adhérentes au support (marquage *in situ*) ou en suspension (marquage en CMF au TOTO-3). En revanche, l'analyse du potentiel mitochondrial dans les cellules M4Beu présente un taux de cellules à bas potentiel qui augmente significativement de manière dose et temps dépendants (de 7 à 80% à 24 h et de 7 à 14% à 48 h). A 48 heures pour les plus fortes concentrations, la chute du potentiel est moins importante, car les cellules en apoptose ne sont plus vivantes et se retrouvent donc dans la population de cellules mortes. La cytolysse *in vitro* entraîne une perte d'intégrité membranaire qui favorise l'augmentation du taux de cellules mortes à 48 heures. Le nombre de cellules traitées ayant subi une chute du potentiel mitochondrial est considérable après traitement par l'acide ursolique et indique que le processus apoptotique est déclenché dans les cellules M4Beu.

L'analyse par CMF nous a aussi permis de déterminer le pourcentage de cellules HaCaT et M4Beu en apoptose après traitement. Le taux de cellules ayant subi une chute du potentiel est déterminé par rapport à la population vivante alors que le taux d'apoptose se mesure par rapport à la population totale. Dans la lignée HaCaT, le taux de cellules en apoptose ne dépasse pas 13% quels que soient le temps de traitement et la concentration d'acide ursolique. Pour les cellules M4Beu, le taux d'apoptose augmente significativement avec le temps de traitement et la concentration d'acide ursolique. Il est de 40% à 24 heures mais chute à 8% à 48 heures pour les plus fortes concentrations d'acide ursolique. Cependant, pour les plus faibles concentrations d'acide ursolique, le taux d'apoptose avoisine les 21% à 48 heures. La diminution observée à 48 heures est due à la perte d'intégrité membranaire des cellules et à l'apparition d'une nécrose tardive, puisque la population de cellules mortes augmente de 50% à 63% pour 10 et 20  $\mu\text{M}$  d'acide ursolique, respectivement.

Nous avons décrit une chute de potentiel pour les cellules M4Beu traitées par l'acide ursolique. Les cellules HaCaT, quant à elles, ne présentent qu'une légère chute de potentiel, peu significative après traitement. Ces résultats nous permettent de conclure que la mitochondrie semble impliquée dans le processus apoptotique des cellules M4Beu. En revanche, dans les cellules HaCaT traitées, la voie intrinsèque semble très peu activée.

Après la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, la mitochondrie libère des protéines apoptogènes inductrices d'apoptose, comme le cytochrome c et l'AIF (Loeffler & Kroemer, 2000 ; Loeffler *et al.*, 2001). Nous avons étudié par immunocytochimie la

localisation sub-cellulaire du cytochrome c dans les deux lignées. Nous révélons la présence du cytochrome c dans le cytoplasme après traitement par l'acide ursolique ; de plus, l'intensité de fluorescence augmente avec le temps de traitement et la concentration d'acide ursolique. A 48 heures de traitement et à la concentration de 20  $\mu$ M, l'acide ursolique induit une libération du cytochrome c par la mitochondrie dans les cellules HaCaT et M4Beu traitées. Dans les deux lignées étudiées, nous pouvons supposer qu'une fois libérée, cette molécule apoptogène s'associe avec la pro-caspase-9 pour l'activer comme l'on décrit Ravagnan et Parone, en 2002.

Les études concernant les mécanismes de relargage des protéines mitochondriales apoptogènes se sont surtout focalisées sur le relargage du cytochrome c (Parone *et al.*, 2002). Le mécanisme exact de ce relargage n'est, jusqu'alors, pas encore tout à fait connu mais plusieurs hypothèses sont proposées (Borner, 2003). Il est reconnu que les membres de la famille de protéines Bcl-2 sont capables de former des canaux dans les membranes mitochondriales : ces protéines ont donc été les premiers candidats désignés pour la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale, afin de permettre la libération du cytochrome c (Fridman *et al.*, 1999 ; Gross *et al.*, 1999). Aujourd'hui, il est clairement établi qu'à la suite d'un stimulus apoptotique, Bax stimule la sortie du cytochrome c par un pore de la mitochondrie (Borner, 2003). Plusieurs études ont montré que la protéine pro-apoptotique Bax peut s'insérer dans la membrane mitochondriale et former des pores assez larges pour permettre le passage du cytochrome c (Korsmeyer *et al.*, 2000). Nous avons étudié, sur les lignées HaCaT et M4Beu traitées par l'acide ursolique, les deux régulateurs majeurs de la perméabilisation membranaire mitochondriale, les protéines Bax et Bcl-2 (Kroemer, 2002). Nous avons étudié leur expression à différents niveaux par RT-PCR, Western Blot et immunofluorescence par marquage indirect.

Nous avons montré dans la lignée HaCaT, que le traitement par l'acide ursolique diminue l'expression des ARNm de Bax, alors que l'expression des ARNm de Bcl-2 ne varie pas. Ce triterpène n'induit pas de variation de l'expression protéique de Bax, ni celle de Bcl-2. Quant à la technique d'immunocytochimie, elle n'a pas permis de vérifier la présence des deux protéines. Cette étude est peu concluante car elle ne permet pas d'impliquer ces deux protéines dans la libération du cytochrome c. Nous concluons que, dans les cellules HaCaT traitées, la voie mitochondriale ne semble pas impliquée pour être la voie de signalisation apoptotique. L'acide ursolique ne fait pas varier l'expression de p53, ni celle de Bax et n'induit qu'une légère chute de potentiel. Dans les cellules HaCaT, le relargage de la caspase-9 et du cytochrome c *via* la mitochondrie se fait certainement par une autre voie.

Dans la lignée cancéreuse M4Beu, l'acide ursolique augmente significativement l'expression des ARNm de Bax et son expression protéique de manière dose-dépendante. Pour les mêmes temps d'incubation et aux mêmes concentrations, l'expression des ARNm de Bcl-2 et son expression protéique diminuent significativement de manière dose-dépendante. Le ratio montre que la balance entre Bax et Bcl-2 penche en faveur de Bax, donc en faveur de l'ouverture des pores mitochondriaux et ainsi de la libération du cytochrome c, comme l'ont démontré Gross et coll., en 1999, et Borner, en 2003. Nous confirmons l'effet pro-apoptotique de l'acide ursolique. Par immunofluorescence, nous confirmons l'augmentation de l'expression de Bax et aucune variation de l'expression de Bcl-2 en fonction du temps et des concentrations d'acide ursolique. Ces résultats sont en corrélation avec la chute très importante du potentiel mitochondrial observé dans les cellules M4Beu.

Nos résultats montrent que, dans le cas des cellules M4Beu traitées par l'acide ursolique, l'expression des protéines p53 et Bax sont augmentées, alors que l'expression de la protéine Bcl-2 diminue. Nous avons également montré une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial suivie du relargage du cytochrome c, ainsi qu'une activation des caspases-9 et -3. Ceci démontre l'implication de la voie mitochondriale dans ces cellules. L'induction de l'apoptose mitochondriale *via* p53 a été montrée par d'autres auteurs. En 2001, Gao et coll. déterminent la voie mitochondriale comme voie apoptotique induite par p53 sur des cellules de Jurkat ayant subi un stress thermique. En 2002, Yuan et coll. montrent que les cellules leucémiques M1 subissant une baisse de température, présentent une apoptose induite par p53 à travers la voie lysosomale-mitochondriale. En revanche, nos résultats sont différents pour les cellules HaCaT. Après traitement, l'expression des protéines p53, Bax et Bcl-2 ne varie pas. Une très faible chute du potentiel mitochondrial est mise en évidence avec un relargage du cytochrome c et une activation des caspases-9 et -3. Ces phénomènes seraient dus à un mécanisme ne faisant pas intervenir p53, Bax et Bcl-2.

Le cytochrome c n'est pas la seule molécule apoptogène qui est libérée par la mitochondrie à la suite de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial. Sous l'influence de certains stimuli apoptotiques, l'AIF est libérée par la mitochondrie dans le cytosol, puis elle transloque dans le noyau des cellules en apoptose et induit les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose, telles qu'une condensation de la chromatine et un clivage de l'ADN en fragments de hauts poids moléculaires (Susin *et al.*, 1999a ; Ravagnan *et al.*, 2002). La sur-expression de Bcl-2 empêche la redistribution de l'AIF dans des lignées cellulaires de mammifères (Susin *et al.*, 1997). L'AIF induit l'apoptose de manière indépendante des caspases ; toutefois le mécanisme d'action de l'AIF est encore mal

connu, mais sa liaison à l'ADN pourrait, d'une part entraîner un changement conformationnel de la chromatine, dont la désorganisation aboutirait à des cassures, et d'autre part augmenter sa sensibilité aux nucléases induisant ainsi, *via* un mécanisme indépendant des caspases, la dégradation partielle de la chromatine. L'interaction de l'AIF avec l'ADN est indispensable à sa fonction apoptotique (Ye *et al.*, 2002).

Nous avons étudié par immunocytochimie la localisation de l'AIF dans les cellules HaCaT et M4Beu après traitement par l'acide ursolique. Cette technique nous permet de montrer que dans les cellules HaCaT, comme dans les cellules M4Beu, l'AIF est présent dans le cytoplasme en fonction du temps d'incubation et des concentrations croissantes d'acide ursolique. Toutefois, nous n'avons pas observé sa translocation dans le noyau.

Par Western Blot, nous avons montré une augmentation de l'expression de l'AIF dans les deux lignées cellulaires étudiées après 24 et 48 heures de traitement. Mais ces travaux méritent d'être approfondis par fractionnement des protéines cellulaires, c'est-à-dire en séparant les protéines mitochondriales, de celles du cytoplasme et du noyau, afin de confirmer le relargage de l'AIF de la mitochondrie dans le cytoplasme, puis sa translocation dans le noyau, après traitement par l'acide ursolique. Ceci est d'autant plus intéressant que depuis 2002, le rôle de l'AIF est controversé (Arnoult *et al.*, 2002 ; Arnoult *et al.*, 2003). En effet, certains auteurs remettent en cause l'action de l'AIF indépendamment de l'activation des caspases. La libération de l'AIF et sa translocation vers le noyau pourraient être dues à la fixation de la protéine t-Bid à la protéine Bax sur la mitochondrie. La protéine Bid est clivée et donc activée par une caspase de la voie extrinsèque (caspase-8) en protéine t-Bid (Sharpe *et al.*, 2004).

Comme t-Bid, d'autres molécules apoptogènes pourraient être étudiées dans notre système cellulaire d'induction de l'apoptose. En effet, après avoir étudié Bax, Bcl-2, caspase-9 et cytochrome c, il serait intéressant d'étudier aussi APAF-1, car elle serait inactive dans les mélanomes métastatiques. Cette inactivation serait due à une méthylation qui empêche la formation de l'apoptosome et ainsi l'exécution de la mort cellulaire par apoptose (Soengas *et al.*, 2001). La perte d'activité de APAF-1 serait un indicateur de la transformation des tumeurs en mélanome (Baldi *et al.*, 2004). Nous ne savons pas si APAF-1 est inactivée dans les cellules M4Beu et si l'acide ursolique agit ou pas sur cette protéine.

Cette étude nous a permis d'étudier *in vitro* et de comparer les effets biologiques de l'acide ursolique sur deux lignées de cellules issues de la peau, l'une cancéreuse (les cellules M4Beu), l'autre non (les cellules HaCaT). Nous avons démontré l'effet anti-prolifératif de

l'acide ursolique sur les deux lignées avec un  $IC_{50}$  identique aux deux temps de traitement utilisés dans notre étude. Nos résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus par Es-Saady et coll., en 1996, qui ont montré l'effet anti-prolifératif de l'acide ursolique sur deux lignées cancéreuses (MCF-7 et B16). L'acide ursolique induit l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules HaCaT en phase G1 avec une augmentation de l'expression de la protéine p21. Cette biomolécule n'a pas le même effet sur les cellules cancéreuses M4Beu, puisqu'elle n'entraîne aucun arrêt du cycle cellulaire et aucune variation de l'expression de p21. En revanche, la protéine p53 est active et présente au niveau du noyau des cellules traitées, quel que soit le type cellulaire. Toutefois, dans cette étude, p53 pourrait avoir un rôle différent en fonction de la lignée. Un pic Sub-G1 apparaît de manière plus importante dans les cellules M4Beu que pour les cellules HaCaT. Ces premiers résultats nous incitent à penser que l'acide ursolique agit différemment en fonction du type cellulaire considéré. Par l'étude de l'activation de la caspase-3, étape ultime et irréversible de l'apoptose dans tous les types cellulaires, nous confirmons un effet plus précoce de cette biomolécule dans la lignée M4Beu par rapport à la lignée HaCaT. En ce qui concerne l'activation de la caspase-1, elle n'est pas observée dans les deux lignées ce qui démontre que l'acide ursolique n'entraîne pas de nécrose et donc pas de phénomènes inflammatoires quel que soit le type cellulaire étudié.

Nos travaux permettent de mettre en évidence des différences dans l'implication des voies apoptotiques après traitement par l'acide ursolique. En effet, nous démontrons une forte activation de la voie intrinsèque mitochondriale dans les cellules M4Beu. La chute du potentiel transmembranaire mitochondrial est très importante et le ratio Bax/Bcl-2 obtenu après traitement est en faveur d'un processus pro-apoptotique permettant l'ouverture des pores mitochondriaux et donc la libération des molécules apoptogènes comme l'AIF et le cytochrome c. Pour les cellules HaCaT, nos résultats sont différents et ne permettent donc pas de décrire l'implication de la voie mitochondriale dans l'apoptose induite par l'acide ursolique. En effet, il n'y a pas de chute du potentiel transmembranaire et le ratio Bax/Bcl-2 n'est pas en faveur d'un processus pro-apoptotique ; toutefois, le relargage du cytochrome c et de l'AIF est visible, mais il est sûrement dû à d'autres voies apoptotiques que celle étudiée.

Dans les cellules HaCaT, nous n'avons pas démontré avec certitude l'implication spécifique d'une des voies apoptotiques. Nous pourrions ainsi analyser la voie, moins connue, du réticulum endoplasmique (RE). Ce dernier intervient dans la rétention du calcium intracellulaire et le maintien de l'homéostasie calcique (Sambrook, 1990) et est responsable du stockage du calcium intra-cellulaire en excès (Hajnoczky *et al.*, 2003). Le RE est essentiel à la survie de la cellule et toute perturbation de sa fonction induit un relargage de calcium

conduisant à l'apoptose (Diaz-Horta *et al.*, 2002). La perte de contrôle du RE sur l'équilibre ionique calcique de la cellule, due à un signal apoptotique, *via* p53, pourrait libérer une importante quantité d'ions calcium dans le cytosol. Ce taux élevé de calcium intra-cellulaire est un facteur déclencheur du processus apoptotique (Breckenridge *et al.*, 2003 ; Hajnoczky *et al.*, 2003). Le calcium libéré pourrait réguler la libération du cytochrome c (Boehning *et al.*, 2003) et permettre ainsi l'activation de la caspase-9 dans les cellules HaCaT. Le RE séquestre la caspase-12 qui est localisée spécifiquement sur la face cytosolique du RE (Nakagawa *et al.*, 2000a-b). Cette caspase n'intervient pas dans les voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques (Oyadomari *et al.*, 2002), mais elle est activée lorsque les cellules sont traitées avec des agents capables d'induire un stress du RE comme la tunicamycine par exemple (Welihinda *et al.*, 1999). Une augmentation de calcium cytosolique activerait la caspase-12 (Yoneda *et al.*, 2001). Cette dernière pourrait activer la caspase-9 sans passer par l'intermédiaire de la mitochondrie (Morishima *et al.*, 2002). Aussi, la caspase-12 pourrait activer la caspase-3 qui, par un effet feed-back, pourrait activer toutes les autres caspases afin d'accélérer le processus apoptotique. A ce moment, l'implication de la mitochondrie dans l'apoptose induite par l'acide ursolique sur les cellules HaCaT serait possible et entraînerait la libération de nombreuses molécules. Lauthier et coll., en 2000, ont montré que l'acide ursolique induit l'apoptose calcium dépendante sur les cellules Daudi. Ces précédents travaux dans notre laboratoire nous permettent de penser que l'étude de cette voie serait intéressante.

Notre travail présente pour la première fois une comparaison des effets de l'acide ursolique sur deux types de lignées cellulaires différentes : l'une cancéreuse, l'autre non. Nous démontrons une induction de l'apoptose par l'acide ursolique dans deux lignées cellulaires de la peau ce qui conforte les travaux de Hollosy et coll. sur les cellules A431, en 2001. En revanche nous montrons que l'acide ursolique a une action spécifique en fonction du type cellulaire. Son action est précoce et plus importante sur les cellules cancéreuses M4Beu avec une implication préférentielle de la voie intrinsèque. Alors que dans les cellules HaCaT, l'apoptose induite par l'acide ursolique serait, soit plus tardive que dans les cellules M4Beu avec l'activation de la même voie apoptotique, soit elle emprunterait une voie apoptotique différente autre que la voie mitochondriale mais qui passerait *via* la mitochondrie. L'apoptose tardive pour les cellules HaCaT pourrait peut-être s'expliquer par le fait que l'apoptose est précédée par l'arrêt du cycle cellulaire.

Malgré de nombreuses avancées en ce qui concerne les cancers et/ou l'apoptose, le cancer de la peau est loin d'être éradiqué mais la prévention est encore le meilleur des traitements.

# **CONCLUSION**

Notre travail s'intéresse à l'effet de l'acide ursolique, triterpène pentacyclique d'origine végétal, sur des cellules de la peau. Cette molécule est connue pour ses propriétés inhibitrices de la carcinogénèse *in vitro*, et elle est très utilisée comme principe actif dans des produits cosmétiques. Pour autant son rôle exact sur le métabolisme des cellules et ses propriétés apoptotiques sont très peu étudiées notamment sur les cellules cancéreuses de la peau.

Nous avons fait évoluer les connaissances sur l'apoptose induite par l'acide ursolique dans des lignées cellulaires de la peau. Dans un premier temps, nous avons montré l'effet anti-prolifératif de cette molécule et dans un deuxième temps son action au niveau du cycle cellulaire. Troisièmement, nous avons déterminé un effet pro-apoptotique de ce triterpène et recherché la voie d'induction du signal apoptotique. Dans un quatrième temps, l'implication de la voie mitochondriale a été déterminée. Enfin, nous avons pu, pour la première fois, comparer les effets de cette molécule sur deux lignées cellulaires de la peau.

Nos résultats démontrent que l'acide ursolique possède des propriétés pro-apoptotiques différentes selon le type cellulaire. Cette molécule développe des propriétés pro-apoptotiques plus marquées sur des cellules de lignées malignes telles que les cellules M4Beu, issues de mélanome métastasé. Dans ces cellules, l'apoptose induite par l'acide ursolique passe par l'activation de la voie mitochondriale intrinsèque. Cette molécule entraîne aucun arrêt du cycle cellulaire. A l'inverse sur les cellules non cancéreuses HaCaT, cellules immortalisées dérivées de kératinocytes, l'action de l'acide ursolique est aujourd'hui encore mal définie. L'acide ursolique provoque un arrêt du cycle cellulaire dans le but de permettre aux cellules la réparation de l'ADN endommagé. En revanche, la voie apoptotique impliquée dans cette lignée semblerait différente de celle induite dans les M4Beu.

Notre étude mérite d'être approfondie concernant la lignée cellulaire HaCaT. Afin de s'assurer que la voie intrinsèque mitochondriale pourrait être impliquée dans ces cellules mais plus précocement, une cinétique de traitement plus large pourrait être réalisée avec des temps de traitement inférieurs à 24 heures et compris entre 24 et 48 heures.

Dans le cas des cellules HaCaT, nous nous demandons comment les molécules apoptogènes sont relarguées par la mitochondrie, puisque nous n'avons montré aucune intervention des protéines Bax et Bcl-2. Par l'étude de la présence de la protéine Bid tronquée dans les cellules HaCaT après traitement, nous pourrions confirmer ou non l'implication de la voie extrinsèque. Cette protéine, lorsqu'elle est activée par clivage par une caspase qui peut être la caspase-8 de la voie extrinsèque ou la caspase-2, active *in fine* la voie mitochondriale et la



libération des molécules apoptogènes. Nous avons d'autant plus décrit une légère activation de la caspase-8 dans les cellules HaCaT par rapport aux M4Beu.

Enfin par l'étude de l'activité de la caspase-12 à l'aide d'un couple substrat/inhibiteur spécifique et l'analyse de la quantité de calcium intra-cellulaire dans les cellules HaCaT traitées, nous vérifierons l'implication du réticulum endoplasmique (RE) dans l'apoptose induite par l'acide ursolique. Le RE intervient dans la rétention du calcium intra-cellulaire et le maintien de l'homéostasie calcique. Il est essentiel à la survie de la cellule et toute perturbation de sa fonction induit un relargage de calcium conduisant à l'apoptose. Des travaux de notre laboratoire ont démontré que l'acide ursolique induit l'apoptose dans les cellules Daudi *via* une augmentation du calcium intra-cellulaire.

Nous avons démontré que le rôle de la protéine p53 au cours de l'apoptose induite par l'acide ursolique est différent dans les cellules HaCaT et M4Beu. Son rôle est encore mal déterminé et mérite d'être approfondi. Est-elle indispensable à l'apoptose dépendante de l'acide ursolique ? Pour cela, deux expérimentations devront être réalisées : d'une part, bloquer l'expression de p53 dans nos lignées et d'autre part, travailler avec une lignée témoin p53 déficiente.

Nous ne savons pas non plus comment l'acide ursolique agit sur les cellules en culture. Agit-il *via* sa fixation à un récepteur à la surface de la cellule ce qui transduit un signal apoptotique intra-cellulaire ? L'acide ursolique pénètre-t-il dans les cellules de manière lipophile pour se fixer sur un récepteur intra-cellulaire ou nucléaire ou directement sur l'ADN ? L'acide ursolique est-il métabolisé une fois dans le cytosol ?

Les travaux concernant les effets de l'acide ursolique évoluent et de nombreuses équipes s'intéressent à cette biomolécule. Nous savons aujourd'hui qu'elle est anti-proliférative et pro-apoptotique, et son action serait spécifique du type cellulaire. Ces propriétés s'élargissent et pourraient faire de cette molécule un excellent agent préventif.

De nombreux travaux concernant notamment les cancers du sein, les cancers digestifs, pulmonaires, de la prostate, les lymphomes ou encore les mélanomes permettent maintenant d'affiner la thérapeutique et d'identifier les profils moléculaires définissant les risques liés aux cancers. La biologie moléculaire s'étend aussi à l'étude de l'hôte. Ainsi est mise en évidence la grande diversité des individus dans leur réponse aux cancérogènes mais également aux agents anti-cancéreux. Ceci représente un champ susceptible de déboucher sur des applications considérables en matière de prévention et de traitement.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## A

- Adams JM, Cory S.** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998 ; 281 : 1322-1326.
- Afford S, Randhawa S.** Apoptosis. *Mo Pathol*. 2000 ; 53 : 55-63.
- Agnantis NJ, Goussia AC.** Apoptose et cancer. *Bull Acad Natl Med*. 1999 ; 183 : 277-287.
- Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, Menendez S, Martinez-Sanchez G, Re L, Giuliani A, Leon OS.** Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res*. 2002 ; 45 : 333-339.
- Amarande-Mendes GP, Green DR.** The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res*. 1999 ; 32 : 1053-1061.
- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR.** Feasibility of drug screening with panels of human tumor cells lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*. 1988 ; 48 : 589-601.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 1996 ; 87: 171.
- Alnemri ES.** Hidden powers of the mitochondria. *Nat Cell Biol*. 1999 ; 1 : 40-42.
- Altmann R.** Die demenar Organsmen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Leipzig. Veit. 1890. 145p
- Andersson D, Liu JJ, Nilsson A, Duan RD.** Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase. *Anticancer Res*. 2003 ; 23 : 3317-3322.
- Anderson P.** Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997 ; 61 : 33-46.
- Antonsson B, Martinou JC.** The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res*. 2000 ; 256 : 50-57.
- Antonsson B.** Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol Cell Biochem*. 2004 ; 256-257 : 141-155.
- Arch RH, Thompson CB.** Lymphocyte survival—the struggle against death. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999 ; 15 : 113-140.
- Arnoult D, Parone P, Martinou JC, Antonsson B, Estaquier J, Ameinsen JC.** Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome *c* release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol*. 2002 ; 159 : 923-929.
- Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ.** Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J*. 2003 ; 22 : 4385-4399.

**Ashe PC, Berry MD.** Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 ; 27 : 199-214.

## B

**Baek JH, Lee YS, Kang CM, Kim JA, Kwon KS, Son HC, Kim KW.** Intracellular Ca<sup>2+</sup> release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Int J Cancer*. 1997 ; 73 : 725-728.

**Baglin I, Mitaine-Offer AC, Nour M, Tan K, Cave C, Lacaille-Dubois MA.** A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini Rev Med Chem*. 2003 ; 3 : 525-539.

**Balch & Milton.** Cutaneous melanoma, Lippincott Co., Philadelphia, 1985.

**Baldi A, Santini D, Russo P, Catricala C, Amantea A, Picardo M, Tatangelo F, Botti G, Dragonetti E, Murace R, Tonini G, Natali PG, Baldi F, Paggi MG.** Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. *Exp Dermatol*. 2004 ; 13 : 93-97.

**Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Higashihara H, Ukiya M, Watanabe K, Kimura Y, Hasegawa J, Nishino H.** Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004 ; 68 : 85-90.

**Bargonetti J, Manfredi JJ.** Multiples roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol*. 2002 ; 18 : 6910-6924.

**Barinaga M.** Is apoptosis key in Alzheimer's disease ? *Science*. 1998 ; 281 : 1303-1304.

**Barone MV, Crozat A, Tabae A, Philipson L, Ron D.** CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev*. 1994 ; 8 : 453-464.

**Beg AA, Baltimore D.** An essential role for NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Science*. 1996 ; 274 : 782-784.

**Belaich S.** How to suspect the degeneration of a beauty spot. *Rev Prat*. 1975 ; 25 : 1221-1222.

**Bellet V, Duval R, Delebassée S, Cook-Moreau J, Bosgiraud C.** AZT inhibits Visna/maedi virus-induced apoptosis. *Arch Virol*. 2004 ; 149 : 583-601.

**Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P.** Cell surface trafficking of Fas : a rapid mechanism of p53 mediated apoptosis. *Science*. 1998 ; 282 : 290-293.

**Bickenbach JR, Vormwald-Dogan V, Bachor C, Bleuel K, Schnapp G, Boukamp P.** Telomerase is not an epidermal stem cell marker and is downregulated by calcium. *J Invest Dermatol*. 1998 ; 111 : 1045-1052.

**Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH.** Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2003 ; 5 : 1051-1061.

**Boldin MP, Mett IL, Wallach D.** A protein related to a proteasomal subunit binds to the intracellular domain of the p55 TNF receptor upstream to its 'death domain'. *FEBS Lett.* 1995 ; 367 : 39-44.

**Borner C.** The Bcl-2 protein family : sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 2003 ; 39 : 615-647.

**Bortner CD, Cidlowski JA.** Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes . *Am J Physiol.* 1996 ; 271 : 950-961.

**Both DM, Goodtzova K, Yarosh DB, Brown DA.** Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells. *Arch Dermatol Res.* 2002 ; 293 : 569-575.

**Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE.** Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988 ; 106 : 761-771.

**Boukamp P, Breitkreutz D, Hülsen A, Tomakidi P, Fusenig NE.** *In vitro* transformation and tumor progression : A multistep model for skin carcinogenesis. *In* : Leigh I, Lane B, Watt F (eds), *The Keratinocyte Handbook*. Cambridge University Press, New York, 1994, pp. 485-499.

**Boukamp P, Peter W, Pascheberg U, Altmeier S, Fasching C, Stanbridge EJ, Fusenig NE.** Step-wise progression in human skin carcinogenesis *in vitro* involves mutational inactivation of p53, rasH oncogene activation and additional chromosome loss. *Oncogene.* 1995 ; 11 : 961-969.

**Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hulsen A, Fasching C, Cremer T, Fusenig NE.** Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997 ; 19 : 201-214.

**Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 ; 72 : 248-254.

**Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC.** Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene.* 2003 ; 22 : 8608-8618.

**Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X.** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999 ; 15 : 269-290.

**Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC.** Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci.* 1999 ; 112 : 1743-1753.

**Burg G, Dummer R, Cavegn B, Panizzon R.** Malignant melanoma of the skin. *Ther Umsch.* 1993 ; 50 : 822-827.

## C

**Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzani N, Kroemer G.** Apoptosis-inducing factor (AIF) : a novel independent death effector released from mitochondria. *Biochimie.* 2002a ; 84 : 215-222.

**Candé C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G.** Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci.* 2002b ; 115 : 4727-4734.

**Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC.** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998 ; 282 : 1318-1321.

**Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB.** Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemiosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987 ; 47 : 936-942.

**Cha HJ, Bae SK, Lee HY, Lee OH, Sato H, Seiki M, Park BC, Kim KW.** Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Res.* 1996 ; 56 : 2281-2284.

**Cha HJ, Park MT, Chung HY, Kim ND, Sato H, Seiki M, Kim KW.** Ursolic acid-induced down-regulation of MMP-9 gene is mediated through the nuclear translocation of glucocorticoid receptor in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Oncogene.* 1998 ; 16 : 771-778.

**Chandramu C, Manohar RD, Krupadanam DG, Dashavantha RV.** Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytother Res.* 2003 ; 17 : 129-134.

**Chattopadhyay D, Maiti K, Kundu AP, Chakraborty MS, Bhadra R, Mandal SC, Mandal AB.** Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. *J Ethnopharmacol.* 2001 ; 77 : 49-55.

**Chen J, Marechal V, Levine AJ.** Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol.* 1993 ; 13 : 4107-4114.

**Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR.** Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004 ; 303 : 1010-1014.

**Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM.** FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1996 ; 271 : 4961-4965.

**Choi BM, Park R, Pae HO, Yoo JC, Kim YC, Jun CD, Jung BH, Oh GS, So HS, Kim YM, Chung HT.** Cyclic adenosine monophosphate inhibits ursolic acid-induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 cells. *Pharmacol Toxicol.* 2000 ; 86 : 53-58.

**Choi KH, Hama-Inaba H, Wang B, Haginoya K, Odaka T, Yamada T, Hayata I, Ohyama H.** UVC-induced apoptosis in human epithelial tumor A431 cells: sequence of apoptotic changes and involvement of caspase (-8 and -3) cascade. *J Radiat Res. (Tokyo).* 2000 ; 41 : 243-258.

**Choi YH, Baek JH, Yoo MA, Chung HY, Kim ND, Kim KW.** Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *International Journal of Oncology.* 2000 ; 17 : 565-571.

**Choi C, Jeong E, Benveniste EN.** Caspase-1 mediates Fas-induced apoptosis and is up-regulated by interferon-gamma in human astrocytoma cells. *J Neurooncol.* 2004 ; 67 : 167-176.

**Chomczynski P, Sacchi N.** Single method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 ; 162 : 156-159.

**Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW.** Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 ; 94 : 10057-10062.

**Clark WH Jr, Ainsworth AM, Bernardino EA, Yang CH, Mihm CM Jr, Reed RJ.** The developmental biology of primary human malignant melanomas. *Semin Oncol.* 1975 ; 2 : 83-103.

**Coats S, Whyte P, Fero ML, Lacy S, Chung G, Randel E, Firpo E, Roberts JM.** A new pathway for mitogen-dependent cdk2 regulation uncovered in p27(Kip1)-deficient cells. *Curr Biol.* 1999 ; 9 : 163-173.

**Crompton M.** Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 ; 12 : 414-419.

**Cussac C, Mounetou E, Rapp M, Madelmont JC, Maurizis JC, Labarre P, Chollet P, Chabard JL, Godeneche D, Baudry JP, et al.** Disposition and metabolism of O6-

alkylguanine-DNA alkyltransferase inhibitor in nude mice bearing human melanoma. *Drug Metab Dispos.* 1994 ; 22 : 637-642.

**Cussac C, Rapp M, Mounetou E, Madelmont JC, Maurizis JC, Godeneche D, Dupuy JM, Sauzieres J, Baudry JP, Veyre A.** Enhancement by O6-benzyl-N-acetylguanosine derivatives of chloroethylnitrosourea antitumor action in chloroethylnitrosourea-resistant human malignant melanocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 ; 271 : 1353-1358.

#### D

**Darnay BG, Aggarwal BB.** Early events in TNF signaling : a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol.* 1997 ; 61 : 559-566.

**Deas O, Dumont C, MacFarlane M, Rouleau M, Hebib C, Harper F, Hirsch F, Charpentier B, Cohen GM, Senik A.** Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol.* 1998 ; 161 : 3375-3383.

**Debiton E, Cussac-Buchdhal C, Mounetou E, Rapp M, Dupuy JM, Maurizis JC, Veyre A, Madelmont JC.** Enhancement by O6-benzyl-N2-acetylguanosine of N'-[2-chloroethyl]-N-[2-(methylsulphonyl)ethyl]-N'-nitrosourea therapeutic index on nude mice bearing resistant human melanoma. *Br J Cancer.* 1997 ; 76 : 1157-1162.

**Del Bello B, Valentini MA, Mangiavacchi P, Comporti M, Maellaro E.** Role of caspases-3 and -7 in Apaf-1 proteolytic cleavage and degradation events during cisplatin-induced apoptosis in melanoma cells. *Exp Cell Res.* 2004 ; 293 : 302-310.

**Denizot F, Lang R.** Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986 ; 89 : 271-277.

**Desagher SO, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC.** Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol.* 1999 ; 144 : 891-901.

**Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC.** IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998 ; 17 : 2215-2223.

**Diaz-Horta O, Kamagate A, Herchuelz A, Van Eylen F.** Na/Ca exchanger overexpression induces endoplasmic reticulum-related apoptosis and caspase-12 activation in insulin-releasing BRIN-BD11 cells. *Diabetes.* 2002 ; 51 : 1815-1824.



- Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA.** Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol.* 1997 ; 151 : 1205-1213.
- Dore JF, Bailly M, Bertrand S.** Metastases of human tumors in experimental animals. *Anticancer Res.* 1987 ; 7 : 997-1003.
- Droin N, Dubrez L, Eymin B, Renvoize C, Breard J, Dimanche-Boitrel MT, Solary E.** Upregulation of CASP genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Oncogene.* 1998 ; 16 : 2885-2894.
- Dubois J.** La peau, de la santé à la beauté. Toulouse : Privat, 2001, 17-23p.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X.** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000 ; 102 : 33-42.
- Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB.** A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 1996 ; 15 : 2685-2694.
- Dutta A, Ruppert JM, Aster JC, Winchester E.** Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature.* 1993 ; 365 : 79-82.
- Duval R, Bellet V, Delebasse S, Bosgraud C.** Implication of caspases during maedi-visna virus-induced apoptosis. *J Gen Virol.* 2002 ; 83 : 3153-3161.
- Dyall SD, Johnson PJ.** Origins of hydrogenosomes and mitochondria : evolution and organelle biogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2000 ; 3 : 404-411.

## E

- Earnshaw WC.** Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 ; 7 : 337-343.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH.** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999 ; 68 : 383-424.
- Ekert PG, Vaux DL.** Apoptosis in the immune system. *Br Med Bull.* 1997 ; 53 : 591-603.
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL.** Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* 1999 ; 6 : 1081-1086.
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B.** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993 ; 75: 817-825.
- Eleveld-Trancikova D, Kudela P, Majerciak V, Regendova M, Zelnik V, Pastorek J, Pastorekova S, Bizik J.** Suppression subtractive hybridisation to isolate differentially expressed genes involved in invasiveness of melanoma cell line cultured under different conditions. *Int J Oncol.* 2002 ; 20 : 501-508.

**Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S.** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998 ; 391 : 43-50.

**Es-Saady D, Najid A, Simon A, Denizot Y, Chulia AJ, Delage C.** Effects of ursolic acid and its analogues on soybean 15-lipoxygenase activity and the proliferation rate of a human gastric tumour cell line. *Mediators Inflamm*. 1994 ; 3 : 181-184.

**Es-Saady D, Najid A, Simon A, Ollier M, Maurizis JC, Chulia AJ, Delage C.** Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest. *Cancer Lett*. 1996a ; 106 : 193-197.

**Es-Saady D, Simon A, Jayat-Vignoles C, Chulia AJ, Delage C.** MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts. *Anticancer Res*. 1996b ; 16 : 481-486.

**Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC.** Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*. 2000 ; 20 : 929-935.

**Evan G, Littlewood T.** A matter of life and cell death. *Science*. 1998 ; 281 : 1317-1321.

## F

**Fang X, Dahammika Nanayakkara NP, Phoebe Jr CH, Pezzuto JM, Douglas Kahinghorn A, Farnsworth NR.** Plant anticancer agents XXXVII. Constituents of *Amanoa Oblongifolia*. *Planta Med*. 1985 ; 4 : 346-347.

**Fang X, Yu S, Eder A, Mao M, Bast RC Jr, Boyd D, Mills GB.** Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene*. 1999 ; 18 : 6635-6640.

**Feldmann G.** L'apoptose. *Ann Pharm Fr*. 1999; 57 : 291-308.

**Fernet M, Ponette V, Deniaud-Alexandre E, Menissier-De Murcia J, De Murcia G, Giocanti N, Megnin-Chanet F, Favaudon V.** Poly(ADP-ribose) polymerase, a major determinant of early cell response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 2000 ; 76 : 1621-1629.

**Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, Este JA, Zamzami N, Susin SA, Xie Z, Brothers G, Reed JC, Penninger JM, Kroemer G.** Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex : role of mitochondria. *J Exp Med*. 2000 ; 192 : 1081-1092.

**Fesus L, Thomazy V, Falus A.** Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett*. 1987 ; 224 : 104-108.

**Flanagan JG.** Life on the road. *Nature*. 1999 ; 401 : 747-748.

**Fojo A, Akiyama S, Gottesman MM, Pastan I.** Reduced drug accumulation in multiply drug-resistant human KB carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1985 ; 45 : 3002-3007.

**Forus A, Florenes VA, Maelandsmo GM, Fodstad O, Myklebost O.** The protooncogene CHOP/GADD153, involved in growth arrest and DNA damage response, is amplified in a subset of human sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 1994 ; 78 : 165-171.

**Fridman JS, Benedict MA, Maybaum J.** Bcl-X(S)-induced cell death in 3T3 cells does not require or induce caspase activation. *Cancer Res.* 1999 ; 59 : 5999-6004.

**Fritsche M, Haessler C, Brandner G.** Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene.* 1993 ; 8 : 307-318.

**Fuchs SY, Adler V, Bushmann T, Wu X, Ronai Z.** Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene.* 1998 ; 17 : 2543-2547.

**Fukazawa T, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kadowaki Y, Itoshima T, Takata Y, Kagawa S, Roth JA, Tschopp J, Tanaka N.** Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene.* 2001 ; 20 : 5225-5231.

**Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM.** Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ.* 1998 ; 5 : 884-893.

**Fusenig NE, Dzarlieva-Petrusevska RT, Breitkreutz D.** Phenotypic and cytogenetic characteristics of different stages during spontaneous transformation of mouse keratinocytes in vitro. *In* : Barret JC, Tennant RW (eds), *Carcinogenesis*, vol 9. Raven Press, New York, 1985, pp. 293-326.

**Fusenig NE, Boukamp P, Breitkreutz D, Hülsen A.** Altered regulation of growth and differentiation at different stages of transformation of human skin keratinocytes. *In* : Rhim JS, Dritschilo A (eds), *Neoplastic Transformation in Human Cell Culture*. Humana Press, Totowa, NJ, 1991, pp. 235-250.

**Fusenig NE, Boukamp P.** Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog.* 1998 ; 23 : 144-158.

## G

**Gao CF, Ren S, Zhang L, Nakajima T, Ichinose S, Hara T, Koike K, Tsuchida N.** Caspase-dependent cytosolic release of cytochrome c and membrane translocation of Bax in p53-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2001 ; 265 : 145-151.

- Garg AK, Aggarwal BB.** Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol.* 2002 ; 39 : 509-517.
- Gartel AL, Tyner AL.** The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2002 ; 1 : 639-649.
- Gerlier HW, Thomasset N.** Use the MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 1986 ; 94 : 57-63.
- Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Brunn HF.** Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 ; 87: 2725-2729.
- Gintl WH.** Uber das urson. *Monatsch. Chem.* 1893 ; XIV : 255.
- Goldberg ME.** Le tri automatique de cellules par cytofluorographie. *Ann Immunol.* 1980 ; 131 : 347-355.
- Goldrath A, Bevan M.** Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.* 1999 ; 402 : 255-262.
- Gottfredi V, Prives C.** Molecular biology : getting p53 out of nucleus. *Science.* 2001 ; 292 : 1851-1852.
- Green D. & Kroemer G.** The central executioners of apoptosis : caspases or mitochondria. *Trends Cell Biol.* 1998 ; 8 : 267-271.
- Green LM, Reade JL, Ware CF.** Rapid colorimetric assay for cell viability : Application to the quantification of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods.* 1984 ; 70 : 257-268.
- Grell M, Zimmermann G, Gottfried E.** Induction of cell death by tumor necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40, and CD30 : a role of TNFR1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* 1999 ; 18 : 3034-3043.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ.** BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999 ; 13 : 1899-1911.
- Gupta MB, Bhalla TN, Gupta GP, Mitra CR, Phargava KP.** Anti-inflammatory activity of natural products (I) triterpenoids. *Eur J Pharmacol.* 1969 ; 6 : 67-70.
- Gupta S, Radha V, Sudhakar Ch, Swarup G.** A nuclear protein tyrosine phosphatase activates p53 and induces caspase-1-dependent apoptosis. *FEBS Lett.* 2002 ; 532: 61-66.
- Gupta S.** Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncol.* 2003 ; 22 : 15-20.

## H

**Han DK, Chaudhary PM, Wright ME, Friedman C, Trask BJ, Riedel RT, Baskin DG, Schwartz SM, Hood L.** MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 ; 94 : 11333-11338.

**Hanson KM, Clegg RM.** Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in ex vivo human skin. *Photochem Photobiol.* 2002 ; 76 : 57-63.

**Haines DS.** The mdm2 proto-oncogene. *Leuk Lymphoma.* 1997 ; 26 : 227-238.

**Hajnoczky G, Davies E, Madesh M.** Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 ; 34 : 445-454.

**Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M.** Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 1997 ; 387 : 296-299.

**Hay S, Kannourakis G.** A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol.* 2002 ; 83 : 1547-1564.

**Hengartner MO.** The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 ; 407 : 770-776.

**Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B.** 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1997 ; 1 : 3-11.

**Herr I, Debatin KM.** Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.* 2001 ; 98 : 2603-2614.

**Hirota M, Mori T, Yoshida M, Iriye R.** Suppression of tumor promoter-induced inflammation of mouse ear by ursolic acid and 4,4-dimethylcholestane derivatives. *Agric Biol Chem.* 1990 ; 54 : 1073-1075.

**Hollosoy F, Meszaros G, Bokonyi G, Idei M, Seprodi A, Szende B, Keri G.** Cytostatic, cytotoxic and protein tyrosine kinase inhibitory activity of ursolic acid in A431 human tumor cells. *Anticancer Res.* 2000 ; 20: 4563-4570.

**Hollosoy F, Idei M, Csorba G, Szabo E, Bokonyi G, Seprodi A, Meszaros G, Szende B, Keri G.** Activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis. *Anticancer Res.* 2001 ; 21 : 3485-3491.

**Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM.** I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997 ; 272 : 17255-17527.

**Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferraro T, Lou YR, Stauber K, Ma W, Georgiadis C, Laskin JD, Conney AH.** Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.* 1994 ; 54 : 701-708.

**Huang J, Sun Y, Lu S.** Experimental study on apoptosis induced by ursolic acid isolated from asparagus in HL-60 cells. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 1999 ; 19 : 296-298.

### I

**Iavarone A, Massague J.** Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature.* 1997 ; 387 : 417-422.

**Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y.** Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signalling pathways. *Science.* 1997 ; 275 : 90-94.

**Inohara N, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nunez G.** CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 ; 94 : 10717-10722.

**Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J.** Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997 ; 388 : 190-195.

**Isobe T, Noda Y, Ohsaki A, Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M.** Studies on the constituents of *Leucoseptum stellipillum*. *Yakugaku Zasshi.* 1989 ; 109 : 175-178.

### J

**Jacotot E, Ferri K, Kroemer G.** Apoptose en pathologies humaines. *Annales de l'institut Pasteur / actualités.* ELSEVIER, 2000.

**Jaiswal AS & Narayan S.** p53-dependent transcriptional regulation of the APC promoter in colon cancer cells treated with DNA alkylating agents. *J Biol Chem.* 2001 ; 276 : 18193-18199.

**Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L.** Molecular biology of aging. *Cell.* 1999 ; 96 : 291-302.

**Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T.** Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 ; 93 : 11848-11852.

**Jonason AS, Kunala S, Price GJ, Restifo RJ, Spinelli HM, Persing JA, Leffell DJ, Tarone RE, Brash DE.** Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 ; 93 : 14025-14029.

### K

**Kang KH, Kim WH, Choi KH.** p21 promotes ceramide-induced apoptosis and antagonizes the antideath effect of Bcl-2 in human hepatocarcinoma cells. *Exp Cell Res.* 1999 ; 253 : 403-441.

**Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr.** A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*. 1992 ; 71 : 587-597.

**Katayose D, Wersto R, Cowan K, Seth P.** Consequence of p53 gene expression by adenovirus vector on cell cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995 ; 215 : 446-451.

**Kaufmann SH.** Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic. *Cancer Res.* 1989 ; 49 : 5870-5878.

**Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG.** Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993 ; 53 : 3976-3985.

**Kaufmann SH, Mesner PW Jr, Samejima K, Tone S, Earnshaw WC.** Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. *Methods Enzymol.* 2000; 322 : 3-15.

**Kawahara K, Oyadomari S, Gotoh T, Kohsaka S, Nakayama H, Mori M.** Induction of CHOP and apoptosis by nitric oxide in p53-deficient microglial cells. *FEBS Lett.* 2001 ; 506 : 135-139.

**Kellen J & Kremery V.** Determination of lactic dehydrogenase activity in microorganisms by means of phenazine metosulphate. *J Hyg Epidemiol microbiol Immunol.* 1966 ; 10 : 1-7.

**Kerker M, Van Dilla MA, Kratonvil JP, Hsu P, Wand DS, Gray JW, Langlois RG.** Is the control dogma of flow cytometry true : that fluorescence intensity do proportional to cellular dye content? *Cytometry.* 1982 ; 3: 71-78.

**Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 ; 26 : 239-257.

**Kim DK, Baek JH, Kang CM, Yoo MA, Sung JW, Chung HY, Kim ND, Choi YH, Lee SH, Kim KW.** Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *Int J Cancer.* 2000 ; 87 : 629-636.

**Kim TK.** In vitro transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 ; 234: 300-302

**Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD.** The release of cytochrome c from mitochondria : a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997 ; 275 : 1132-1136.

**Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH.** Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000 ; 12 : 1166-1173.

**Kosuge T, Yokota M, Sugiyama K, Mure T, Yamazawa H, Yamamoto T.** Studies on bioactive substances in crude drugs used for arthritic diseases in traditional Chinese medicine. III. Isolation and identification of anti-inflammatory and analgesic principles from the whole herb of *Pyrola rotundifolia* L. *Chem Pharm Bull.* 1985 ; 33 : 5355-5357.

**Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT.** Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 1997 ; 278 : 294-298.

**Kowalewski Z, Kortus M, Edzia W, Koniar H.** Antibiotic action of beta-ursolic acid. *Arch Immunol Ther Exp.* 1976 ; 24 : 115-119.

**Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC.** Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.* 1997; 57 : 1605-1613.

**Kroemer G, Zamzami N, Susin SA.** Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today.* 1997 ; 18 : 44-51.

**Kroemer, G. & Reed, J.C.** Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000 ; 6 : 513-519.

**Kroemer G.** Introduction: mitochondrial control of apoptosis. *Biochimie.* 2002 ; 84 : 103-104.

**Kurosawa A, Miwa H, Hirose M, Tsune I, Nagahara A, Sato N.** Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by *Helicobacter pylori* through increased phosphorylated p53, p21 and Bax expression in endothelial cells. *J Med Microbiol.* 2002 ; 51 : 385-391.

## L

**Lane DP.** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992 ; 358 : 15-16.

**Lauthier F, Taillet L, Trouillas P, Delage C, Simon A.** Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells. *Anticancer Drugs.* 2000 ; 11 : 737-745.

**Laycock MV, Thurman DA, Boulter D.** An improved method for the detection of dehydrogenase using tetrazolium salts. *Clin Chim Acta.* 1965 ; 11 : 98-100.

**Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC.** Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 1994 ; 371 : 346-347.



**Leblanc V, May P.** Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN. *Med Sci (Paris)*. 2002 ; 18 : 577-584.

**Leblanc AC.** Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 ; 27 : 215-229.

**Lee HY, Chung HY, Kim KH, Lee JJ, Kim KW.** Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1994 ; 120 : 513-518.

**Lee I, Lee J, Lee YH, Leonard J.** Ursolic acid-induced changes in tumor growth, O<sub>2</sub> consumption, and tumor interstitial fluid pressure. *Anticancer Res*. 2001 ; 21 : 2827-2833.

**Lee YS, Jin DQ, Beak SM, Lee ES, Kim JA.** Inhibition of ultraviolet A-modulated signaling pathways by asiatic and ursolic in HaCaT human keratinocytes. *Eur J Pharmacol*. 2003 ; 476 : 173-178.

**Lees-Miller SP, Sakaguchi K, Ullrich SJ, Appella E, Anderson CW.** Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serine 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human. *Mol Cell Biol*. 1992 ; 12 : 5041-5049.

**Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers FC, Bjorklund B, Nap M, Jornvall H, Schutte B.** Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol*. 1999 ; 187 : 567-572.

**Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, Metcalf RA, Stampfer MR, Fusenig N, Rogan EM, Harris CC.** p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*. 1993 ; 14 : 833-839.

**Leist M, Single B, Castoldi A, Kühnle S, Nicotera P.** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration : a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*. 1997 ; 185 : 1481-1486.

**Levine AJ.** p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*. 1997; 88 : 323-331.

**Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J.** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998 ; 94 : 491-501.

**Li J, Guo WJ, Yang QY.** Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J Gastroenterol*. 2002 ; 8 : 493-495.

**Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG.** Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev*. 1999 ; 13 : 2514-2526.

**Lincet H, Poulain L, Remy JS, Deslandes E, Duigou F, Gauduchon P, Staedel C.** The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2000 ; 161 : 17-26.

**Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG.** Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.* 1996 ; 379 : 349-353.

**Liu J, Liu Y, Mao Q, Klaassen CD.** The effects of 10 triterpenoid compounds on experimental liver injury in mice. *Fundam Appl Toxicol.* 1994 ; 22 : 34-40.

**Liu J.** Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. *J of Ethnopharmacology.* 1995 ; 49 : 57-68.

**Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996 ; 86 : 147-157.

**Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X.** DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* 1998 ; 89 : 175-184.

**Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M.** Dissection of TNF receptor I effector functions : JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappa-B activation prevents cell death. *Cell.* 1996 ; 87 : 565-576.

**Locksley RM, Killeen N, Leonardo MJ.** The TNF and TNF receptor superfamilies : integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 ; 104 : 487-501.

**Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, Darnell.** *Molecular Cell biology.* 1995. New-york. WH Freeman and company. Third edition. 1417p.

**Loeffler M, Kroemer G.** The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res.* 2000 ; 256 : 19-26.

**Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Métévier D, Nieminen AL, Brothers G, Penninger JM, Kroemer G.** Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J.* 2001 ; 15 : 758-767.

**Lu Y, Yamagishi N, Yagi T, Takebe H.** Mutated p21(WAF1/CIP1/SDI1) lacking CDK-inhibitory activity fails to prevent apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Oncogene.* 1998 ; 16 : 705-712.

**Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X.** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998 ; 94 : 481-490.

## M

**Ma C, Nakamura N, Miyashiro H, Hattori M, Shimotohno K.** Inhibitory effects of constituents from *Cynomorium songaricum* and related triterpene derivatives on HIV-1 protease. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1999 ; 47 : 141-145.

**MacFarlane M.** TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett*. 2001 ; 139 : 89-97.

**Manez S, Recio MC, Giner R, , Ríos JL.** Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur J Pharmacol*. 1997 ; 334 : 103-105.

**Marchenko ND, Zaika A, Moll UM.** Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 2000 ; 275 : 16202-16212.

**Margolin N, Raybuck SA, Wilson KP, Chen W, Fox T, Gu Y, Livingston DJ.** Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases. *J Biol Chem*. 1997 ; 272 : 7223-7228.

**Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ.** Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem*. 1998 ; 273 : 4345-4349.

**Martins LM, Kottke TJ, Kaufmann SH, Earnshaw WC.** Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Blood*. 1998 ; 92 : 3042-3049.

**Mather M, Rottenberg H.** Polycations induce the release of soluble intermembrane mitochondrial proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2001 ; 1503 : 357-368.

**Matsumoto M, Minami M, Takeda K, Sakao Y, Akira S.** Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett*. 1996 ; 395 : 143-147.

**May P, May E.** Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999 ; 18 : 7621-7636.

**Meek DW.** Post-translational modification of p53 and the integration of stress signal. *Path Biol*. 1997 ; 45 : 804-814.

**Meier P, Finch A, Evan G.** Apoptosis in development. *Nature*. 2000 ; 407 : 796-800.

**Menegoz F, Black RJ, Arveux P, Magne V, Ferlay J, Buemi A, Carli PM, Chapelain G, Faivre J, Gignoux M, Grosclaude P, Mace-Lesec'h J, Raverdy N, Schaffer P.** Cancer incidence and mortality in France in 1975-1995. *Eur J Canc Prev*. 1997 ; 6 : 442-466.

**Mercer EA, Korhonen L, Skoglosa Y, Olsson PA, Kukkonen JP, Lindholm D.** NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways. *EMBO J*. 2000 ; 19 : 3597-607.

**Meredith JE, Schwartz MA.** Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1997 ; 7 : 146-150.

**Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J.** NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol.* 2001 ; 21 : 5299-5305.

**Miller AM, Kobb SM, Mc Tiernan R.** Regulation of HL60 differentiation by lipoxigenase pathway metabolites in vitro. *Cancer Res.* 1990 ; 50 : 7257-7260.

**Miller SJ, Suthiphongchai T, Zambetti GP, Ewen ME.** P53 binds selectively to the 5' untranslated region of cdk4, an ARN element necessary and sufficient for transforming growth factor  $\beta$ - and p53-mediated translational inhibition of cdk4. *Mol Cell Biol.* 2000 ; 20 : 8420-8431.

**Min BS, Jung HJ, Lee JS, Kim YH, Bok SH, Ma CM, Nakamura N, Hattori M, Bae K.** Inhibitory effect of triterpenes from *Crataegus pinatifida* on HIV-I protease. *Planta Med.* 1999 ; 65 : 374-375.

**Mitaine-Offer AC, Hornebeck W, Sauvain M, Zeches-Hanrot M.** Triterpenes and phytosterols as human leucocyte elastase inhibitors. *Planta Med.* 2002 ; 68 : 930-932.

**Mitchell P.** Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. *Eur J Biochem.* 1979 ; 95 : 1-20.

**Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J.** Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell.* 1993 ; 75 : 653-660.

**Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC.** Identification of p53-dependent negative response element in the *bcl-2* gene. *Cancer Res.* 1994 ; 54 : 3131-3135.

**Mizushima Y, Iida A, Ohta K, Sugawara F, Sakaguchi K.** Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. *Biochem J* 2000 ; 350 : 757-763.

**Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ.** The *mdm-2* oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992 ; 69 : 1237-1245.

**Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y.** An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem.* 2002 ; 277 : 34287-34294.

**Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 ; 65 : 55-63.

**Muir C, Waterhouse J, Mack T.** Cancer incidence in five continents. Vol V (IARC Scientific Publications n°88). Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1987.

**Murphy LD, Herzog E, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE.** Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry*. 1990 ; 29: 10351-10356.

**Muthumani K, Choo AY, Hwang DS, Chattergoon MA, Dayes NN, Zhang D, Lee MD, Duvuri U, Weiner DB.** Mechanism of HIV-1 viral protein R-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 ; 304 : 583-592.

**Murphy MD, Brand M.** Variable stoichiometry of proton pumping by mitochondrial respiratory chain. *Nature*. 1987 ; 329 : 170-172.

## N

**Nagata S.** Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997 ; 88 : 355-365.

**Najid A, Simon A, Cook J, Chable-Rabinovitch H, Delage C, Chulia AJ, Rigaud M.** Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. *FEBS*. 1992 ; 299 : 213-217.

**Nakagawa T, Yuan J.** Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. 2000a ; 150 : 887-894.

**Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J.** Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000b ; 403 : 98-103.

**Nakano K, Vousden KH.** PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 2001 ; 7 : 683-694.

**Nakazawa H, English Drandell PL, Nakazawa K, Martel N, Armstrong BK, Yamasaki H.** UV and skin cancer : Specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 ; 93 : 360-364.

**Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF.** The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*. 1994 ; 371 : 297-300.

**Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W.** Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease : to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol*. 2001 ; 22 : 21-26.

**Nicholson DW, Thornberry NA.** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*. 1997 ; 22 : 299-306.

**Nicholson DW.** Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1998; 6 : 1028-1042.

**North S, Hainaut P.** p53 and cell-cycle control : a finger in every pie. *Pathol Biol.* 2000; 48 : 255-270.

## O

**Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M.** Apoptotic death in epithelial cells : cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 1993; 12 : 3679-3684.

**Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N.** Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000 ; 288 : 1053-1058.

**Ohigashi A, Takamura H, Koshimizu K, Tokuda H, Ito Y.** Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein-Barr virus activation ; ursolic acid and oleanic acid from an anti-inflammatory chinese medicinal plant, *Glechoma hederaceae L.* *Cancer Let.* 1986 ; 30 : 143-151.

**Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Yamanaka T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Fujikawa K, Murata K, Nakano T.** Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest.* 2003 ; 83 : 1033-1043.

**Ondrey F, Harris JE, Anderson KM.** Inhibition of U937 eicosanoid and DNA synthesis by 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid, and inhibitor of arachidonic acid metabolism and its partial reversal by leukotriene C4. *Cancer Research.* 1989 ; 49 : 1138-1142.

**Ormerod MG, Collins MK, Rodriguez-Tarduchy G, Robertson D.** Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells. Quantification by two flow cytometric methods. *J Immunol Methods.* 1992 ; 153 : 57-65.

**Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, Radinsky R.** Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol.* 1995 ; 15 : 3032-3040.

**Oyadomari S, Araki E, Mori M.** Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells. *Apoptosis.* 2002 ; 7 : 335-345.

## P

**Pagliacci MC, Spinozzi F, Migliorati G, Fumi G, Smacchia M, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I.** Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial

reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. *Eur J Cancer* 1993 ; 29 : 1573-7.

**Paik KJ, Jeon SS, Chung HY, Lee KH, Kim KW, Chung JK, Kim ND.** Induction of differentiation of the cultured rat mammary epithelial cells by triterpene acids. *Arch Pharm Res.* 1998 ; 21 : 398-405.

**Parone PA, James D, Martinou, JC.** Mitochondria : regulating the inevitable. *Biochimie.* 2002 ; 84 : 105-111.

**Pellecuer J, Gal F, Temple A, Privat G.** Etude de la répartition des acides ursolique et oléanolique chez divers Ericacées, Oléacées, Caprifoliacées et Labiées de la région Languedocienne. *Bull Trav Soc Pharm Montpellier.* 1970 ; 30 : 167-172.

**Pellizzaro C, Coradini D, Daniotti A, Abolafio G, Daidone MG.** Modulation of cell cycle-related protein expression by sodium butyrate in human non-small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2001 ; 91: 654-657.

**Petit PX, Lecoœur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML.** Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol.* 1995 ; 130 : 157-67.

**Pieters R, Huismans DR, Loonen AH, Hahlen K, Van der Does-Van den Berg A, Van Wering ER, Veerman AJP.** Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet.* 1991 ; 338 : 399-403.

**Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C.** Can different genetic changes characterize histogenetic subtypes and biologic behavior in sporadic malignant melanoma of the skin? *Cell Mol Life Sci.* 2003 ; 60 : 1923-1932.

**Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Otes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA.** The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell.* 1998 ; 92 : 713-723.

**Power FB, Moore CW.** The constituents of olives leaves. *J Chem Soc.* 1910 ; WCVII : 1099.

**Prives C, Manley JL.** Why is p53 acetylated ? *Cell.* 2001 ; 107 : 815-818.

## Q

**Quere L, Wenger T, Schramm HJ.** Triterpenes as potential dimerization inhibitors of HIV-1 protease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 ; 227 : 484-488.

## R

**Raff MC.** Social controls on cell survival and death : an extreme view. *Nature*. 1992 ; 356 : 397-400.

**Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD.** Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*. 1993 ; 262 : 695-700.

**Rao L, Perez D, White E.** Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*. 1996 ; 135 : 1441-1455.

**Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*. 2001 ; 276 : 33869-33874.

**Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Peterson EP, Thornberry NA, Huang J, MacPherson DP, Black SC, Hornung F, Lenardo MJ, Hayden MR, Roy S, Nicholson DW.** Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ*. 1998 ; 5 : 271-288.

**Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G.** Mitochondria, the killer Organelles and their weapons. *J Cell Physiol*. 2002 ; 192 : 131-137.

**Reed RJ, Martin P.** Variants of melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 1997 ; 16 : 137-158.

**Recio MC, Giner R, Terencio M, Sanz M, Ríos JL.** Anti-inflammatory activity of *Helichrysum stoechas*. *Planta Medica*. 1991 ; 57 : 56-57.

**Recio MC, Giner R, Máñez S, Ríos JL.** Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med*. 1995 ; 61 : 182.

**Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J.** Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev*. 1995 ; 9 : 1831-1845.

**Rich T, Stephens R, Trowsdale J.** MHC linked genes associated with apoptosis/programmed cell death. *Biochem Soc Transactions*. 1999 ; 27 : 781-785.

**Rich T, Allen RL, Wyllie AH.** Defying death after DNA damage. *Nature*. 2000 ; 407 : 777-783.

**Ringbom T, Segura L, Noreen Y, Perera P, Bohlin L.** Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod*. 1998 ; 61 : 1212-1215.



**Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, Di Virgilio F, Pozzan T.** Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*. 2003 ; 22 : 8619-8627.

**Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV.** The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*. 1995 ; 83 : 1243-1252.

**Roush G, Shymura M, Holdford T.** Patterns of invasive melanoma in the connecticut tumor registry. *Cancer*. 1988 ; 61 : 2586-2595.

**Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC.** The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J*. 1997 ; 16 : 6914-6925.

**Rudel T, Bokoch GM.** Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*. 1997 ; 276 : 1571-1574.

**Runkle GP, Zaloznik AJ.** Malignant melanoma. *Am Fam Physician*. 1994 ; 49 : 91-98, 102-104.

**Ruzicka et al.** – *Helv. Chim Acta*. 1945 ; 28 : 199.

**Ryan KM, Phillips C, Vousden KH.** Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 ; 13 : 332-337.

**Ryu SY, Oak MH, Yoon SK, Cho DI, Yoo GS, Kim TS, Kim KM.** Anti-allergic and anti-inflammatory Triterpenes from the Herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Med*. 2000 ; 66 : 358-360.

## S

**Safayhi H, Rall B, Sailer E, Ammon H.** Inhibition of boswellic acids of human leucocyte elastase. *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997 ; 281 : 460-463.

**Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 ; 230 : 1350-1354.

**Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Manjeri A, Venkatachan M.B.** Apoptosis : definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*. 1999 ; 107 : 489-506.

**Sakaguchi K, Sakamoto H, Lewis MS, Anderson CW, Erickson JW, Appella E, Xie D.** Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry*. 1997 ; 36 : 10117-10124

**Sakahira H, Enari M, Nagata S.** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998 ; 391 : 96-99.

**Sakahira H, Enari M, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S.** Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr Biol.* 1999 ; 9 : 543-546.

**Salvesen GS, Dixit VM.** Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* 1997 ; 91 : 443-446.

**Salvesen GS, Dixit VM.** Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 ; 96 : 10964-10967.

**Sambrook JF.** The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 1990 ; 61 : 197-199.

**Samuelsson B.** Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.* 1983 ; 220 : 568-575.

**Sando CE.** Constituents of the wax-like coating on the surface of the apple. *J Biol Chem.* 1923 ; 56 : 457-468.

**Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM.** Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett.* 2001 ; 488 : 110-115.

**Saraswat B, Visen PKS, Dayal R, Agarwal DP, Patnaik GK.** Protective action of ursolic acid against chemical induced hepato-toxicity in rats. *Indian J Pharmacol.* 1996 ; 28 : 232-239.

**Saraswat B, Visen PK, Agarwal DP.** Ursolic acid isolated from *Eucalyptus tereticornis* protects against ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. *Phytother Res.* 2000 ; 14 : 163-166.

**Sattar A, Bankova V, Kujumgiev A, Galabov A, Ignatova A, Todorova C, Popov S.** Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants. *Pharmazie.* 1995 ; 50 : 62-65.

**Savill J, Fadok V.** Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000 ; 407 : 784-788.

**Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME.** Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998 ; 17 : 1675-1687.

**Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME.** Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem.* 1999 ; 274 : 22532-22538.

**Schanenstein E & Hoffer-Bergthaler E.** Cytospectrometric determination of the succinodehydrogenase activity in isolated cells with MTT reagent. *Mantshefte für Chemie.* 1972 ; 266 : 261-267.

**Schlesinger M, Jiang JD, Roboz JP, Denner L, Ling YH, Holland JF, Bekesi JG.** 3-m-bromoacetyl amino benzoic acid ethyl ester: a new cancericidal agent that activates the apoptotic pathway through caspase-9. *Biochem Pharmacol.* 2000 ; 6 : 1693-1702.

**Schuler M, Green DR.** Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2001 29 : 684-688.

**Schwartz RA, Birnkrant AP, Rubenstein DJ, Kim U, Burgess GH, Stoll HL Jr, Chai SW, Southwick GJ, Milgrom H.** Squamous cell carcinoma in dominant type epidermolysis bullosa dystrophica. *Cancer.* 1981 ; 47 : 615-620.

**Seite S, Colige A, Piquemal-Vivenot P, Montastier C, Fourtanier A, Lapiere C, Nusgens B.** A full-UV spectrum absorbing daily use cream protects human skin against biological changes occurring in photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2000 ; 16 : 147-155.

**Selliah N, Finkel TH.** Biochemical mechanisms of HIV-induced T-cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001; 8 : 127-136.

**Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ.** Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta.* 2004 ; 1644 : 107-113.

**Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, Wu GS, Amundson S, Brooks KS, Fornace AJ Jr, el-Deiry WS.** p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 1998 ; 58 : 1593-1598.

**Sherr CJ.** Cancer cell cycles. *Science.* 1996 ; 274 : 1672-1677.

**Sherr CJ & Roberts JM.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999 ; 13 : 1501-1512.

**Shi Y.** Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure (Camb).* 2002; 10 : 285-288.

**Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C.** DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997 ; 91: 325-334.

**Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB.** Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res.* 2003 ; 63 : 4375-4383

**Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV.** Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*. 1997 ; 6 : 751-763.

**Shukla B, Visen PKS, Patnaik GK, Tripathi SC, Srimal RC, Dayal R, Dobhal PC.** Hepatoprotective activity in the rat of ursolic acid isolated from *Eucalyptus* hybrid. *Phytotherapy Res*. 1992 ; 6 : 74-79.

**Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB.** DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*. 1997 ; 11 : 3471-3481.

**Simon A, Delage C, Saux M, Chulia AJ, Najid A, Rigaud M.** Structure of ursolic acid and ethanol solvate. *Acta Cryst*. 1992a ; 48 : 726-728.

**Simon A, Najid A, Chulia AJ, Delage C, Rigaud M.** Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochim Biophys Acta*. 1992b ; 1125 : 68-72.

**Slater TF, Sawyer B, Strauly U.** Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta*. 1963 ; 77 : 383-393.

**Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ.** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*. 1999 ; 144 : 281-292.

**Smith CA, Farrah T, Goodwin RG.** The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins : activation, costimulation, and death. *Cell*. 1994 ; 76 : 959-962.

**Smith ML, Kontny HU, Zhan Q, Sreenath A, O'Connor PM, Fornace AJ Jr.** Antisense GADD45 expression results in decreased DNA repair and sensitizes cells to u.v.-irradiation or cisplatin. *Oncogene*. 1996 ; 13 : 2255-2263.

**Snyder DS, Castor R, Desforges JF.** Antiproliferative effects of lipoxygenase inhibitors on malignant human hemopoietic cell lines. *Exp Hematol*. 1986 ; 17 : 6-9.

**Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW.** Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*. 2001 ; 409 : 207-211.

**Sok J, Wang XZ, Batchvarova N, Kuroda M, Harding H, Ron D.** CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol Cell Biol*. 1999 ; 19 : 495-504.

**Srinivasula SM, Ahmad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S, Wang Y, Fernandes-Alnemri T, Croce CM, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES.** FLAME-1, a novel

FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997 ; 272 : 18542-18545.

**Stennicke HR, Salvesen GS.** Caspase assays. *Methods. Enzymol.* 2000 ; 322 : 91-100.

**Strange R, Metcalfe T, Thackray L, Dang M.** Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development. *Microsc Res Tech.* 2001 ; 52 : 171-181.

**Stuppia L, Gobbi P, Zamai L, Palka G, Vitale M, Falcieri E.** Morphometric and functional study of apoptotic cell chromatin. *Cell Death Differ.* 1996 ; 3 : 397-405.

**Subbaramaiah K, Michaluart P, Sporn MB, Dannenberg AJ.** Ursolic acid inhibits Cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2000 ; 60 : 2399-2404.

**Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G.** Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med.* 1996 ; 184 : 1331-1342.

**Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer G.** The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1997 ; 186 : 25-37.

**Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G.** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999a ; 397 : 441-446.

**Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G.** Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med.* 1999b ; 189 : 381-394.

**Susplugas J, Susplugas P, Gal F, Taillade R.** Dosage spectrophotométrique de l'acide ursolique dans des extraits d'*Erica Scoparia* L. et de l'acide oléanolique dans des extraits d'*Olea Europaea* L. *Bull Trav Soc Pharm Montpellier.* 1970 ; 30 : 249-254.

**Szmit E, Trzonkowski P, Mysliwska J, Foester J, Mysliwski A.** Ex vivo apoptotic potential of peripheral blood mononuclear cells of the elderly human subject. *Cell Biol Int.* 2002 ; 26 : 517-27.

## T

**Taniguchi S, Imayoshi Y, Kobayashi E, Takamatsu Y, Ito H, Hatano T, Sakagami H, Tokuda H, Nishino H, Sugita D, Shimura S, Yoshida T.** Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry.* 2002 ; 59 : 315-323.

**Teyssier F, Bay JO, Dionet C, Verrelle P.** Régulation du cycle cellulaire des cellules exposées aux radiations ionisantes. *Bull Cancer.* 1999 ; 4 : 345-357.

**Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM.** Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 1995 ; 81 : 801-809.

**Thomas L, Tranchard P, Berard F.** Semiological value of ABCDE criteria in the diagnosis of cutaneous pigmented tumors. *Dermatology.* 1998 ; 197 : 11-17.

**Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995 ; 267 : 1456-1462.

**Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW.** A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997a ; 272 : 17907-17911.

**Thornberry NA, Rosen A, Nicholson DW.** Control of apoptosis by proteases. *Adv Pharmacol.* 1997b ; 41 : 155-177.

**Thornberry NA, Chapman KT, Nicholson DW.** Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Methods Enzymol.* 2000 ; 322 : 100-110.

**Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K, Ito Y.** Inhibitory effects of ursolic and oleanic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Let.* 1986 ; 33 : 279-285.

**Trumbull ER, Bianchi E, Eckert DJ, Wiedhope RM, Cole JR.** Tumor inhibitory agents from *Vanquelinia corymbosa* (Rosaceae). *J Pharm Sci.* 1976 ; 65 : 1407-1408.

**Tsujimoto Y, Croce CM.** Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 ; 83 : 5214-5218.

**Tsujimoto Y.** Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol.* 2003 ; 195 : 158-167.

**Tsuruga T, Chun Y, Ebizuka Y, Sankawa U.** Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. *Chem Pharm Bull.* 1991 ; 39 : 3276-3278.

**van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P.** Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 ; 304 : 487-497.

**van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenabeele P.** The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 2002 ; 9 : 20-26.

**van Weelden H, van der Putte SC, Toonstra J, van der Leun JC.** Ultraviolet B-induced tumors in pigmented hairless mice, with an unsuccessful attempt to induce cutaneous melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1990 ; 7 : 68-72.

**Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB.** Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell.* 1999 ; 3 : 159-167.

**Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D.** Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* 1998 ; 9 : 267-276.

**Vayssiere JL, Petit PX, Risler Y, Mignotte B.** Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 ; 91 : 11752-11756.

**Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L.** The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J.* 1998 ; 17 : 4668-4679.

**Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermer H, Toonen RF, Hammer RE, van der Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Südhof TC.** Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science.* 2000 ; 287 : 864-869.

**Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL.** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000 ; 102 : 43-53.

**Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P.** Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 ; 96 : 21-34.

**Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks D, Monks A, Pittman A, Boyd MR.** Tetrazolium-based assays for cellular viability : A critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991 ; 51 : 2515-2520.

## W

**Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B.** p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 1995 ; 55 : 5187-5190.

**Wang AM, Doyle MV, Mark DF.** Quantification of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 ; 86: 9717-9721.

**Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinzner H, Sanjay A, Mi LJ, Boorstein R, Kreibich G, Hendershot LM, Ron D.** Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol.* 1996 ; 16 : 4273-4280.

**Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr.** NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 1998 ; 281 : 1680-1683.

**Wei MC, Lindsen T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ.** Bid, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes Bak to release cytochrome c. *Genes Dev.* 2001 ; 14 : 2060-2071.

**Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MC.** Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol.* 1996 ; 133 : 1053-1059.

**Welihinda AA, Tirasophon W, Kaufman RJ.** The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr.* 1999 ; 7 : 293-300.

**Wersto RP, Chrest KJ, Leary JF, Morriss C, Stetler-Stevenson MA, Gabrielson E.** Doublet discrimination in DNA cell-cycle analysis. *Cytometry.* 2001 ; 46: 296-306.

**Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT.** Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem.* 2001 ; 276 : 48404-48409.

**Whitaker NJ, Bryan TM, Bonnefin P, Chang AC, Musgrove EA, Braithwaite AW, Reddel RR.** Involvement of RB-1, p53, p16INK4 and telomerase in immortalisation of human cells. *Oncogene.* 1995 ; 11 : 971-976.

**Wyllie AH.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980; 284 : 555-556.

**Wyllie A.** Apoptosis. An endonuclease at last. *Nature.* 1998 ; 391 : 20-21.

## X



**Xu HX, Zeng FQ, Wan M, Sim KY.** Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J Nat Prod.* 1996 ; 59 : 643-645.

## Y

**Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X.** Prevention of apoptosis by Bcl-2 : release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997 ; 27 : 1129-1132.

**Yarosh DB, Both D, Brown D.** Liposomal ursolic acid (merotaine) increases ceramides and collagen in human skin. *Horm Res.* 2000 ; 4 : 318-321.

**Ye H, Candé C, Stephanou NC., Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H.** DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol.* 2002 ; 9 : 680-684.

**Ying QL, Rinehart AR, Simon SR, Cheronis JC.** Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes. *Biochem J.* 1991 ; 277 : 521-526.

**Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M.** Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem.* 2001 ; 276 : 13935-13940.

**Yu SP, Yeh CH, Sebsi SL, Gwag BJ, Canzoniero LMT, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan LL, Choi DW.** Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science.* 1997 ; 278 : 114-117.

**Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L.** PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 ; 100 : 1931-1936.

**Yuan XM, Li W, Dalen H, Lotem J, Kama R, Sachs L, Brunk UT.** Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 ; 99 : 6286-6291.

## Z

**Zaletova N, Shchavlinskii A, Tolkachev O, Vichkanova S, Fateeva T, Krutikova N, Yartseva I, Klyuev N.** Preparation of some derivatives of ursolic acid and their antimicrobial activity. *Chemical Abstracts.* 1987 ; 106 : 18867<sup>c</sup>.

**Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G.** Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 1996 ; 183 : 1533-1544.

**Zamzami N, Kroemer G.** The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nature reviews. Mol Cell Biol.* 2001 ; 2 : 67-71.

**Zhan Q, Carrier F, Fornace AJ Jr.** Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol Cell Biol.* 1993 ; 13 : 4242–4250.

**Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T.** Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene.* 1999 ; 18 : 1131-1138.

**Zhang HG, Wang J, Yang X, Hsu HC, Mountz JD.** Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene.* 2004 ; 23 : 2009-2015.

**Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, Halperin AJ, Baden HP, Shapiro PE, Bale AE, Brash DE.** Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 ; 90 : 4216-4220.

**Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR.** The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 2001 ; 92 : 57-70.

**Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB.** Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.* 2003 ; 162 : 59-69.

**Zuliani T, Duval R, Jayat C, Schnebert S, Andre P, Dumas M, Ratinaud MH.** Sensitive and reliable JC-1 and TOTO-3 double staining to assess mitochondrial transmembrane potential and plasma membrane integrity: interest for cell death investigations. *Cytometry.* 2003 ; 54 : 100-108.

# **ABBREVIATIONS**

## A

Abs : Absorbance  
Ac : Anticorps  
Ac-DEVD-AMC : acetyl-[DEVD]-7-amino-4-methylcoumarin  
Ac-DEVD-CHO : acetyl-[DEVD]-aldéhyde  
Ac-IETD-AMC : acetyl-[IETD]-7-amino-4-methylcoumarin  
Ac-IETD-CHO : acetyl-[IETD]-aldéhyde  
Ac-LEHD-AMC : acetyl-[LEHD]-7-amino-4-methylcoumarin  
Ac-LEHD-CHO : acetyl-[LEHD]-aldéhyde  
Ac-YVAD-AMC : acetyl-[YVAD]-7-amino-4-methylcoumarin  
Ac-YVAD-CHO : acetyl-[YVAD]-aldehyde  
ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire  
ADP : Adénosine Di-Phosphate  
AIF : « Apoptosis Inducing Factor »  
Akt : « serine/threonine protein kinase »  
AMC : « 7-amino-4-methylcoumarin »  
ANT : « Adenine Nucleotide Translocator »  
AP-1 : « Activator protein-1 », facteur de transcription  
APAF-1 : « Apoptosis Protein Activating Factor »  
Apo2L : « Apo2 Ligand »  
APR : « ATL-derived PMA-responsive peptide » ou NOXA  
ARF : Alternate Reading Frame  
ARN : Acide Ribonucléique  
ARNt : ARN totaux  
ARNm : ARN messenger  
ATM-K : « *Ataxia Telanglectasia Mutated Kinase* »  
ATP : Adénosine Tri-Phosphate

## B

Bad : « Bcl-X<sub>L</sub>/bcl-2 associated death promoter homolog »  
Bak : « Bcl-2 homologous antagonist/killer »  
Bax : « Bcl-2 associated X protein »  
Bcl-2 : « B cell lymphoma leukemia »  
Bcl-x : « Bcl-2 homolog X protein from avian lymphocyte development »  
Bcl-x<sub>L</sub> : « longer alternatively spliced form of Bcl-x »  
Bcl-x<sub>S</sub> : « shorter alternatively spliced form of Bcl-x »  
BET : Bromure d'éthidium  
BH : « Bcl-2 Homology »  
Bid : « BH3 interacting death domain agonist »  
Bik : « Bcl-2 interacting killer »  
Bim : « Bcl-2 interacting mediator of cell death »  
BIR : « Baculovirus IAP Repeat »  
Bmf : « a BH3 only protein »  
BSA : « Bovin Serum Albumin », albumine sérique bovine  
BT : « Blue Trypan », coloration au bleu trypan

## C

C : Cytosine  
C-ter : Extrémité d'une protéine portant la fonction acide (-COOH)  
*C. elegans* : *Caenorhabditis elegans*  
CAD : « Caspase-Activated Dnase »  
CAK : « CDK Activating Kinase »  
Calpain : cytosolic calcium-activated neutral cysteine endopeptidase  
cAMP : « cyclic Adnin MonoPhosphate »  
CARD : « Caspase Recruitment Domain »  
Caspase : « Cysteine Aspartate Protease »  
CDK : « Cyclin-Dependant protein Kinase »  
*Ced* : *C. elegans death genes*  
Chr : chromosome (p=bras court, q=bras clong)

cIAP : « cellular-IAP »  
CIP : « CDK Inhibitor Protein » ?  
CK II : « Casein Kinase II »  
CKI : « CDK Inhibitor »  
COX-2 : « Cyclooxygénase 2 »  
CREB : « CRE-binding protein »  
CRE : « cAMP response element »  
Cyp D : « Cyclophiline D »  
Cyt C : « Cytochrome c »

## **D**

DD : « Death Domain », domaine de mort  
DED : « Death Effector Domain », domaine effecteur de mort  
DEPC : DiEthylPyroCarbonate  
DEV D : Asparate-Glutamate-Valine-Aspartate  
DFF : « DNA Fragmentation Factor »  
Diablo : « direct IAP binding protein with low pI »  
DICC50 : Dose infectant à 50% les cellules en culture  
DISC : « Death-Inducing-Signaling-Complex »  
D-MEM : « Dulbecco's modified Eagle's medium », milieu minimum essentiel Dulbecco's modification de Eagle  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DNA : « Deoxyribonucleic Acid »  
DNA-PK : « DNA Protein Kinase »  
DNase : désoxyribonucléase  
dNTP : désoxynucléotides triphosphates  
dATP : désoxyadénosine triphosphates  
dCTP : désoxycytidine triphosphates  
dGTP : désoxyguanosine triphosphates  
dTTP : désoxythymidine triphosphates  
DR : « Death Receptor »  
DTT : Dithiothreitol  
 $\Delta$ pH : gradient de pH  
 $\Delta\Psi$  : potentiel de membrane

## **E**

EBV : « Epstein-Barr virus », virus Epstein Barr  
EDTA : « Ethylenediaminetetraacetic acid », Acide éthylène diamine tétra-acétique  
E2F : Facteur de transcription de la protéine rétinoblastome  
ELISA : « Enzyme linked immuno-sorbent assay »  
Endo G : « Endonucléase G »

## **F**

FADD : « Fas Associated Death Domain protein »  
FasL : « Fas Ligand »  
FITC : Fluorescéine IsoThioCynate  
FITC-VAD-FMK : Fluoresceine IsoThioCynate-(Valine-Alanine-Aspartate)-FluoroMethylKetone  
FLICE : « FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme »  
FLIP : « FLICE Inhibitory Protein »  
FMK : « FluoroMethylKetone », fluoro-méthyl cétone

## **G**

g : unité de gravité  
GADD45 : « Growth-Arrest DNA-Damage »  
Gag : « group-specific antigen »

## **H**

HBSS : « Hank's Balanced Salin Salt »  
HCl : Hydrochlorure ou Chlorure d'hydrogène  
HEPES : acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique]

HIV : « Human Immunodeficiency Virus », VIH  
HK : « Hexokinase »  
HLE : « Human Leucocyte Elastase »  
HRP : « horseradish peroxydase »  
Hsp 70 : « Heat Shock Protein »  
HSV : « Herpes Simplex Virus »  
HtrA2 : « High Temperature Requirement protein A2 » ou Omi

## I

IAP : « Inhibitor of Apoptosis Proteins »  
ICAD : « Inhibitor of Caspase-Activated DNase »  
ICE : « IL-1 $\beta$ - Converting Enzyme »  
IETD : Isoleucine-Glutamate-Thréonine-Aspartate  
IFN : Interféron  
I- $\kappa$ B kinase : « Inhibitor of NF-kappaB Kinase »  
IL : interleukine  
IMP : Intermembrane Mitochondrial Protein  
INK4 : « Inhibiteur de CDK4 »  
IRF : « Intensité Relative de fluorescence »

## J

JNK : « c-jun N-terminal kinase »

## K

kb : kilobases ou kpb : Kilo paires de base  
kDa : kilo Dalton  
KIP : « Key Intermediary Protein » ?

## L

LEHD : Leucine-Glutamate-Histidine-Aspartate  
LMM : « Lentigo Maligna Melanoma »

## M

mA : milliampère  
MAPK : « Mitogen-Activated Protein Kinase »  
Mcl-1 : ML-1 human myeloid leukemia cell line  
MCP : Mort Cellulaire Programmée  
MDM2 : « Murine Double Minute 2 » ou HDM2 : « Human Double Minute 2 »  
ME : Membrane Externe »  
MEM Eagle's : Eagle's Minimum Essential Medium 25 mM Hepes  
MGG : May-Grünwald Giemsa  
MI : Membrane Interne »  
MMP : « Mitochondrial Membrane Permeability »  
MMPs : « Matrice MetalloProteinase »  
MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide

## N

N-ter : Extrémité d'une protéine portant la fonction amine (NH<sub>2</sub>-)  
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée)  
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)  
NDGA : « NorDihydroGuaiarétique Acide »  
NES : « Nuclear Export Signal »  
NF- $\kappa$ B : « Nuclear Factor-Kappa B », facteur nucléaire - $\kappa$ B »  
NLS : « Nuclear Localization Signal »  
NM : « Nodular Melanoma »  
NOXA : « BH3-only member of the Bcl-2 family »

## O

Omi : « HtrA2 »

## **P**

PAF : paraformaldéhyde  
PAK-2 : « P21 Activated Kinase-2 »  
PARP : Poly-ADP Ribose-Polymerase  
pb : paires de base  
PBS : « Phosphate Buffer Saline », tampon phosphate salin  
PCAF : « p300/CBP Associated Factor »  
p300/CBP : « CREB Binding Protein »  
PCNA : « Proliferating Cell Nuclear Antigen »  
PCR : « Polymerisation Chain Reaction », Réaction de Polymérisation en Chaîne  
PKC : « Protein Kinase C »  
pNa : *p*-nitroanilide  
Pol : « Polymerase »  
pRb : « retinoblastoma tumours suppressor protein »  
PTPC : « Pores Transition Permeability Complex »  
PUMA : « P53-Upregulated Modulator of Apoptosis »

## **R**

RAIDD : « RIPK1 Domain containing Adapter with DD »  
Rb : « Retinoblastoma »  
RE : Réticulum Endoplasmique  
RIP : « Receptor Interacting Protein »  
RIPK : « RIP kinase »  
ROS : « Reactive Oxygen Species »  
RPA : « Replicon Protein A »  
RT : « Reverse Transcription »  
RTase : « Reverse Transcriptase »

## **S**

SDS : « Sodium-Dodecyl-Sulfate »  
SDS-PAGE : « Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis »  
sIMP : soluble Intermembrane Mitochondrial Protein  
Smac : « Second mitochondria-derived activator of caspase »  
SSM : « Superficial Spreading Melanoma »  
SVF : Sérum de Veau Fœtal

## **T**

T : Thymine  
TAE : « Tris-Acétate-EDTA »  
Tat : « trans activator of transcription », protéine trans-activatrice  
TBP : « Tata Binding Protein-TAFs »  
TBS : Tris-Buffered-Salt  
T<sub>m</sub> : Température de fusion  
TFIID : « Transcription Factor II D »  
TFIIH : « Transcription Factor II H »  
TGF : « Transforming Growth Factor »  
TNF $\alpha$  : « Tumor Necrosis Factor alpha »  
TNF-R : « Tumor Necrosis Factor-Receptor »  
TPA : « 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate »  
TRADD : « TNF-Receptor Associated Death Domain protein »  
TRAF-2 : « TNF-R Associated Factor-2 »  
TRAIL : « Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand »  
Tris : « Tris-HCl »  
TWEAK : « TNF-related weak inducer of apoptosis »

## **U**

UA : « Ursolic Acid » Acide ursolique  
URF : Unité Relative de Fluorescence  
UV : Ultraviolet

**V**

VAD : Valine-Alanine-Aspartate

VDAC : « Voltage Dependent Anion Channel »

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH-1 : « virus de l'immunodéficience humaine de type 1 »

**W**

WAF1 : « Wild-type p53-Activated Fragment 1 »

**X**

XIAP : « X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein »

**Y**

YVAD : Tyrosine-Valine-Alanine-Aspartate

**Z**

z-VAD-FMK : benzoxycarbonyl-[VAD]-Fluoromethylketon



## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>12</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE I : L'ACIDE URSOLIQUE .....</b>	<b>16</b>
I. HISTORIQUE.....	17
II. DISTRIBUTION DANS LE RÈGNE VÉGÉTAL .....	17
III. PRINCIPAUX EFFETS BIOLOGIQUES .....	18
III.1. Effet anti-bactérien et anti-fongique.....	18
III.2. Effet anti-viral .....	19
III.3. Effet hépatoprotecteur.....	20
III.4. Effet anti-inflammatoire .....	20
III.5. Effet anti-tumoral .....	21
III.6. Effet anti-prolifératif.....	22
III.7. Effet pro-apoptotique.....	23
IV. TRAVAUX EFFECTUÉS AU SEIN DU LABORATOIRE.....	24
<b>CHAPITRE II : LA PEAU, LES TUMEURS ET LES LIGNÉES ÉTUDIÉES .....</b>	<b>26</b>
I. LA PEAU.....	27
I.1. Description.....	28
I.1.1. L'épiderme.....	28
I.1.2. Le derme .....	31
I.1.3. L'hypoderme .....	34
I.2. Agression solaire.....	34
II. LES TUMEURS .....	36
II.1. Les carcinomes .....	36
II.2. Les mélanomes.....	37
II.2.1. Epidémiologie.....	38
II.2.2. Evolution .....	41
II.2.3. Différentes sortes de mélanomes malins .....	42
II.2.4. Grains de beauté et mélanomes malins .....	43
II.2.4.1. Apparences d'un mélanome.....	43
II.2.4.2. Détection d'un mélanome .....	44
III. LES LIGNÉES ÉTUDIÉES.....	45
III.1. Lignée HaCaT .....	45
III.1.1. Création de la lignée HaCaT : Processus d'immortalisation.....	45
III.1.1.1. Immortalisation spontanée par altérations génétiques .....	46
III.1.1.2. Immortalisation <i>via</i> des mutations sur p53 induites par UV .....	46
III.1.1.3. Immortalisation <i>via</i> l'inactivation des télomères.....	47
III.1.2. Intérêts de la lignée cellulaire HaCaT.....	48
III.2. Lignée M4Beu.....	49
<b>CHAPITRE III : L'APOPTOSE .....</b>	<b>50</b>
I. DIFFÉRENTS TYPES DE MORT CELLULAIRE : NÉCROSE ET APOPTOSE .....	52
I.1. Nécrose.....	52
I.2. Apoptose.....	52
II. IMPORTANCE DU PROCESSUS APOPTOTIQUE.....	53
II.1. Rôle physiologique.....	53
II.2. Apoptose et pathologies .....	55
III. MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES CARACTÉRISTIQUES DE L' APOPTOSE .....	57
III.1. Cytoplasme .....	57
III.2. Organites intracellulaires.....	58
III.3. Noyau.....	58
III.4. Membrane cytoplasmique.....	59
IV. PHASES ET MÉCANISMES GÉNÉRAUX DE L' APOPTOSE.....	60
IV.1. Phase d'initiation.....	64
IV.1.1. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort .....	64
IV.1.1.1. Le récepteur de mort TNF-R et son ligand TNF $\alpha$ (ou TNF).....	65
IV.1.1.1.1. Voie médiée par le récepteur TNF-R1 .....	66
IV.1.1.1.2. Voie médiée par le récepteur TNF-R2 .....	69
IV.1.1.2. Le récepteur de mort Fas/CD95 et son ligand FasL/CD95L .....	70
IV.1.1.3. Le récepteur de mort TRAIL-R et son ligand TRAIL .....	72

IV.1.2. Voie intrinsèque ou voie mitochondriale.....	73
IV.1.2.1. Fonctions physiologiques de la mitochondrie dans la cellule.....	73
IV.1.2.2. Rôle de la mitochondrie dans le processus apoptotique.....	75
IV.1.2.2.1. Potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	76
IV.1.2.2.2. Perméabilisation des membranes mitochondriales.....	77
IV.1.2.2.3. Libération des molécules apoptogènes.....	80
<i>IV.2. Phase de régulation des voies intrinsèque et extrinsèque, par les protéines membres de la famille Bcl-2.....</i>	<i>87</i>
IV.2.1. Structure des protéines membres de la famille Bcl-2.....	87
IV.2.2. Mécanismes d'action des protéines membres de la famille Bcl-2.....	89
<i>IV.3. Phase d'exécution par les caspases.....</i>	<i>92</i>
IV.3.1. Classification et structure des caspases.....	92
IV.3.1.1. Classification.....	93
IV.3.1.2. Structure.....	96
IV.3.1.3. Caspases initiatrices / caspases effectrices.....	98
IV.3.2. Activation et régulation des caspases.....	100
IV.3.2.1. Mécanismes d'activation.....	100
IV.3.2.2. Mécanismes de régulation.....	102
IV.3.3. Substrats des caspases.....	103
IV.3.3.1. Substrats cellulaires naturels.....	103
IV.3.3.2. Substrats de synthèse.....	106
IV.3.4. Inhibiteurs des caspases.....	107
IV.3.4.1. Inhibiteurs cellulaires naturels.....	107
IV.3.4.2. Inhibiteurs de synthèse.....	109
<i>IV.4. Autres mécanismes régulant l'apoptose.....</i>	<i>110</i>
IV.4.1. Apoptose caspase indépendante.....	110
IV.4.2. Implication du réticulum endoplasmique dans l'apoptose.....	112
IV.4.3. Suppresseur de tumeur p53 et apoptose.....	115
IV.4.3.1. Généralités.....	116
IV.4.3.1.1. Structure de la protéine p53.....	116
IV.4.3.1.2. Régulation de la protéine p53.....	117
IV.4.3.2. Fonctions de p53 : arrêt du cycle cellulaire et/ou apoptose.....	120
IV.4.3.2.1. Le cycle cellulaire.....	120
1. Généralités.....	120
2. p53 : arrêt du cycle cellulaire et molécules impliquée.....	123
3. p21 et apoptose.....	126
<b>IV.4.3.2.2. p53 et apoptose.....</b>	<b>127</b>
<b>MATERIEL &amp; METHODES.....</b>	<b>130</b>
I. ACIDE URSOLIQUE.....	131
II. CULTURE CELLULAIRE.....	131
II.1. Lignées cellulaires.....	131
II.1.1. Lignée cellulaire HaCaT.....	131
II.1.2. Lignée cellulaire M4Beu.....	133
II.2. Conditions de culture des lignées cellulaires étudiées.....	133
II.2.1. Matériel.....	133
II.2.2. Milieux de culture.....	133
II.2.3. Ensemencement cellulaire.....	134
II.2.4. Entretien cellulaire.....	134
III. TECHNIQUES D'ÉTUDE DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE.....	136
III.1. Technique d'exclusion du bleu trypan.....	136
III.1.1. Principe.....	136
III.1.2. Protocole opératoire.....	136
III.2. Technique du MTT.....	136
III.2.1. Principe.....	136
III.2.2. Protocole opératoire.....	137
IV. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX (CMF).....	138
IV.1. Principe.....	138
IV.2. Protocole opératoire.....	138
IV.2.1. Fixation des cellules.....	138
IV.2.2. Marquage du contenu en ADN de la cellule.....	139
IV.2.3. Analyse.....	139
V. ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARN MESSAGERS PAR LA TECHNIQUE DE RÉTROTRANSCRIPTION - RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (RT-PCR).....	141
V.1. Principe.....	141

V.2. Protocole opératoire .....	143
V.2.1. Extraction et dosage des ARN totaux au TRIzol .....	143
V.2.1.1. Principe d'extraction .....	143
V.2.1.2. Technique d'extraction .....	144
V.2.1.3. Dosage des ARN totaux .....	144
V.2.2. Transcription inversée ou Rétrotranscription (RT) .....	145
V.2.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	145
V.2.4. Visualisation de l'ADN par électrophorèse .....	148
VI. ETUDE <i>IN SITU</i> DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE .....	149
VI.1. Principe .....	149
VI.2. Protocole opératoire.....	150
V.2.1. Fixation des cellules .....	150
V.2.2. Perméabilisation des cellules .....	151
V.2.3. Blocage des sites antigéniques des protéines .....	151
V.2.4. Immunomarquage avec anticorps primaire .....	151
V.2.5. Immunomarquage avec anticorps secondaire .....	151
V.2.6. Observation au microscope à fluorescence .....	151
VII. ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR LA TECHNIQUE DE "WESTERN BLOT" .....	153
VII.1. Principe .....	153
VII.2. Protocole opératoire .....	155
VII.2.1. Lyse et extraction des protéines totales .....	155
VII.2.2. Dosage protéique de l'extrait cellulaire .....	155
VII.2.3. Préparation et dénaturation des échantillons protéiques.....	156
VII.2.4. Electrophorèse : migration des protéines sur gel polyacrylamide .....	156
VII.2.5. Transfert sur membrane de PVDF ou sur membrane de nitrocellulose .....	157
VII.2.6. Marquage par immunofluorescence de la membrane de transfert avec les anticorps primaire et secondaire .....	158
VII.2.7. Révélation par réaction de chimiluminescence .....	159
VIII. MISE EN ÉVIDENCE DES ACTIVITÉS CASPASES PAR MARQUAGE <i>IN SITU</i> À L'AIDE DU MARQUEUR FITC-VAD-FMK .....	160
VIII.1. Principe.....	160
VIII.2. Protocole opératoire.....	162
IX. ETUDE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES CASPASES : DOSAGE PAR SPECTROFLUOROMÉTRIE .....	162
IX.1. Principe .....	163
IX.2. Protocole opératoire.....	164
IX.2.1. Lyse cellulaire .....	164
IX.2.2. Dosage protéique par la méthode de Bradford .....	164
IX.2.3. Dosage des activités enzymatiques des caspases.....	165
IX.2.3.1. Etalonnage et préparation des échantillons.....	165
IX.2.3.2. Mesure de l'activité enzymatique des caspases .....	166
X. ETUDE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL, EN CYTOMÉTRIE DE FLUX, PAR UN DOUBLE MARQUAGE (TOTO-3 / JC-1) ET EN MICROSCOPIE À FLUORESCENCE PAR UN MARQUAGE <i>IN SITU</i> (JC-1).....	167
X.1. Analyse en cytométrie de flux du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par un double marquage TOTO-3 / JC-1.....	169
X.1.1. Principe.....	169
X.1.1.1. Fluorochrome TOTO-3 .....	169
X.1.1.2. Fluorochrome JC-1.....	170
X.1.2. Protocole opératoire.....	171
X.2. Etude <i>in situ</i> du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par simple marquage avec la sonde JC-1 : observation en microscopie à fluorescence.....	172
X.2.1. Principe.....	173
X.2.2. Protocole opératoire.....	173
XI. STATISTIQUES .....	173
<b>RESULTATS.....</b>	<b>174</b>
<b>CHAPITRE I : LIGNÉE CELLULAIRE HACAT.....</b>	<b>175</b>
I. EVALUATION DU POTENTIEL ANTI-PROLIFÉRATIF DE L'ACIDE URSOLIQUE .....	175
I.1. Technique du MTT .....	175
I.2. Technique du bleu trypan.....	177
I.3. Etude comparative de la viabilité des cellules HaCaT en présence d'acide ursolique. Techniques du MTT et du bleu trypan. ....	178
II. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES HACAT, PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX.....	179
II.1. Etude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.....	179

II.2. Mise en évidence d'une population cellulaire apoptotique : présence d'un pic sub-G1 .....	180
III. PROTÉINES P53 ET P21. ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARNm ET DES PROTÉINES .....	182
III.1. Etude de p53.....	182
III.1.1. Expression de l'ARNm de p53 .....	183
III.1.2. Expression de la protéine de p53.....	184
III.1.2.1. Expression de p53 par la technique Western Blot .....	184
III.1.2.2. Activation de p53 par immunofluorescence indirecte .....	185
III.2. Etude de p21.....	186
III.2.1. Expression de l'ARNm de p21 .....	186
III.2.2. Expression de la protéine p21.....	187
III.2.2.1. Expression de p21 par la technique Western Blot .....	187
III.2.2.2. Expression de p21 par immunofluorescence indirecte.....	188
IV. ETUDE DU PROCESSUS APOPTOTIQUE DÉPENDANT DE L'ACTIVATION DES CASPASES .....	191
IV.1. Etude de l'activation des caspases par marquage <i>in situ</i> des cellules HaCaT à l'aide du substrat-inhibiteur de caspases FITC-VAD-FMK.....	191
IV.2. Etude des activités caspases .....	194
IV.2.1. Etude de la caspase-3 .....	194
IV.2.1.1. Expression de l'ARNm de la caspase-3 .....	194
IV.2.1.2. Activité enzymatique de la caspase-3.....	195
IV.2.2. Etude de la caspase-1 .....	198
IV.2.2.1. Expression de l'ARNm de la caspase-1 .....	198
IV.2.2.2. Activité enzymatique de la caspase-1.....	199
IV.2.3. Etude de la caspase-8 .....	200
IV.2.3.1. Expression de l'ARNm de la caspase-8 .....	200
IV.2.3.2. Activité enzymatique de la caspase-8.....	201
IV.2.4. Etude de la caspase-9 .....	203
IV.2.4.1. Expression de l'ARNm de la caspase-9 .....	203
IV.2.4.2. Activité enzymatique de la caspase-9.....	204
IV.2.5. Etude comparative de l'activité enzymatique des caspases étudiées .....	205
V. ETUDE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ( $\Delta\Psi$ M) .....	207
V.1 Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial par marquage <i>in situ</i> avec le fluorochrome JC-1 .....	207
V.2. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial en cytométrie de flux.....	209
V.2.1. Discrimination entre les cellules vivantes et les cellules mortes avec le fluorochrome TOTO-3 .....	209
V.2.2. Evolution du potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules vivantes (TOTO-3) à l'aide du fluorochrome JC-1.....	212
V.2.3. Détermination du taux d'apoptose sur la population cellulaire HaCaT totale à l'aide du double marquage TOTO-3 et JC-1 en CMF .....	216
(%).....	219
(TOTO-3 <sup>+</sup> ).....	219
VI. ETUDE DES MOLÉCULES APOPTOGÈNES LIBÉRÉES À PARTIR DE LA MITOCHONDRIE : CYTOCHROME C ET « APOPTOSIS INDUCING FACTOR » (AIF).....	220
VI.1. Etude du cytochrome c par immunofluorescence indirecte .....	220
VI.2. Etude de l'« Apoptosis Inducing Factor » (AIF) .....	222
VI.2.1. Expression de la protéine AIF par la technique de Western Blot .....	222
VI.2.2. Expression de la protéine AIF par immunofluorescence indirecte .....	223
VII. BAX ET BCL-2. ETUDES DES EXPRESSIONS DES ARNm ET DES PROTÉINES .....	225
VII.1. Etude de Bax.....	225
VII.1.1. Expression de l'ARNm de Bax .....	225
VII.1.2. Expression de la protéine Bax .....	226
VII.1.2.1. Expression de la protéine Bax par Western Blot.....	226
VII.1.2.2. Expression de la protéine Bax par immunofluorescence indirecte.....	227
VII.2. Etude de Bcl-2 .....	228
VII.2.1. Expression de l'ARNm de Bcl-2.....	228
VII.2.2. Expression de la protéine Bcl-2.....	228
VII.2.2.1. Expression de la protéine Bcl-2 par Western Blot .....	228
VII.2.2.2. Expression de la protéine Bcl-2 par immunofluorescence indirecte .....	229
VII.3. Etude du ratio Bax / Bcl-2 .....	230
VII.3.1. Etude du ratio ARNm de Bax sur ARNm de Bcl-2.....	230
VII.3.2. Etude du ratio protéine Bax sur protéine Bcl-2 .....	231
<b>CHAPITRE II : LIGNÉE CELLULAIRE M4BEU.....</b>	<b>232</b>
I. EVALUATION DU POTENTIEL ANTI-PROLIFÉRATIF DE L'ACIDE URSOLIQUE .....	232
II. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES M4BEU PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX .....	234
II.1. Etude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.....	234

II.2. Mise en évidence d'une population cellulaire apoptotique : présence d'un pic sub-G1 .....	235
III. PROTÉINES P53 ET P21. ETUDES DES EXPRESSIONS DES ARNm ET DES PROTÉINES .....	237
III.1. Etude de p53.....	237
III.1.1 Expression de l'ARNm de p53 .....	237
L'expression de l'ARNm de p53 des cellules M4Beu a été mise en évidence à l'aide de la technique RT-PCR (Figure 91).....	237
III.1.2. Expression de la protéine de p53 .....	238
III.1.2.1. Expression de p53 par la technique Western Blot .....	238
III.1.2.2. Expression de p53 par immunofluorescence indirecte.....	239
III.2.1. Expression de l'ARNm de p21 .....	242
III.2.2. Expression de la protéine p21 .....	243
III.2.2.1. Expression de p21 par la technique Western Blot .....	243
III.2.2.2. Expression de p21 par immunofluorescence indirecte.....	244
IV. ETUDE DES ACTIVITÉS CASPASES .....	246
IV.1. Etude de la caspase-3 .....	246
IV.1.1. Expression de l'ARNm de la caspase-3.....	246
IV.1.2. Activité enzymatique de la caspase-3 .....	247
IV.2. Etude de la caspase-1 .....	249
IV.2.1. Expression de l'ARNm de la caspase-1.....	249
IV.2.2. Activité enzymatique de la caspase-1 .....	250
IV.3. Etude de la caspase-8.....	252
IV.3.1. Expression de l'ARNm de la caspase-8.....	252
IV.3.2. Activité enzymatique de la caspase-8.....	253
IV.4. Etude de la caspase-9.....	254
IV.4.1. Expression de l'ARNm de la caspase-9.....	254
IV.5. Etude comparative de l'activité enzymatique des caspases étudiées .....	257
V. ETUDE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL ( $\Delta\Psi_M$ ).....	259
V.1 Etude du potentiel transmembranaire mitochondrial par marquage in situ avec le fluorochrome JC-1 .....	259
V.2. Analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial en cytométrie de flux.....	261
V.2.1. Discrimination entre les cellules vivantes et les cellules mortes avec le fluorochrome TOTO-3 .....	261
V.2.2. Evolution du potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules vivantes (TOTO-3) à l'aide du fluorochrome JC-1.....	264
V.2.3. Détermination du taux d'apoptose sur la population cellulaire M4Beu totale à l'aide du double marquage TOTO-3 et JC-1 en CMF .....	268
VI. ETUDE DES MOLÉCULES APOPTOGÈNES LIBÉRÉES À PARTIR DE LA MITOCHONDRIE : CYTOCHROME C ET « APOPTOSIS INDUCING FACTOR » (AIF) .....	272
VI.1. Etude du cytochrome c par immunofluorescence indirecte .....	272
VI.2. Etude de l'« Apoptosis Inducing Factor » (AIF) .....	274
VI.2.1. Expression de la protéine AIF par la technique Western Blot .....	274
VI.2.2. Expression de la protéine AIF par immunofluorescence indirecte .....	275
VII. PROTÉINES BAX ET DE BCL-2 : ÉTUDES DES EXPRESSIONS DES ARNm ET DES PROTÉINES .....	277
VII.1. Etude de Bax.....	277
VII.1.1. Expression de l'ARNm de Bax .....	277
VII.1.2. Expression de la protéine Bax .....	279
VII.1.2.1. Expression de la protéine Bax par la technique Western Blot.....	279
VII.1.2.2. Expression de la protéine Bax par immunofluorescence indirecte.....	280
VII.2. Etude de Bcl-2 .....	281
VII.2.1. Expression de l'ARNm de Bcl-2.....	281
VII.2.2. Expression de la protéine Bcl-2.....	282
VII.2.2.1. Expression de la protéine Bcl-2 par la technique Western Blot .....	282
VII.2.2.2. Expression de la protéine Bcl-2 par immunofluorescence indirecte .....	283
VII.3. Etude du ratio Bax / Bcl-2 .....	284
VII.3.1. Etude du ratio de l'expression de l'ARNm de Bax sur l'expression de l'ARNm de Bcl-2 .....	284
VII.3.2 Etude du ratio de l'expression protéique de Bax / l'expression protéique de Bcl-2 .....	285
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>287</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>303</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>306</b>
<b>ABBREVIATIONS.....</b>	<b>339</b>

## FIGURES

<b>INTRODUCTION</b> .....	12
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	15
<b>CHAPITRE I : L'Acide Ursolique</b> .....	16
<b>Figure 1</b> : Formule développée de l'acide ursolique. ....	17
<b>CHAPITRE II : La peau, les tumeurs et les lignées étudiées</b> .....	26
<b>Figure 2</b> : Représentation des différentes couches de la peau.....	28
<b>Figure 3</b> : Taux de pénétration des rayonnements solaires UV.....	35
<b>Figure 4</b> : Photographie d'un carcinome cutané.....	36
<b>Figure 5</b> : Photographie d'un mélanome malin cutané.....	38
<b>Figure 6</b> : Mutations du gène <i>p53</i> sur les cellules HaCaT irradiées aux UV .....	47
<b>CHAPITRE III : L'APOPTOSE</b> .....	50
<b>Figure 7</b> : Les trois phases du processus apoptotique .....	61
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique des principales voies apoptotiques.....	63
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique des voies d'activation des récepteurs TNF-R1, TNF-R2 et Fas/CD95 ..	66
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique des voies de signalisation de l'apoptose dues aux récepteurs de mort TNF-R1 et TNF-R2 .....	68
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique de la voie de signalisation de l'apoptose due au récepteur Fas/CD95 .	71
<b>Figure 12</b> : La chaîne de respiration mitochondriale.....	74
<b>Figure 13</b> : Modèle de la cascade apoptotique impliquant la mitochondrie.....	75
<b>Figure 14</b> : Représentation schématique de la chute du $\Delta\Psi_m$ .....	76
<b>Figure 15</b> : La mitochondrie au cours du processus apoptotique .....	78
<b>Figure 16</b> : Formation de l'apoptosome suite à la libération du cytochrome c .....	81
<b>Figure 17</b> : Structure schématique du précurseur de la protéine AIF et de sa forme mature dans la mitochondrie .....	82
<b>Figure 18</b> : La voie mitochondriale ou voie intrinsèque .....	84
<b>Figure 19</b> : Classification des membres de la famille Bcl-2.....	88
<b>Figure 20</b> : Les différentes régulations des membres de la famille Bcl-2 au cours du processus apoptotique....	91
<b>Figure 21</b> : Représentation de la cascade apoptotique .....	92
<b>Figure 22</b> : Classification des caspases .....	94
<b>Figure 23</b> : Structure et mécanisme d'activation des caspases.....	97
<b>Figure 24</b> : Activation séquentielle des caspases .....	99
<b>Figure 25</b> : Les différents mécanismes d'activation des caspases.....	101
<b>Figure 26</b> : Les diverses formes de clivage sur les substrats, par les caspases effectrices. ....	103
<b>Figure 27</b> : Structure schématique de la protéine FLIP.....	107
<b>Figure 28</b> : Structure schématique de la protéine IAP.....	108
<b>Figure 29</b> : Apoptose <i>via</i> AIF : voies caspase-dépendante et indépendante. ....	111
<b>Figure 30</b> : Activation de la protéine <i>p53</i> .....	115
<b>Figure 31</b> : Domaines structuraux et fonctionnels de la protéine <i>p53</i> .....	117
<b>Figure 32</b> : Rôle de <i>p53</i> .....	117
<b>Figure 33</b> : Régulation de <i>p53</i> par MDM2.....	119
<b>Figure 34</b> : Représentation schématique de la régulation du cycle cellulaire.....	122
<b>Figure 35</b> : Représentation schématique de l'arrêt du cycle en G1 par <i>p53 via p21</i> .....	125
<b>Figure 36</b> : Implication de <i>p53</i> et de TGF- $\beta$ dans l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire.....	126
<b>Figure 37</b> : Exemples de gènes régulés par <i>p53</i> .....	128
<b>Figure 38</b> : Représentation schématique des voies apoptotiques induites par <i>p53</i> .....	129
<b>MATERIEL &amp; METHODES</b> .....	130
<b>Figure 39</b> : Photographie de cellules HaCaT en culture. ....	132
<b>Figure 40</b> : Photographie de cellules M4Beu en culture. ....	132
<b>Figure 41</b> : Représentation théorique de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de leur contenu en ADN. ....	140
<b>Figure 42</b> : Marquage d'un antigène par immunofluorescence indirecte. ....	150
<b>Figure 43</b> : Schéma de la technique d'immunomarquage par chimiluminescence. ....	154
<b>Figure 44</b> : Migration par électrophorèse des protéines sur gel polyacrylamide.....	156
<b>Figure 45</b> : Cuve de transfert.....	157
<b>Figure 46</b> : Schéma du principe du mécanisme d'action de l'inhibiteur FITC-VAD-FMK lors du marquage <i>in situ</i> des activités caspases .....	161
<b>Figure 47</b> : Principe de l'analyse du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par double marquage	168
<b>Figure 48</b> : Schéma de l'analyse en CMF des populations cellulaires marquées par TOTO-3. ....	170
<b>Figure 49</b> : Fluorescence de JC-1 en fonction du potentiel membranaire mitochondrial .....	171

<b>RESULTATS</b> .....	<b>174</b>
<b>CHAPITRE I : Lignée cellulaire HaCaT</b> .....	<b>175</b>
<b>Figure 50</b> : Etude de la viabilité des cellules HaCaT en présence d'acide ursolique après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>176</b>
<b>Figure 51</b> : Etude de la viabilité des cellules HaCaT en présence d'acide ursolique après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>177</b>
<b>Figure 52</b> : Analyse comparative de la viabilité cellulaire des cellules HaCaT en présence d'acide ursolique (24 et 48 heures de traitement).....	<b>178</b>
<b>Figure 53</b> : Etude de la répartition des cellules HaCaT dans les différentes phases du cycle cellulaire après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique par la technique de CMF. ....	<b>181</b>
<b>Figure 54</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de p53 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>183</b>
<b>Figure 55</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine p53 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>184</b>
<b>Figure 56</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine p53 des cellules HaCaT après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>185</b>
<b>Figure 57</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de p21 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>187</b>
<b>Figure 58</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine p21 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>188</b>
<b>Figure 59</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine p21 des cellules HaCaT après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>189</b>
<b>Figure 60</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine p21 des cellules HaCaT après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>190</b>
<b>Figure 61</b> : Marquage <i>in situ</i> des cellules HaCaT avec l'inhibiteur FITC-VAD-FMK après 24 h de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>192</b>
<b>Figure 62</b> : Marquage <i>in situ</i> des cellules HaCaT avec l'inhibiteur FITC-VAD-FMK après 48 h de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>193</b>
<b>Figure 63</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-3 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>195</b>
<b>Figure 64</b> : Activité enzymatique de la caspase-3 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>197</b>
<b>Figure 65</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de caspase-1 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>198</b>
<b>Figure 66</b> : Activité enzymatique de la caspase-1 des cellules HaCaT après 24 h et 48 h de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>199</b>
<b>Figure 67</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-8 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>201</b>
<b>Figure 68</b> : Activité enzymatique de la caspase-8 des cellules HaCaT après 24 h et 48 h de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>202</b>
<b>Figure 69</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-9 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>203</b>
<b>Figure 70</b> : Activité enzymatique de la caspase-9 des cellules HaCaT après 24 h et 48 h de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>204</b>
<b>Figure 71</b> : Etude comparative des facteurs d'augmentation de l'activité des caspases des cellules HaCaT après 48 heures de traitement.....	<b>206</b>
<b>Figure 72</b> : Marquage <i>in situ</i> du potentiel mitochondrial membranaire des cellules HaCaT avec le fluorochrome JC-1 après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique.....	<b>208</b>
<b>Figure 73</b> : Cytogrammes de répartition des cellules HaCaT mortes (TOTO-3 <sup>+</sup> ) et vivantes (TOTO-3 <sup>-</sup> ) après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>210</b>
<b>Figure 74</b> : Cytogrammes de répartition des cellules HaCaT mortes (TOTO-3 <sup>+</sup> ) et vivantes (TOTO-3 <sup>-</sup> ) après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>211</b>
<b>Figure 75</b> : Sur les cellules HaCaT vivantes (TOTO-3 <sup>-</sup> ), cytogrammes de répartition des cellules à haut potentiel et des cellules à bas potentiel transmembranaire mitochondrial après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>213</b>
<b>Figure 76</b> : Sur les cellules HaCaT vivantes (TOTO-3 <sup>-</sup> ), cytogrammes de répartition des cellules à haut potentiel et des cellules à bas potentiel transmembranaire mitochondrial après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>214</b>
<b>Figure 77</b> : Histogrammes de répartition des cellules HaCaT possédant des mitochondries à bas potentiel mitochondrial après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>215</b>

<b>Figure 78</b> : Cytogrammes de répartition des trois sous-populations des cellules HaCaT à partir de la population cellulaire totale après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique. Analyse en CMF avec TOTO-3 et JC-1. ....	<b>217</b>
<b>Figure 79</b> : Cytogrammes de répartition des trois sous-populations des cellules HaCaT à partir de la population cellulaire totale après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. Analyse en CMF avec TOTO-3 et JC-1. ....	<b>218</b>
<b>Figure 80</b> : Immunofluorescence indirecte du cytochrome c des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique. ....	<b>221</b>
<b>Figure 81</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine AIF des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>223</b>
<b>Figure 82</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine AIF des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique. ....	<b>224</b>
<b>Figure 83</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de Bax des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>226</b>
<b>Figure 84</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine Bax des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>227</b>
<b>Figure 85</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de Bcl-2 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>228</b>
<b>Figure 86</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine Bcl-2 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>229</b>
<b>Figure 87</b> : Etude du ratio ARNm de bax sur ARNm de bcl-2 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>230</b>
<b>Figure 88</b> : Etude du ratio de protéine Bax sur protéine Bcl-2 des cellules HaCaT après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>231</b>
<b>CHAPITRE II : Lignée cellulaire M4Beu</b> .....	<b>232</b>
<b>Figure 89</b> : Analyse comparative de la viabilité cellulaire des cellules M4Beu en présence d'acide ursolique (24 et 48 heures de traitement).....	<b>233</b>
<b>Figure 90</b> : Etude de la répartition des cellules M4Beu dans les différentes phases du cycle cellulaire après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique par la technique de CMF. ....	<b>236</b>
<b>Figure 91</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de p53 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>238</b>
<b>Figure 92</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine p53 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>239</b>
<b>Figure 93</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine p53 des cellules M4Beu après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>240</b>
<b>Figure 94</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine p53 des cellules M4Beu après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>241</b>
<b>Figure 95</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de p21 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>242</b>
<b>Figure 96</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine p21 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>243</b>
<b>Figure 97</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine p21 des cellules M4Beu après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>244</b>
<b>Figure 98</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine p21 des cellules M4Beu après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>245</b>
<b>Figure 99</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-3 après 24 et 48 heures de traitement sur les cellules M4Beu.....	<b>247</b>
<b>Figure 100</b> : Activité enzymatique de la caspase-3 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>248</b>
<b>Figure 101</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-1 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>250</b>
<b>Figure 102</b> : Activité enzymatique de la caspase-1 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. ....	<b>251</b>
<b>Figure 103</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-8 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>252</b>
<b>Figure 104</b> : Activité enzymatique de la caspase-8 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique. ....	<b>253</b>
<b>Figure 105</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de la caspase-9 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement. ....	<b>255</b>



<b>Figure 106</b> : Activité enzymatique de la caspase-9 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique.....	<b>256</b>
<b>Figure 107</b> : Etude comparative des facteurs d'augmentation de l'activité des caspases des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>258</b>
<b>Figure 108</b> : Marquage <i>in situ</i> du potentiel mitochondrial membranaire des cellules M4Beu avec le fluorochrome JC-1 après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.....	<b>260</b>
<b>Figure 109</b> : Cytogrammes de répartition des cellules M4Beu mortes (TOTO-3 <sup>+</sup> ) et vivantes (TOTO-3 <sup>-</sup> ) après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique.....	<b>262</b>
<b>Figure 110</b> : Cytogrammes de répartition des cellules M4Beu mortes (TOTO-3 <sup>+</sup> ) et vivantes (TOTO-3 <sup>-</sup> ) après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.....	<b>263</b>
<b>Figure 111</b> : Sur les cellules M4Beu vivantes (TOTO-3 <sup>-</sup> ), cytogrammes de répartition des cellules à haut potentiel et des cellules à bas potentiel transmembranaire mitochondrial après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique.....	<b>265</b>
<b>Figure 112</b> : Sur les cellules M4Beu vivantes (TOTO-3 <sup>-</sup> ), cytogrammes de répartition des cellules à haut potentiel et des cellules à bas potentiel transmembranaire mitochondrial après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.....	<b>266</b>
<b>Figure 113</b> : Histogrammes de répartition du pourcentage des cellules M4Beu possédant des mitochondries à bas potentiel transmembranaire après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.....	<b>267</b>
<b>Figure 114</b> : Cytogrammes de répartition des trois sous-populations des cellules M4Beu à partir de la population cellulaire totale après 24 heures de traitement avec l'acide ursolique. Analyse en CMF avec TOTO-3 et JC-1.....	<b>269</b>
<b>Figure 115</b> : Cytogrammes de répartition des trois sous-populations des cellules M4Beu à partir de la population cellulaire totale après 48 heures de traitement avec l'acide ursolique. Analyse en CMF avec TOTO-3 et JC-1.....	<b>270</b>
<b>Figure 116</b> : Immunofluorescence indirecte du cytochrome c des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique.....	<b>273</b>
<b>Figure 117</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine AIF des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>274</b>
<b>Figure 118</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine AIF des cellules M4Beu après 24 heures de traitement avec de l'acide ursolique.....	<b>275</b>
<b>Figure 119</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine AIF des cellules M4Beu après 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique.....	<b>276</b>
<b>Figure 120</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de bax des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>278</b>
<b>Figure 121</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine Bax des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>279</b>
<b>Figure 122</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine Bax des cellules M4Beu après 24 heures de traitement avec de l'acide ursolique.....	<b>280</b>
<b>Figure 123</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de l'ARNm de bcl-2 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>281</b>
<b>Figure 124</b> : Effet de l'acide ursolique sur l'expression de la protéine Bcl-2 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement.....	<b>282</b>
<b>Figure 125</b> : Immunofluorescence indirecte de la protéine Bcl-2 des cellules M4Beu après 24 heures de traitement avec de l'acide ursolique.....	<b>283</b>
<b>Figure 126</b> : Etude du ratio de l'expression de l'ARNm de Bax sur celle de l'ARNm de Bcl-2 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec l'acide ursolique.....	<b>284</b>
<b>Figure 127</b> : Ratio de l'expression de Bax sur celle de Bcl-2 des cellules M4Beu après 24 et 48 heures de traitement avec de l'acide ursolique.....	<b>285</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>287</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>303</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>306</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>339</b>

## TABLEAU

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>12</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE I : L'ACIDE URSOLIQUE.....</b>	<b>16</b>
<b>CHAPITRE II : LA PEAU, LES TUMEURS ET LES LIGNÉES ÉTUDIÉES.....</b>	<b>26</b>
TABLEAU 1 : ESTIMATION DU NOMBRE DE CANCERS EN FRANCE POUR L'ANNÉE 2000.....	40
TABLEAU 2 : CORRÉLATION ENTRE L'INDICE DE BRESLOW ET LA SURVIE À 5 ANS D'APRÈS UNE SÉRIE DE 15 798 MÉLANOMES AU STADE I.....	42
<b>CHAPITRE III : L'APOPTOSE.....</b>	<b>50</b>
TABLEAU 3 : PATHOLOGIES ASSOCIÉES À UN DÉRÈGLEMENT DU PROCESSUS APOPTOTIQUE.....	56
TABLEAU 4 : LA FAMILLE DES CASPASES.....	95
TABLEAU 5 : SUBSTRATS DES CASPASES.....	104
<b>MATERIEL &amp; METHODES.....</b>	<b>130</b>
TABLEAU 6 : OLIGONUCLÉOTIDES ET TAILLE DES FRAGMENTS DE PCR (PB : PAIRE DE BASES).....	146
TABLEAU 7 : CARACTÉRISTIQUES DE CHAQUE PCR (Tm : MELTING TEMPERATURE).....	147
TABLEAU 8 : CONDITIONS D'UTILISATION DES ANTICORPS PRIMAIRES EN IMMUNOMARQUAGE PAR FLUORESCENCE INDIRECTE.....	152
TABLEAU 9 : CONDITIONS D'UTILISATION DES ANTICORPS SECONDAIRES EN IMMUNOMARQUAGE PAR FLUORESCENCE INDIRECTE.....	152
TABLEAU 10 : CONDITIONS D'UTILISATION DES ANTICORPS PRIMAIRES EN WESTERN BLOT.....	158
TABLEAU 11 : CONDITIONS D'UTILISATION DES ANTICORPS SECONDAIRES EN WESTERN BLOT.....	159
TABLEAU 12 : DISTRIBUTION DES RÉACTIFS POUR LE DOSAGE DES ACTIVITÉS CASPASES.....	166
<b>RESULTATS.....</b>	<b>174</b>
<b>CHAPITRE I : LIGNÉE CELLULAIRE HACAT.....</b>	<b>175</b>
TABLEAU 13 : RÉPARTITION DES CELLULES HACAT DANS LES DIFFÉRENTES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE APRÈS 24 ET 48 HEURES DE TRAITEMENT AVEC L'ACIDE URSOLIQUE.....	179
TABLEAU 14 : SUR LA POPULATION TOTALE DES CELLULES HACAT, ANALYSE DE LA RÉPARTITION ENTRE LES CELLULES MORTES, LES CELLULES VIVANTES « NORMALES » ET LES CELLULES VIVANTES EN COURS D'APOPTOSE. ANALYSE EN CMF AVEC LES FLUOROCROMES TOTO-3 ET JC-1.....	219
(N=3).....	219
<b>CHAPITRE II : LIGNÉE CELLULAIRE M4BEU.....</b>	<b>232</b>
TABLEAU 15 : RÉPARTITION DES CELLULES M4BEU DANS LES DIFFÉRENTES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE APRÈS 24 ET 48 HEURES DE TRAITEMENT AVEC L'ACIDE URSOLIQUE.....	234
TABLEAU 16 : SUR LA POPULATION TOTALE DES CELLULES M4BEU, ANALYSE DE LA RÉPARTITION DES CELLULES MORTES ET VIVANTES « NORMALES » ET LES CELLULES VIVANTES EN COURS D'APOPTOSE. ANALYSE EN CMF AVEC LES FLUOROCROMES TOTO-3 ET JC-1.....	271
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>287</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>303</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>306</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>339</b>

## **LISTE DES PUBLICATIONS**

- **Harmand P.O.**, Duval R., Liagre B., Jayat-Vignoles C., Beneytout J.-L., Delage C. et Simon A. Ursolic Acid induces apoptosis through caspase-3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells. *International Journal of Oncology* 23(1) 105-112, 2003.
- **Harmand P.O.**, Duval R., Delage C. et Simon A. Ursolic Acid induces apoptosis through mitochondrial-intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells line. Publication acceptée et sous presse dans *International Journal of Cancer*.