

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES DE BESANÇON
Année Universitaire 2008 – 2009

THESE

Pour l'obtention
du diplôme de Doctorat de l'Université de Franche-Comté
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

n° bibliothèque : 25.09.03

Présentée et soutenue publiquement
le 15 avril 2009 par

Magali NICOLIER

**Induction de l'apoptose de cellules tumorales
par la staurosporine :
la mitochondrie au carrefour de la mort**

Sous la direction du Professeur Christiane MOUGIN

Composition du Jury :

Directeur de thèse :	Pr Christiane MOUGIN	Université de Franche-Comté
Rapporteurs :	Pr Amapola AUTILLO-TOUATI Dr François DERYCKERE	Université d'Aix-Marseille II FRE3211- ESBS - Université Louis Pasteur Strasbourg I
Examineurs :	Pr Christine CLAVEL Pr Régis DELAGE-MOURROUX Pr Michel FROMM	Université de Reims Champagne-Ardennes Université de France-Comté Université de France-Comté



UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANCON
PLACE SAINT-JACQUES - 25030 BESANCON Cedex FRANCE

Fax 03.63.08.22.77. ☎ 03.63.08.22.86.

PERMIS D'IMPRIMER

*THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

N° 25.09.03

Présentée par ~~Madame, Monsieur~~ *NICOLIER Nagali*

Né(e) le *13.05.1979*

et ayant pour titre : *Induction de l'apoptose de cellules
tumerales par la staurosporine :
la mitochondrie au cœur de la mort*

Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le *16/09*

Le Président de l'Université
et par délégation,
Le Doyen,

Le Directeur de Thèse,

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier la Ville de Besançon pour m'avoir octroyé trois années d'allocation de recherche.

Je remercie également la Ligue Contre le Cancer, plus particulièrement le Comité du Doubs, pour le financement d'allocations de fonctionnements.

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Mme le Professeur Christiane Mougin, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de cette équipe, pour les connaissances et les qualités scientifiques que vous m'avez apportées.

Je remercie également les rapporteurs et membres du jury : Mme le Pr Amapola Autillo-Touati, Mr le Dr François Deryckère, Mme le Pr Christine Clavel, Mr le Pr Régis Delage-Mourroux et Mr le Pr Michel Fromm qui ont tous répondu présents pour évaluer ce travail.

Je remercie également les seniors de l'équipe, Mr le Dr Jean-Luc Prétet, Mlle le Dr Sylvie Fauconnet, Mlle le Dr Isabelle Lascombes pour leurs soutiens et leurs conseils.

Je remercie tous les membres de l'équipe EA 3181 : Maëlle (on avait dit que ce serait bien de soutenir le même jour, mission accomplie !!!!), Marie-Laure (la prochaine sur la liste...si si), Guillaume (mon voisin de bureau), Claudine (de retour parmi nous et qui a partagé mon bureau contrainte et forcée....vive la mère-attitude !!!), JS (mon coach de réinstall), Zélie, Sophie, Emilie, Manue (la presque plus bleue), Cédric le dernier venu dans l'arène. Merci aussi aux anciens du labo : Jeff (j'ai pris soin de tes filles et merci d'être venu le jour J...), Olive et son regard, Sylvain.

Un grand merci à toutes les personnes cotoyées de près ou de loin au laboratoire (D'avance toutes mes excuses aux personnes que je pourrais oublier dans la liste) : Pascale pour son éternelle bonne humeur, Dom pour les grandes discussions autour du café matinal, Mimi, David pour les discussions (autre façon de dire potin) dans le L2, Virginie et les cytomètres. Je n'oublie pas mes amies : Kiki, merci beaucoup pour tout, pour les soirées chez toi et tout le reste, et Amélie : merci pour toutes les soirées, toutes les rigolades et d'avoir été là. Enfin un immense merci à Audrey, mon mini-moi baroudeur à travers le monde mais tout près de moi quand même dans les bons moments comme dans les galères.

Pour finir, je remercie ma famille et mes amis qui ont toujours été présents et qui m'ont soutenu au cours de cette aventure.

Je dédie cette thèse à mes parents (je vous ai écouté j'ai arrêté avant votre retraite), mon frère Romu, ma belle-sœur Fred, mes neveux Paul et Antonin, JR (pour les schémas et surtout pour tout le reste....) et mes grands-mères. Merci pour votre soutien infaillible et vos encouragements.

A mes grands-pères,

Résumé

La mort cellulaire programmée est un processus physiologique basique regroupant de nombreux types de mort dont le principal est l'apoptose. Un défaut de mort cellulaire est fréquemment impliqué dans les développements précoces de cancer et la résistance tumorale aux chimio- et radiothérapies. Une approche thérapeutique efficace consiste donc à restaurer ces voies de mort court-circuitées dans les cellules tumorales.

Dans ce contexte, les protéines kinases sont des cibles prometteuses pour le développement de nouvelles drogues chimiothérapeutiques. Parmi elles, les protéines kinases C (PKC) sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation contrôlant la prolifération cellulaire, la différenciation mais aussi l'apoptose. La staurosporine (STS), un puissant inhibiteur de protéines kinases, dispose non seulement d'une forte activité anti-proliférative, mais est aussi capable d'activer l'apoptose de nombreuses lignées cellulaires tumorales.

Des travaux précédents au laboratoire ont montré que la STS induit l'apoptose de lignées dérivées de cancer du col de l'utérus ($p53^{wt}$ HPV⁺ vs $p53^{mt}$ HPV⁻), apoptose impliquant la voie intrinsèque ou mitochondriale.

Nous avons montré que la protéine p53 joue un rôle primordial dans cette apoptose et ce, grâce à son activité transcriptionnelle ainsi qu'à son activité mitochondriale indépendante de la transcription. Par ailleurs, nous avons montré que les acteurs impliqués en aval de la voie mitochondriale entraînent la mort des cellules *via* des voies distinctes, à savoir i) le cytochrome *c* et la cascade des caspases et ii) l'AIF et la voie indépendante des caspases médiée par PARP-1. Ces deux voies ne sont pas activées au même moment selon le statut de p53 (sauvage vs mutée).

Les résultats présentés dans ce travail démontrent que la STS ou un de ses dérivés, notamment UCN-01, pourrait être utilisés, seuls ou en combinaison avec d'autres molécules, afin de proposer de nouvelles stratégies anti-cancéreuses visant à éliminer les tumeurs du col de l'utérus *via* l'activation de la voie apoptotique mitochondriale.

Mots-clés : staurosporine, apoptose, p53, cytochrome *c*, caspases, AIF, PARP-1

Summary

Programmed cell death is a group of basic physiological processes, the principal one being apoptosis. A fault in this pathway is frequently complicated in both the development of tumors and their resistance to radio- and chemotherapy. However, one effective therapeutic approach consists of restoring this pathway in tumors.

With this context, protein kinases C (PKC) are involved in several signaling pathways controlling proliferation, differentiation, and apoptosis. Staurosporine (STS) is a powerful inhibitor of protein kinases C capable of arresting proliferation and inducing apoptosis in numerous tumoral cell lines.

Previous work in our laboratory has shown that STS induces apoptosis in cervical cancer lines (p53wt HPV+ vs p53mt HPV-) by the intrinsic apoptotic pathway.

We have demonstrated that p53 plays a pivotal role in apoptosis and its transcriptional activity is independent of its mitochondrial effect. In addition, we showed that cell death caused by mitochondrial effects can be achieved by molecules involved in two distinct pathways: i) the cytochrome c and the caspase cascade and ii) AIF and a pathway independent of caspases mediated by PARP-1. The two routes are not activated at the same time according to the status of p53 (wild type vs mutant).

The results presented here indicate that STS and more notably its derivative UCN-01 may be used in the future alone or in combination with other molecules to open new fields for the therapeutic intervention of cervical cancers by activating the mitochondrial apoptotic pathway.

Keywords: staurosporine, apoptosis, p53, cytochrome c, caspases, AIF, PARP-1

Sommaire

Figures.....	6
Tableaux.....	7
Abréviations.....	9
Préambule.....	11
Partie 1 : Revue de la littérature.....	15
1. Mort cellulaire programmée.....	17
1.1. Définition.....	17
1.1.1 Le point de non retour.....	17
1.1.2 Définition d'une cellule mourante.....	18
1.2. Nouvelle nomenclature.....	18
1.3. Autophagie.....	20
1.3.1 Généralités.....	20
1.3.2 Mode d'action.....	21
1.4. Nécrose programmée.....	23
1.4.1 Généralités.....	23
1.4.2 Mode d'action.....	24
1.5. Catastrophe mitotique.....	26
1.5.1 Généralités.....	26
1.5.2 Mode d'action.....	27
1.6. Apoptose.....	29
1.7. Choix d'un type de mort.....	29
2. Apoptose.....	32
2.1. Historique et définition.....	32
2.2. Rôles physiologiques et pathologies.....	33
2.2.1 Rôles physiologiques de l'apoptose.....	33
2.2.2 Pathologies liées à l'apoptose.....	34
2.3. Caractéristiques de l'apoptose.....	34
2.3.1 Aspects morphologiques.....	35
2.3.2 Aspects biochimiques.....	35
2.3.3 Evolution : de Caenorhabditis elegans aux Mammifères.....	36
2.4. Différentes voies apoptotiques.....	38
2.4.1 Caspases, famille de protéases importantes.....	38
2.4.1.1. Définition.....	38
2.4.1.2. Structure des caspases.....	38
2.4.1.3. Activation des caspases.....	39
2.4.1.4. Substrats des caspases.....	41
2.4.1.5. Régulation des caspases.....	42
2.4.2 Voie des récepteurs de mort membranaires.....	45
2.4.2.1. Présentation.....	45
2.4.2.2. Différents systèmes ligand/récepteur.....	47
• Système TNF- α /TNF-R1.....	47
• Système FasL/Fas.....	47
• Système TRAIL/DR-4 ou DR-5.....	49
2.4.2.3. Régulation.....	49
2.4.3 Mitochondries, éléments centraux de l'apoptose.....	51
2.4.3.1. Généralités sur les mitochondries.....	51
2.4.3.2. Phase 1 de la voie apoptotique mitochondriale : initiation.....	54
• Famille Bcl-2.....	54
• t-Bid.....	56
• p53.....	57

2.4.3.3.	Phase 2 de la voie apoptotique mitochondriale : intégration/décision.....	60
•	Perméabilisation membranaire mitochondriale : MMP.....	60
•	Perméabilisation de la membrane externe.....	60
✓	Perméabilisation de la membrane externe médiée par le VDAC.....	60
✓	Perméabilisation de la membrane externe médiée par Bax/Bak.....	61
✓	Détection de la perméabilisation de la membrane externe.....	62
•	Perméabilisation de la membrane interne.....	63
✓	Perméabilisation de la membrane interne médiée par le PTP.....	64
✓	Détection de la perméabilisation de la membrane interne.....	65
•	Rôle de la fission et de la fusion mitochondriales lors de la perméabilisation de la membrane mitochondriale.....	67
2.4.3.4.	Phase 3 de la voie apoptotique mitochondriale : exécution/dégradation	68
•	Le cytochrome c et la voie apoptotique dépendante des caspases.....	68
✓	Le cytochrome c.....	68
✓	La libération du cytochrome c et sa régulation.....	69
✓	L'apoptosome.....	72
✓	Régulation de l'apoptosome.....	73
•	L'AIF et la voie indépendante des caspases.....	74
✓	L'AIF.....	74
✓	Libération de l'AIF.....	75
✓	Translocation de l'AIF au noyau.....	77
✓	Régulation de la libération et de la translocation nucléaire de l'AIF.....	78
✓	Libération de l'AIF par la voie médiée par PARP-1.....	78
3.	Les chimiothérapies.....	80
3.1.	Généralités sur le cancer.....	80
3.2.	Généralités sur la chimiothérapie.....	81
3.3.	Les chimiothérapeutiques classiques.....	82
3.3.1	Les agents formants des adduits covalents avec l'ADN.....	82
3.3.2	Les antimétabolites.....	84
3.3.3	Les poisons du fuseau mitotique.....	85
3.3.4	Les inhibiteurs des topoisomérases.....	85
3.4.	Les nouvelles chimiothérapies : thérapeutiques ciblées.....	86
3.4.1	Les voies de signalisation liées aux facteurs de croissance.....	86
3.4.1.1.	Présentation des voies.....	86
3.4.1.2.	Ciblage des facteurs de croissance.....	87
3.4.1.3.	Ciblage des récepteurs.....	88
3.4.2	La perte du contrôle du cycle cellulaire.....	89
3.4.3	La dérégulation de l'apoptose.....	89
3.4.4	Cas particulier : p53.....	89
3.4.4.1.	p53 sauvage.....	90
3.4.4.2.	p53 mutée.....	90
3.5.	Chimiothérapie et cancer du col de l'utérus.....	91
3.6.	Cas de la staurosporine.....	94
Partie 2 : Matériel et Méthodes		99
1.	Lignées cellulaires.....	101
2.	Traitements des cellules.....	101
2.1.	Induction de l'apoptose.....	101
2.2.	Restauration du domaine de liaison à l'ADN de p53.....	102
2.3.	Blocage réversible de l'activité transcriptionnelle de p53.....	102
2.4.	Blocage de l'activité des caspases.....	103
2.5.	Inhibition de l'activité de PARP-1.....	103

3.	Cytométrie de flux	103
3.1.	Dépolarisation membranaire mitochondriale.....	103
3.2.	Quantification des cellules en Sub-G1	104
4.	Analyse des protéines.....	104
4.1.	Extraction des protéines totales	104
4.2.	Purification des mitochondries, cytosols et noyaux	104
4.3.	Western-blotting.....	105
5.	Electrophorèse en champ pulsé	106
6.	Immunocytochimie	107
6.1.	Microscopie à fluorescence.....	107
6.2.	Microscopie confocale	107
Partie 3 : Travaux Personnels.....		109
Contexte et objectifs		111
1.	Publication n°1.....	113
2.	Publication n°2.....	133
3.	Résultats non publiés.....	151
3.1.	Choix du marqueur mitochondrial	151
3.2.	Choix du fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire	152
3.3.	Localisation intra-cellulaire du cyt c au cours de l'apoptose induite par la STS	153
3.4.	Localisation intra-cellulaire de l'AIF au cours de l'apoptose induite par la STS.....	155
Partie 4 : Discussion et Perspectives		157
Conclusion Générale		169
Références Bibliographiques		173
ANNEXES.....		211
Mécanismes de la carcinogenèse associée aux papillomavirus		213
HPV et cancers : mécanismes de l'oncogenèse.....		217
Posters		227

Figures

Figure 1 : Les différents types de mort	19
Figure 2 : Schéma des caractéristiques morphologiques de l'autophagie.....	21
Figure 3 : Régulation de l'autophagie	22
Figure 4 : Mécanisme d'action de la nécrose.....	25
Figure 5 : Représentation schématique de la catastrophe mitotique	27
Figure 6 : La balance autophagie vs apoptose	30
Figure 7 : Mise en évidence de l'apoptose au cours du temps.....	32
Figure 8 : Différenciation incomplète de deux orteils suite à un défaut d'apoptose	34
Figure 9 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose	35
Figure 10 : Activation de l'apoptose chez le vers nématode <i>c.elegans</i>	36
Figure 11 : Apoptose chez le vers nématode <i>c.elegans</i> et homologie avec les Mammifères	37
Figure 12 : Classification des caspases	39
Figure 13 : Activation en cascade des caspases	40
Figure 14 : La voie des récepteurs de mort.....	46
Figure 15 : Les différents systèmes ligands/récepteurs de mort.....	48
Figure 16 : Les mécanismes de fission et fusion mitochondriales	51
Figure 17 : Représentation schématique de la mitochondrie.....	52
Figure 18 : Les différentes translocases mitochondriales	53
Figure 19 : Classification des membres de la famille Bcl-2	55
Figure 20 : Structure de p53.....	57
Figure 21 : Impact de p53 sur la voie apoptotique mitochondriale.....	58
Figure 22 : Les pores de la famille Bcl-2	62
Figure 23 : Le pore de transition de perméabilité ou PTP.....	64
Figure 24 : Détection de la perméabilisation des membranes externe et interne	66
Figure 25 : Les boucles d'amplification permettant la libération biphasique du cyt c	70
Figure 26 : Formation de l'apoptosome.....	72
Figure 27 : Régulation de l'apoptosome	74
Figure 28 : Localisation sub-cellulaire et régulation de la libération de l'AIF	77
Figure 29 : Le cisplatine.....	83
Figure 30 : Activation du cisplatine en milieu aqueux	84
Figure 31: Structure chimique de la staurosporine.....	94
Figure 32 : Représentation schématique de l'effet de la STS sur la prolifération cellulaire et l'apoptose	96
Figure 33 : Représentation schématique des différentes protéines ciblées au cours de ce travail ...	102
Figure 34 : Effets lors de l'apoptose induite par la STS de PFT- α sur les cellules présentant une p53 sauvage et de PRIMA-1 sur les cellules présentant une p53 mutée	115
Figure 35 : Modèle proposé pour la cascade apoptotique induite par la STS dans les lignées HeLa et C-33A. Les voies prépondérantes sont indiquées par les flèches orange.	136
Figure 36 : Marquage au NAO vs MT des mitochondries de cellules HeLa non traitées.	151
Figure 37 : Comparaison de l'émission de fluorescence du TRITC et d'Alexa 488 couplé à l'anticorps secondaire anti-IgG de souris (A et C) dans des cellules HeLa non traitées	152
Figure 38 : Localisation sub-cellulaire du cyt c dans des cellules HeLa (A) et C-33A (B) traitées par de la STS.....	154
Figure 39 : Localisation sub-cellulaire de l'AIF dans des cellules HeLa (A) et C-33A (B) traitées par de la STS.	156

Tableaux

Tableau 1 : Anticorps utilisés en western-blotting..... 106

Abréviations

3-AB **3-aminobenzamide**
5-FU **5-fluorouracile**
 $\Delta\Psi_m$ potentiel membranaire mitochondrial
 $\nabla\Delta\Psi_m$ chute du potentiel membranaire mitochondrial

A

AIF **apoptosis inducing factor**
ACINUS **apoptotic chromatin condensation induced in the nucleus**
ADN **acide désoxyribonucléique**
ANT **Adenine Nucleotide Translocase**
APAF-1 **apoptotic protease activating factor-1**
ARN **acide ribonucléique**
ASO₄ **hydroxyde d'aluminium**
Atg **Autophagy related-genes**
ATM **Ataxia telangiectasia mutated**
ATP **adenosine triphosphate**
ATR **Ataxia telangiectasia and RAD-3 related**
Aug **autophagie**
Aut **autophagocytose**

B

Bcl-2 **B-cell lymphoma-2**
Bid **BH3-interacting domain death agonist**
BIR **Baculovirus IAP repeats**
BH **Bcl-2 Homology**

C

CAD **caspase activated DNase**
CARD **caspase recruitment domain**
Caspase **cystein aspartic acid protease**
Ced **Caenorhabditis elegans death**
CDK1 **cyclin dependent kinase 1**
CGP 41 215 **N-benzoyl-staurosporine**
Chk 1 **Checkpoint kinase 1**
Chk 2 **Checkpoint kinase 2**
c-IAP **cellular inhibitor of apoptosis protein**
CrmA **cytokine response modifier A**
Cyc D **cytrophiline D**
cyt c **cytochrome c**
CsA **cyclosporine A**

D

DcR **decoy receptor**
DD **Death Domain**
DED **Death Effector Domain**
DISC **death inducing signaling complex**
DFF **DNA fragmentation factor**
DNA-PK **DNA-activated protein kinase**
DR **death receptor**

E

EGF **epidermal growth factor**
Egl-1 **Egg-laying defective-1**
Endo G **endonucléase G**
ERK1 **extracellular signal-regulated kinase**
ERO **espèces réactives à l'oxygène**

F

FAD **flavine adenine dinucleotide**
FADD **Fas associated death domain**
FasL **Fas ligand**
FLICE **FADD-like IL-1 β converting enzyme**
FLIP **FLICE inhibitory protein**

G

Galig **galectin-3 internal gene**
GFP **green fluorescent protein**

H

HER **human EGF receptor related**
Hq **harlequin**
HDAC **histone deacetylase**
HDI **histone deacetylase inhibitors**
HPV **human papillomavirus**
HSP **Heat shock protein**
HtrA2 **High temperature requirement protein A2**

I

IAP **inhibitor of apoptosis proteins**
ICAD **inhibitor of caspase Activated DNase**
ICE **Interleukine-1 converting enzyme**
IP3 **inositol 1,4,5-triphosphate**

J

JNK-1 c-Jun NH₂-terminal Kinase-1

M

MAC mitochondrial apoptosis-induced channel

MAPK mitogen-activated protein kinase

MDM2 murine double minute 2

MMP membrane mitochondriale permeabilization

MNNG N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

MPF mitosis-promoting factor

mTOR mammalian target of rapamycin

N

NaB butyrate de sodium

NADH nicotinamide adenine dinucleotide reduced

NCD Necrosis Cell Death

NCCD Nomenclature Committee on Cell Death

NSCLC non small cell lung carcinoma

O

Opa1 optic atrophia 1

P

PAR poly(ADP-ribose)

PARG poly(ADP-ribose) glycohydrolase

PARL presenilin-associated rhomboid-like

PARP-1 poly(ADP-ribose) polymerase-1

PCD programmed cell death

PDK phosphoinositide-dependent kinase

PFT- α /pifithrine- α p fifty-three inhibitor

PI3K phosphoinositide-3 kinase

PI3KK PI3K-related kinase

PKB protéine kinase B

PKC protéine kinase C

PKC412 N-benzoyl-staurosporine

PLZF promyelocytic leukemia zinc finger

PRIMA-1 p53 reactivation and induction of massive apoptosis

ProT prothymosine- α

PUMA p53 upregulated modulator of apoptosis

PT permeability transition

PTP permeability transition pore

PTPC permeability transition pore complex

R

RIP-1 Receptor Interacting Protein-1

RITA reactivation of p53 and induction of tumor cells apoptosis

RE réticulum endoplasmique

RPA replication protein A

S

SAM sorting and assembly of the outer membrane

Smac/DIABLO second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI

STS Staurosporine

T

t-AIF truncated-apoptosis inducing factor

tAtg5 truncated Atg5

t-Bid truncated-Bid

TIM translocase of inner membrane

TOB topogenesis of the outer membrane β -barrel protein

TOM translocase of outer membrane

TNA therapeutic nucleic acids

TNF Tumor Necrosis Factor

Trabodies transcription-activating antibodies

TRADD TNF R1-associated death domain

TRAIL TNF-related apoptosis inducing ligand

TRAIL-R TNF-related apoptosis inducing ligand-receptor

TRAF-2 TNF receptor-associated factor-2

U

UCN-01 7-hydroxy-staurosporine

V

VDAC voltage-dependent anion channel

VEGF vascular endothelial growth factor

VLP viral like particules (pseudo-particules virales)

Vps vacuolar protein-sorting

X

XAF1 XIAP-associated factor-1

XIAP X linked IAP

Préambule

Deuxième cancer au monde chez la femme après celui du sein, le cancer du col de l'utérus est un réel problème de santé publique. En effet, près de 4 millions de femmes au monde en sont atteintes : chaque année, 471 000 nouveaux cas sont diagnostiqués et plus de 233 000 femmes en décèdent (Parkin *et al.*, 2001). A l'heure actuelle, ce cancer est considéré comme la seule tumeur humaine quasi-totalement viro-induite (zur Hausen, 1999). En effet, le processus de carcinogenèse des cellules du col de l'utérus est étroitement lié à la présence de papillomavirus humains à haut risque (HPV HR). L'intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule hôte entraîne la surexpression de deux protéines virales E6 et E7 impliquées dans l'immortalisation et la transformation tumorale de la cellule. En particulier, ces protéines interfèrent avec l'activité de deux protéines suppresseurs de tumeurs, respectivement p53 et p105, qu'elles inactivent. Dans les rares cas de cancer du col de l'utérus où les HPV ne sont pas présents, la protéine p53 est mutée au niveau du domaine de liaison à l'ADN, ce qui se traduit par son inactivation au niveau transcriptionnel.

Les traitements précoces du cancer du col de l'utérus sont la chirurgie couplée à la radiothérapie et éventuellement la chimiothérapie. Néanmoins, ces traitements sont agressifs et d'une efficacité non optimales. C'est pourquoi différentes équipes de recherche se sont penchées sur la mise au point de vaccins à visée thérapeutique ou prophylactique alors que d'autres s'orientent vers la conception de nouveaux composés chimio-thérapeutiques plus efficaces et moins nocifs que les molécules actuellement sur le marché. La staurosporine (STS), puissant inhibiteur de nombreuses protéines kinases et drogue anti-proliférative (Gescher, 2000), pourrait être une bonne candidate pour traiter les lésions précancéreuses du cancer du col de l'utérus, voire le cancer du col lui-même. Cette molécule a été élaborée en 2000 par Reed et Tomaselli afin de restaurer les voies d'induction de l'apoptose court-circuitées lors de la transformation cancéreuse (Reed et Tomaselli, 2000).

L'objectif lors de notre thèse est de préciser les différents mécanismes mis en jeu lors de l'induction de l'apoptose par la staurosporine dans des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus (p53^{wt} HPV⁺ vs p53^{mt} HPV). L'approfondissement des connaissances fondamentales est en effet indispensable pour envisager l'utilisation de cette molécule ou de l'un de ses dérivés dans le traitement des cancers du col de l'utérus.

Partie 1

Revue de la littérature

1. Mort cellulaire programmée

1.1. Définition

La mort cellulaire programmée ou « Programmed Cell Death » (PCD) est un processus physiologique basique. Partie intégrante de la physiologie d'un organisme, c'est un phénomène conservé au cours de l'évolution aboutissant à l'élimination de cellules endommagées, potentiellement indésirables ou âgées, aussi bien lors du développement des animaux que pour le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Ce processus de mort est contrôlé génétiquement en réponse à des signaux internes ou externes.

Il existe différentes formes de mort cellulaire. Pendant de nombreuses années, une dichotomie existait entre la nécrose définie comme une mort cellulaire désordonnée, et l'apoptose décrite comme une mort cellulaire ordonnée. Cependant, dans les cellules eucaryotes, de nombreux autres types de mort ont été observés. Une nouvelle classification des différentes formes de mort cellulaire a donc été élaborée par le Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) en 2005 (Kroemer *et al.*, 2005).

Cependant, quelque soit sa forme, un défaut de mort cellulaire est fréquemment impliqué dans les développements précoces de cancer et la résistance tumorale aux chimio- et radio-thérapies (Thompson, 1995 ; Mashima et Tsuruo, 2005).

Bien qu'il existe de nombreux types de mort cellulaire mettant en jeu différents mécanismes, tous sont caractérisés par le passage d'un point de non retour et par une définition universelle de la cellule « mourante » ou en train de mourir (Kroemer *et al.*, 2005).

1.1.1 Le point de non retour

Le processus de mort cellulaire est réversible tant que la cellule n'a pas atteint le « point de non retour ». Ce point est différent de celui observé lors du cycle cellulaire et décrit par Pardee.

Différents éléments peuvent caractériser le passage du point de non retour au cours de la mort cellulaire : l'activation massive des caspases, la diminution du potentiel membranaire mitochondrial (Green et Kroemer, 1998), une perméabilisation totale de la membrane mitochondriale externe (Green et Kroemer, 2004) ou l'exposition à la surface membranaire des résidus de phosphatidylsérines. Cependant, la présence d'un seul de ces éléments n'aboutit pas toujours au passage du point de non retour. En effet, les caspases peuvent aussi être activées dans des mécanismes non létaux et dans des voies de différenciation. La dépolarisation membranaire mitochondriale peut, quant à elle, être observée en absence de mort (de Graaf *et al.*, 2004). De même, Yang et ses collaborateurs ont observé que l'externalisation des phosphatidylsérines était réversible dans les granulocytes neutrophiles (Yang *et al.*, 2002). Une fois ce point de non retour dépassé, la cellule a pris la décision de mourir.

1.1.2 Définition d'une cellule mourante

Quelque soit le type de mort impliqué, des critères moléculaires et morphologiques permettent de caractériser une cellule mourante (Kroemer *et al.*, 2005) :

- La perte de l'intégrité de la membrane plasmique ;
- La fragmentation de la cellule, y compris de son noyau, en petits corps distincts plus communément appelés corps apoptotiques ;
- L'élimination par phagocytose de ces corps apoptotiques par les cellules avoisinantes.

Tout ceci aboutit, *in fine*, à la perte de la capacité de survie de la cellule.

1.2. Nouvelle nomenclature

Face à la diversité des formes de mort cellulaire mises en évidence au cours de la dernière décennie, une nouvelle nomenclature élaborée en 2005 et complétée en 2009 par le NCCD (Kroemer *et al.*, 2005 ; Kroemer *et al.*, 2009) remplace celle de Clarke (Clarke, 1990) : on parle des « nouvelles voies de mort » où la mort programmée de la cellule est considérée comme un processus dynamique par lequel une cellule peut utiliser différents mécanismes pour mourir. Cette nouvelle nomenclature est basée sur les caractéristiques des mécanismes mis en jeu dans les différents types de mort cellulaire. On distingue principalement l'apoptose, l'autophagie, la nécrose (Figure 1) ainsi que la catastrophe mitotique. Ces 4 types seront détaillés par la suite.

D'autres types de mort ont été décrits. Brièvement, on distingue :

- La **paraptose** : présente en parallèle à l'apoptose. Elle se caractérise par une vacuolisation du cytoplasme, un gonflement des mitochondries mais aucune activation des caspases et aucune modification nucléaire telle que la picnose ou la fragmentation de l'ADN (Wyllie et Golstein, 2001).

- La **pyroptose** : apoptose des macrophages en réponse à une infection par un pathogène, tel que *Salmonella typhimurium*. Contrairement à l'apoptose, elle implique l'activation de la caspase-1 par un large complexe supramoléculaire, le pyroptosome (Bergsbaken *et al.*, 2009). La caspase-1 activée favorise la libération d'Il-1 et d'Il-18, ce qui résulte en des réponses inflammatoires locales et systémiques.

- La **pyronécrose** : nécrose des macrophages infectés par *Shigella flexneri* associée à la libération d'HMGB-1, et d'Il-1 β et est indépendant de l'activation de la caspase-1 (Willingham *et al.*, 2007).

- L'**entose** : phénomène de cannibalisme cellulaire ou « cell-in-cell » observé dans des cellules tumorales épithéliales. Suite à une perte d'adhérence de la cellule à la matrice extracellulaire, la cellule est internalisée dans une cellule voisine vivante. Cette internalisation est appelée entose et est suivie par la dégradation de la cellule internalisée par des enzymes lysosomiales (Overholtzer *et al.*, 2007).

- L'**anoïkis** : déclenchement de l'apoptose de la cellule suite à la perte de contact de cette dernière avec la matrice extra-cellulaire. Cette mort est très proche de l'apoptose. (Frisch et Sreaton, 2001).
- La **cornification** : affecte spécifiquement l'épiderme, notamment les couches superficielles, et est plus communément appelée kératinisation (Candi *et al.*, 2005).
- Deux types de mort affectent spécifiquement le système nerveux : i) L'**excitotoxicité** caractérise la mort neuronale suite à l'hyperactivation du glutamate favorisant l'ouverture des canaux calciques suivie d'une augmentation du calcium cytosolique aboutissant à la mort (Orrenius *et al.*, 2003) ; ii) la **dégénération de Wallerian** est une dégénération de la partie distale d'un axone suite à une section transversale. Cette mort est présente dans le système nerveux central et périphérique et n'affecte pas le neurone lui-même.

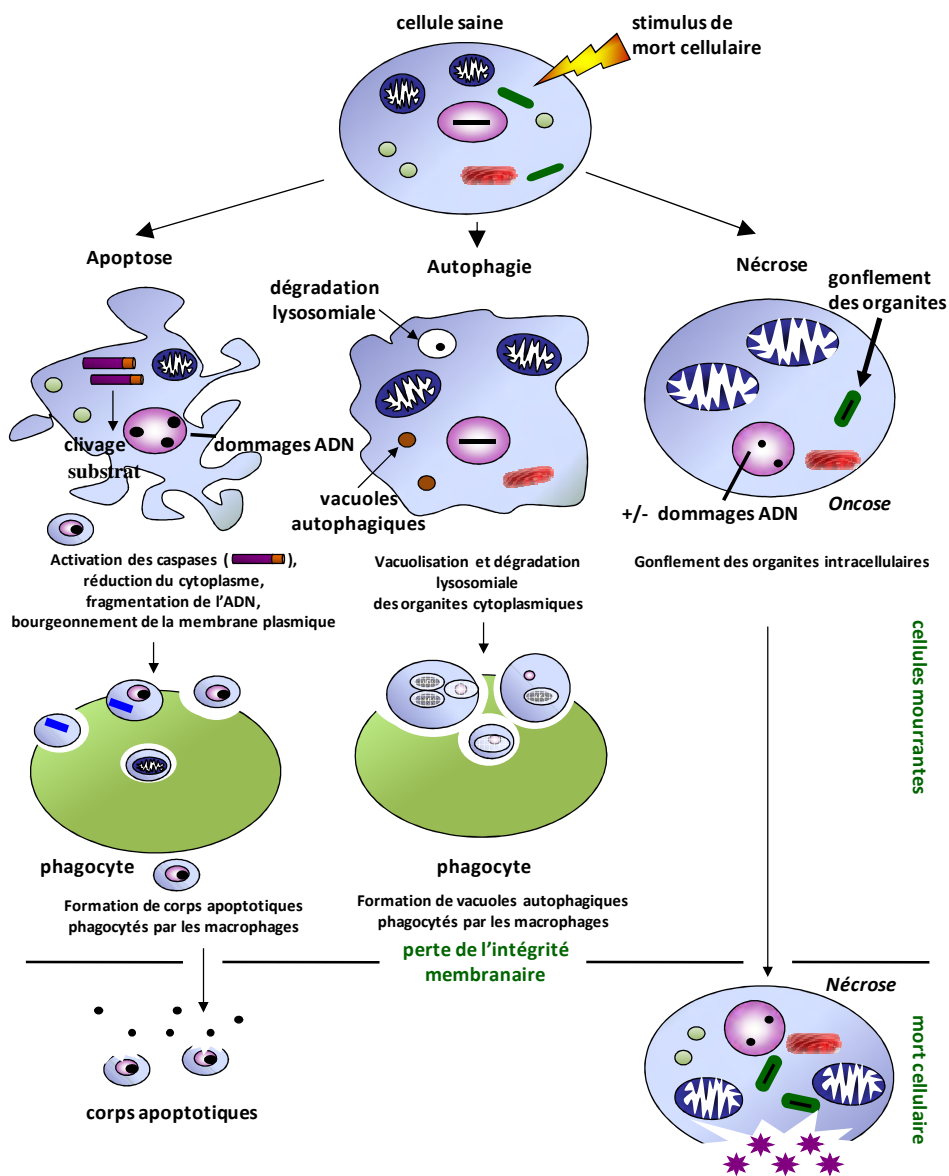


Figure 1 : Les différents types de mort

Les différentes formes de mort cellulaire peuvent être classées selon 4 caractéristiques (Galluzzi *et al.*, 2007). i) La morphologie du processus de mort : la cellule présente-t-elle des caractéristiques propres à l'apoptose, la nécrose... ? ii) Les caractéristiques enzymologiques, qui font référence aux différentes enzymes impliquées à savoir nucléases, protéases (caspases, cathepsines, calpaines) ; iii) Les aspects fonctionnels, qui relatent si la mort est accidentelle vs programmée ou physiologique vs pathologique ; iv) Enfin, le caractère immunogène ou non de la mort.

Pour tous ces types de mort, la mitochondrie est considérée comme l'exécuteur central. En effet, de multiples stimuli de mort convergent à la mitochondrie provoquant une dépolarisation de la membrane mitochondriale et la libération de multiples facteurs. Une fois libéré dans le cytosol, ces facteurs initient la mort programmée de la cellule (Galluzzi *et al.*, 2007 ; Lorenzo et Susin, 2007).

1.3. Autophagie

1.3.1 Généralités

L'autophagie est le plus ancien mécanisme de mort cellulaire programmée décrit en 1842 par Vogt qui étudiait le développement du système nerveux et les métamorphoses des têtards en crapauds accoucheurs (*Alytes obstetricans*). Processus catabolique permettant la dégradation lysosomiale et le recyclage des différents constituants cellulaires, l'autophagie est très conservée au niveau phylogénétique, de la levure aux mammifères. C'est un mécanisme de défense contre les stress aigus tels que la privation en nutriments ou en facteurs de croissance (Boya *et al.*, 2005 ; Baehrecke, 2005) qui peut aussi entraîner la mort cellulaire. On parle alors de mort cellulaire autophagique ou mort cellulaire de type II (Shimizu *et al.*, 2004). L'autophagie est donc, soit une adaptation au stress métabolique, soit une voie alternative de mort cellulaire.

L'autophagie vient du grec et signifie « manger soi-même ». C'est un processus de cannibalisme de la cellule envers elle-même. Mort indépendante des caspases (Shimizu *et al.*, 2004), la mort cellulaire autophagique existe sous 2 formes : i) la mort cellulaire à travers l'autophagie où l'inhibition de l'autophagie inhibe totalement la mort et ii) la mort cellulaire avec autophagie où l'inhibition de l'autophagie va modifier seulement les caractéristiques morphologiques de la mort mais ne changera pas l'issue finale de la cellule (Galluzzi *et al.*, 2007).

A l'heure actuelle, il existe 3 formes d'autophagie : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie dépendante des protéines chaperones ou CMA (chaperone-mediated autophagy) (Yang, *et al.*, 2005). Dans ce travail, nous nous focaliserons sur la macro-autophagie, forme la plus importante et plus communément appelée autophagie (Maiuri *et al.*, 2007b).

L'autophagie se caractérise par l'isolement d'une structure membranaire, le phagofore, puis par la formation d'une vacuole, l'autophagosome qui séquestre de façon non sélective les constituants du cytoplasme (Figure 2). Délimité par une double membrane, l'autophagosome mature en vacuole dégradative pour fusionner avec les lysosomes formant ainsi l'autophagolysosome ou autolysosome. Les hydrolases lysosomiales dégradent le contenu de l'autophagosome (Kroemer et Jaattela, 2005). Les résidus cellulaires obtenus peuvent être réutilisés pour la synthèse de macromolécules nécessaires à la cellule ou pour couvrir les besoins énergétiques au niveau des mitochondries. Une des caractéristiques de l'autophagie est l'absence de condensation de chromatine (Galluzzi *et al.*, 2007). L'autophagie est impliquée dans différents processus tels que : i) le turn-over des protéines à

longue durée de vie, ii) le ciblage d'organites entiers, iii) le ciblage spécifique d'organites particuliers endommagés ou en surnombre. Dans ce dernier cas, on parle de mitophagie si l'autophagie cible les mitochondries ou de réticulophagie si elle cible le réticulum endoplasmique (Shintani et Klionsky, 2004 ; Rubinsztein *et al.*, 2007).

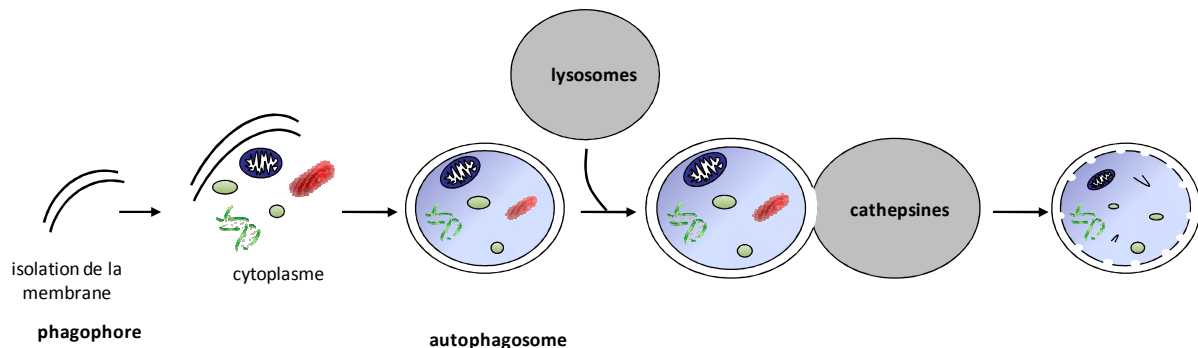


Figure 2 : Schéma des caractéristiques morphologiques de l'autophagie (d'après Maiuri *et al.*, 2007b)

Au cours du temps, de nombreux termes ont été utilisés pour décrire les différentes protéines impliquées dans l'autophagie telles que Aut pour autophagocytose, Aug pour autophagie et Vps pour vacuolar protein-sorting. En 2003 une homogénéisation des termes utilisés a été mise en place: les gènes et protéines impliqués dans ce processus sont dits respectivement ATG ou Atg pour Autophagy related-genes (Klionsky *et al.*, 2003).

1.3.2 Mode d'action

Mis en évidence chez la levure, la plupart des gènes impliqués dans l'autophagie ont des orthologues chez les mammifères (Reggiori et Klionsky, 2002 ; Klionsky *et al.*, 2003) et interviennent dans la formation de l'autophagosome (Yorimitsu et Klionsky, 2005).

A l'heure actuelle, parmi les 11 gènes ATG identifiés, 8 sont impliqués dans 3 complexes distincts dont 2 systèmes de conjugaison (Ohsumi et Mizushima, 2004). Lors de la formation de l'autophagosome, les protéines Atg sont recrutées dans le cytoplasme et s'associent de façon transitoire avec la membrane. Le premier complexe, composé des protéines PI3K et Bécline-1 (cf ci-dessous), produit la phosphatidyl inositol 3-phosphate qui recrute alors le premier des deux systèmes de conjugaison. Ces systèmes sont similaires à l'ubiquitinylation et la sumoylation des protéines (Ohsumi, 2001). Le premier système, composé des protéines Atg5-Atg12, permet l'élongation de la membrane pré-autophagosomale et la formation de la membrane autophagosomale. Ce complexe permet aussi le recrutement du second système, le système Atg8(LC3)-phosphatidylethanolamine (PE). La protéine Atg4 favorise la liaison entre ces 2 partenaires. Seule une fraction du complexe reste associée à la membrane interne de l'autophagosome et est considérée comme un marqueur spécifique de l'autophagosome. Les fonctions exactes des différentes protéines Atg ne sont pas encore connues (Ferraro et Cecconi, 2007).

L'autophagie est présente de façon basale dans les cellules des mammifères. Cependant, elle peut être régulée de façon complexe par de nombreuses voies. Plusieurs oncosuppresseurs régulent positivement l'autophagie alors que certaines oncoprotéines la régulent négativement (Lorin *et al.*, 2008) (Figure 3). La protéine clé de cette régulation est la protéine mTOR (mammalian Target of Rapamycin) qui inhibe l'autophagie en phosphorylant la protéine Atg13, dont l'orthologue chez le mammifère est encore inconnu. Une fois hyperphosphorylée, Atg13 ne peut plus interagir avec les protéines Atg1 et Atg17, inhibant l'induction de l'autophagie. La protéine mTOR est la cible de la rapamycine, considérée donc comme un inducteur de l'autophagie (Ravikumar *et al.*, 2004). La protéine mTOR est régulée positivement par les oncoprotéines Ras, PKB/Akt et négativement par des protéines suppresseurs de tumeurs telles que p53 (Zeng *et al.*, 2007). Le facteur de transcription NF- κ B inhibe aussi l'autophagie en modulant l'état d'oxydoréduction de la cellule. A l'inverse, l'autophagie peut être activée par la protéine p27, protéine suppresseur de tumeur potentielle et inhibiteur du cycle cellulaire. De même, en cas de carence nutritionnelle et en réponse à l'interféron γ , la protéine suppresseur de tumeur DAPK (Death-Associated Protein Kinase), active l'autophagie (Lorin *et al.*, 2008). En plus de son rôle *via* l'inhibition de mTOR, la protéine p53 peut aussi activer l'autophagie en activant directement la protéine DRAM (Damage-Regulated Autophagy Modulator), protéine lysosomiale qui stimule l'accumulation des vacuoles autophagiques (Crichton *et al.*, 2006).

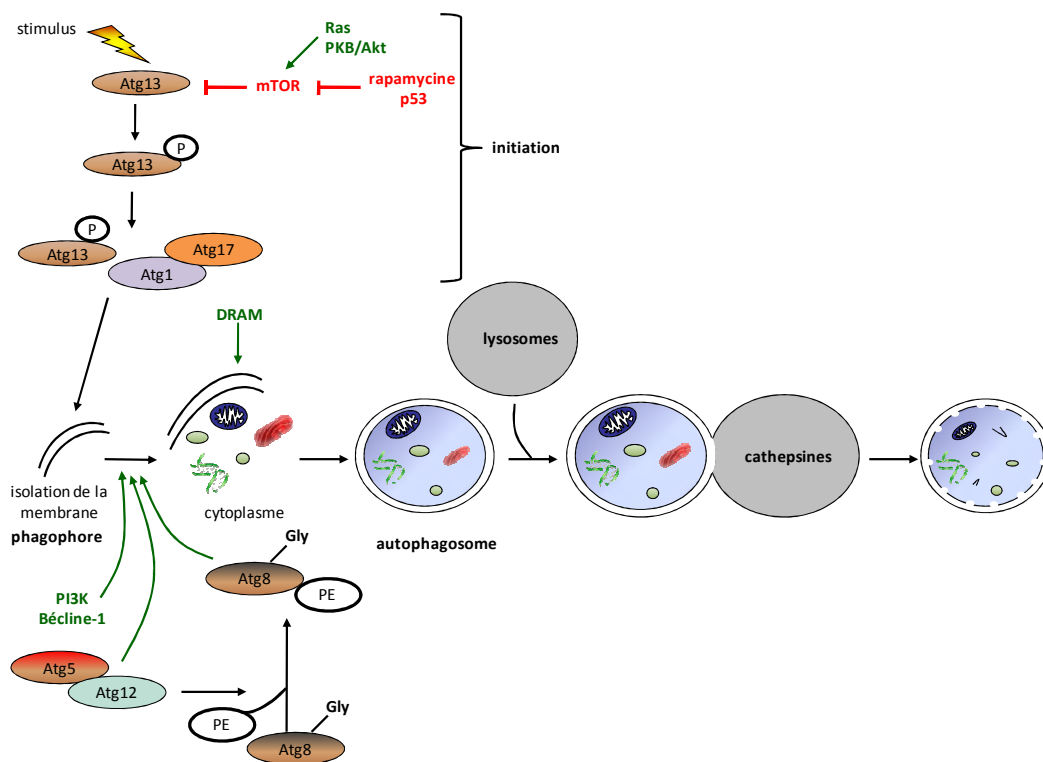


Figure 3 : Régulation de l'autophagie (adapté d'après Maiuri *et al.*, 2007b)

Une autre protéine régulatrice clé de l'autophagie est Bécline-1 (Liang *et al.*, 1999), protéine importante pour la formation de l'autophagosome et dont l'orthologue chez le mammifère est Atg6/Vps30. Bécline-1 est une protéine à domaine BH₃ seul (Oberstein *et al.*, 2007) qui se lie par interaction avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 (Liang *et al.*, 1998 ; Pattingre *et*

al., 2005 ; Maiuri *et al.*, 2007a) au niveau du réticulum endoplasmique, organite clé pour la régulation de l'autophagie (Patingre *et al.*, 2005). La régulation de ces interactions passe par une perturbation compétitive entre les protéines à domaine BH₃ seul et la phosphorylation de Bcl-2 médiée par JNK-1 (c-Jun NH₂-terminal Kinase-1). La phosphorylation de Bcl-2 libère Bcl-2, qui peut donc activer l'autophagie. Le ratio Bcl-2/Bcl-2 est un rhéostat maintenant l'autophagie à un niveau compatible à la survie plutôt qu'à la mort cellulaire. Compte tenu de son étroite relation avec Bcl-2, Bcl-2 joue un rôle clé en tant que suppresseur de tumeur endogène (Levine et Yuan, 2005).

De part sa régulation complexe, une perturbation de l'autophagie peut être liée à certaines pathologies telles que le développement de maladies neuro-dégénératives, certaines formes de myopathies, le cancer et la progression tumorale (Yue *et al.*, 2003 ; Gozuacik et Kimchi, 2004 ; Mizushima, 2005). Lors de la progression tumorale, l'autophagie peut être anti- ou pro-tumorale. En effet, les cellules cancéreuses peuvent avoir besoin de l'autophagie pour survivre en cas de carence métabolique, notamment dans la zone interne de la tumeur, zone où l'angiogenèse est faible (Cuervo, 2004). De plus il a été montré que l'autophagie protégeait certaines cellules cancéreuses des radiations ionisantes (Paglin *et al.*, 2001). Les macromolécules ou organites endommagés seraient éliminés protégeant ainsi les cellules de l'apoptose et permettant aux cellules transformées de survivre (Alva *et al.*, 2004). D'autre part, il a été montré qu'un défaut d'autophagie accélère les dommages génomiques, terrain favorable au développement cancéreux (Mathew *et al.*, 2007).

Cependant, certaines molécules utilisées lors du traitement anti-cancéreux peuvent induire la mort par autophagie. Par exemple, le tamoxifène, utilisé dans le traitement de certains cancers du sein, peut induire l'autophagie probablement *via* une surexpression de Bcl-2 par l'intermédiaire des céramides (Scarlati *et al.*, 2004).

Selon le stade de la tumeur, ses altérations moléculaires, sa sensibilité à la mort et son micro-environnement, l'autophagie peut donc être un mécanisme anti-tumoral ou un mécanisme de survie aboutissant à la progression tumorale. Dans ce contexte, il est important de développer des inhibiteurs chimiques ciblant en particulier certaines réactions mettant en jeu les protéines clés Atg.

1.4. Nécrose programmée

1.4.1 Généralités

Longtemps, la nécrose a été associée à un processus passif et accidentel suite à un stress sévère ou aigu (déficit rapide en nutriments, variation de l'osmolarité, du pH ou de l'environnement) ou un stress physicochimique externe (chaleur, détergent, toxines ou irradiations) (Denecker *et al.*, 2001). Cependant il a été montré que la nécrose pouvait aussi être prédéterminée génétiquement (Golstein et Kroemer, 2007a). En effet, cette mort est observée lors du développement des mammifères afin d'éliminer les chondrocytes responsables de la croissance longitudinale des os (Roach et Clarke, 2000) et intervient aussi chez l'adulte pour le maintien de l'homéostasie tissulaire (Barkla et Gibson, 1999). A l'heure actuelle, la nécrose peut être considérée comme une mort cellulaire programmée (Festjens *et al.*, 2006). On parle de mort cellulaire par nécrose (Necrosis Cell Death ou NCD) ou mort cellulaire de type III. Cette mort est souvent considérée comme une voie de mort alternative (Golstein *et al.*, 2003) et peut être subdivisée en 2 sous-types : i) la mort de type IIIA associée à une

fragmentation du noyau et ii) la mort de type IIIB associée à la dégénération du cytoplasme avec karyolyse (Clarke, 1990).

La nécrose se définit par une destruction traumatique de la cellule suivie de la libération de composants intra-cellulaires. Deux définitions co-existent pour caractériser la nécrose. i) Une définition dite négative où la nécrose est une mort cellulaire ne présentant ni les caractéristiques de l'apoptose ni celles de l'autophagie (Denecker *et al.*, 2001) ; ii) Une définition dite positive basée sur des critères morphologiques. La nécrose se caractérise par la rupture très rapide de la membrane plasmique permettant l'entrée dans la cellule d'eau et d'électrolytes. Cette entrée favorise le gonflement du cytoplasme, gonflement qui fait référence à l'oncose, ainsi que la dilatation des organites tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Okada et Mak, 2004). Toutes ces modifications perturbent la structure nucléaire où la chromatine va être condensée de façon modérée et dégradée par des protéases à sérine telles que les calpaines ou les cathepsines (Bicknell et Cohen, 1995 ; Dong *et al.*, 1997). L'ADN nucléaire est quant à lui dégradé de façon aléatoire en fragments dépourvus d'extrémité 3' (Higuchi, 2003). Le déversement du contenu cytoplasmique, notamment des cytokines, dans l'environnement extra-cellulaire est considéré comme un signal de danger par l'organisme : la nécrose est alors associée à un phénomène inflammatoire local (Festjens *et al.*, 2006 ; Vanden Berghe *et al.*, 2006) activant le système immunitaire inné. Les cellules nécrotiques peuvent donc promouvoir l'inflammation locale, terrain favorable à la croissance tumorale (Vakkila et Lotze, 2004). Cependant, il est à noter que contrairement à la nécrose accidentelle où la réaction inflammatoire est importante, la NCD limite la réaction inflammatoire. L'induction de ce type de mort pourrait donc être efficace contre l'infection virale et certains cancers (Festjens *et al.*, 2006 ; Galluzzi *et al.*, 2007). La clairance des cellules nécrotiques est propre. En effet, elles sont internalisées par un mécanisme de macropinocytose permettant leur prise en charge tardive mais incomplète par les phagocytes (Krysko *et al.*, 2006).

La chronologie et l'ordre entre ces différents événements peuvent varier, ce qui est en faveur d'un système de boucle induisant la nécrose de la cellule par elle-même (Brookes *et al.*, 2004). De plus, même si séparément ces événements ne sont pas propres à la NCD, il semble que l'ensemble caractérise une cascade d'événements programmée et organisée aboutissant *in fine* à la destruction de la cellule par nécrose (Golstein et Kroemer, 2007a). Aucun marqueur seul ne peut être utilisé pour caractériser la NCD excepté la perméabilisation de la membrane plasmique, observable uniquement par microscopie électronique (Galluzzi *et al.*, 2007). Pour caractériser la nécrose, il faut donc combiner différents marqueurs (Krysko *et al.*, 2008).

D'autres voies de mort programmée par nécrose existent, notamment la nécroptose, mécanisme cellulaire de NCD induite par un stimulus apoptotique *via* l'activation des récepteurs de mort membranaires par leurs ligands spécifiques ou suite à un défaut dans l'exécution du processus apoptotique (Degterev *et al.*, 2005).

1.4.2 Mode d'action

La transduction du signal lors de la nécrose se fait en multiples étapes et par différentes voies (Figure 4). Par exemple, le TNF (Tumor Necrosis Factor) va se lier et activer son récepteur, TNF-R1 qui va selon le contexte cellulaire activer à son tour l'apoptose ou la nécrose. Le domaine de mort DD (Death Domain) du récepteur membranaire est un élément clé pour l'activation de la nécrose (Festjens *et al.*, 2006). La protéine RIP-1 (Receptor Interacting Protein-1) est considérée comme

l'initiateur central de la nécrose induite par le TNF (Temkin *et al.*, 2006). En effet, la protéine RIP-1 va inhiber l'ANT (Adenine Nucleotide Translocase) au niveau de la membrane mitochondriale, empêchant son interaction avec la cyclophiline D. Il en résulte un défaut des échanges ADP/ATP, déclenchant la mort cellulaire par nécrose. De plus, suite à des dommages de l'ADN, RIP-1 agit sur la protéine JNK qui va alors favoriser la dépolérisation de la membrane mitochondriale (Yu *et al.*, 2006a) aboutissant à la mort par nécrose. Dans ce dernier cas, la mort par nécrose est considérée comme une voie de sauvegarde lorsque les caspases sont bloquées ou lorsque les voies dépendantes des caspases ne peuvent être activées (Festjens *et al.*, 2006). Il a été aussi montré que RIP-1 était nécessaire à l'accumulation des céramides suite à la nécrose induite par le TNF (Thon *et al.*, 2005). Cependant, RIP-1 a une activité pleiotropique en fonction du contexte. En effet, dans des lignées Jurkat ou U937, le TNF active la caspase-8 qui va à son tour cliver RIP-1 la rendant inactive (Chan *et al.*, 2003a ; Temkin *et al.*, 2006).

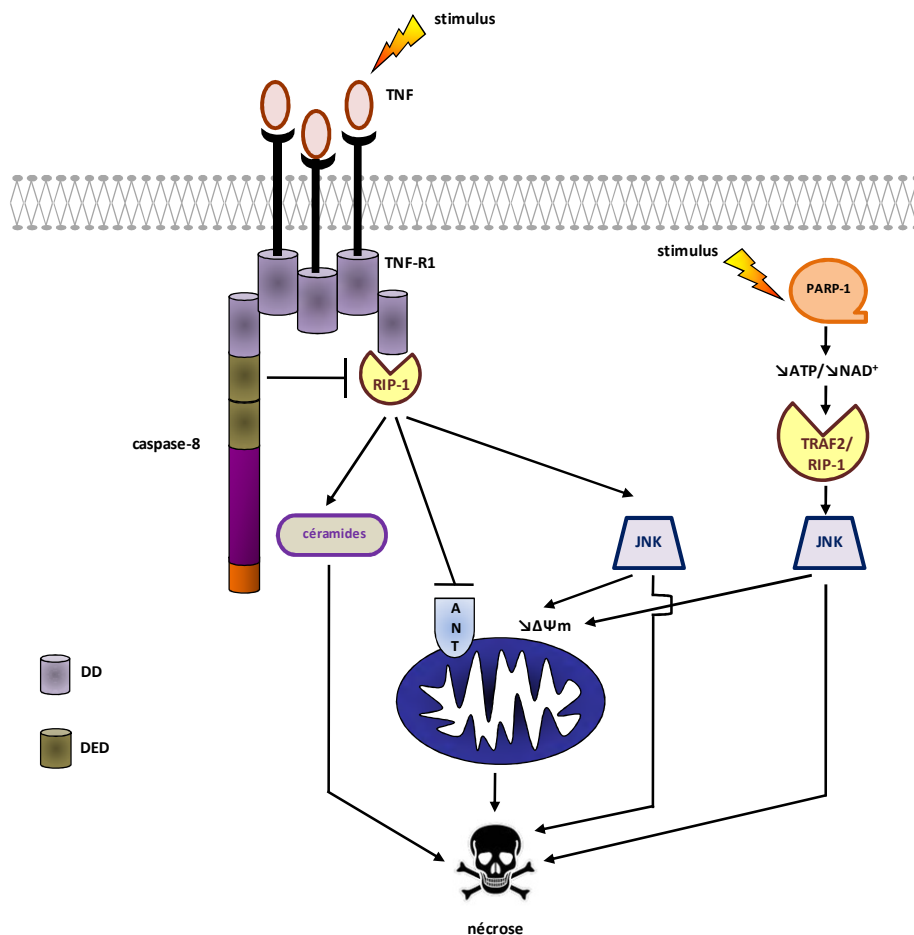


Figure 4 : Mécanisme d'action de la nécrose

Une autre molécule importante dans la régulation de la NCD est la protéine PARP-1 (Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1) (Eliasson *et al.*, 1997 ; Burkart *et al.*, 1999). Un agent alkylant tel que le MNNG (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) entraîne une surexpression de PARP-1. Il s'en suit une déplétion de NAD^+ et d'ATP, ce qui active les protéines TRAF-2 (TNF Receptor-Associated Factor-2) et RIP-1, activant à leur tour la protéine JNK. La protéine JNK modifie certains membres de la famille Bcl-2 (Maundrell *et al.*, 1997 ; Yamamoto *et al.*, 1999) notamment Bid *via* un mécanisme

indépendant des caspases (Deng *et al.*, 2003). L'activité de la protéine JNK affecte l'intégrité de la membrane mitochondriale permettant la libération de protéines de l'espace inter-membranaires et induit *in fine* la nécrose de la cellule (Xu *et al.*, 2006). La protéine PARP-1, tout comme la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor), décrite comme une molécule mitochondriale pro-apoptotique, peuvent aussi bien être impliquées dans la NCD que dans l'apoptose indépendante des caspases. Moubarak et ses collaborateurs ont mis en évidence que ces 2 protéines, ainsi que la protéine Bax, sont nécessaires à la nécrose suite à des dommages alkylants l'ADN par MNNG. La protéine AIF est alors tronquée (t-AIF) *via* un mécanisme dépendant des calpaines permettant *in fine* la condensation de la chromatine en stade I sans fragmentation oligonucléosomale de l'ADN (Moubarak *et al.*, 2007). Cette équipe a aussi montré que cette mort était indépendante de p53. Néanmoins, un faible taux de p53 facilite la NCD. Ainsi, en absence de p53 fonctionnelle, la glycolyse, qui utilise le pool de NAD⁺ cytosolique pour produire de l'ATP, est accrue. Or une surexpression de PARP-1 déplete rapidement ce pool. Dans les cellules cancéreuses, cette augmentation de la glycolyse est en partie responsable de l'effet Warbourg (augmentation de la glycolyse observée dans les cellules et les tissus cancéreux), favorisant l'adaptation des cellules cancéreuses à l'environnement en hypoxie (Gatenby et Gillies, 2004). Ce phénomène contribue aussi à une sensibilité accrue des cellules cancéreuses à la glycolyse et ce, même en conditions aérobiques. Cette adaptation métabolique est dite glycolyse aérobie et est nécessaire à la progression maligne (Magistretti et Pellerin, 1999). Elle permet aux cellules cancéreuses une meilleure résistance à l'hypoxie mais les rend aussi davantage sensibles à la NCD.

1.5. Catastrophe mitotique

1.5.1 Généralités

La catastrophe mitotique est une mort cellulaire programmée différée particulière intervenant pendant ou juste après une mitose défectueuse (Castedo *et al.*, 2004a). Elle a été décrite en premier chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* où les cellules entrent prématurément en mitose suite à une surexpression de cdc2 (cell division control 2) (Russell et Nurse, 1986). Cette mort est le résultat d'une déficience des différents points de contrôle du cycle cellulaire, en particulier ceux concernant la structure de l'ADN et l'assemblage du fuseau mitotique (Castedo *et al.*, 2004a). La catastrophe mitotique est un procédé hautement conservé de la drosophile (Takada *et al.*, 2003) à certains patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Ogawa *et al.*, 2003).

La catastrophe mitotique peut être activée par différents stimuli, physiques ou chimiques, notamment les agents modifiant la stabilité des microtubules (dépoliarisation par la colchicine ou hyperpolarisation par les taxanes) ou les dommages à l'ADN (Roninson *et al.*, 2001). Ainsi un défaut dans la progression et dans les systèmes de contrôle du cycle cellulaire peut stimuler la catastrophe mitotique. Les cellules cancéreuses, fréquemment dépourvues de points de contrôle du cycle cellulaire, sont donc des cibles potentielles pour l'induction de la mort par catastrophe mitotique.

Aucun consensus n'existe concernant les caractéristiques morphologiques de la catastrophe mitotique. Au final apparaissent i) un micronucléi, le plus souvent il s'agit de chromosomes ou de fragments de chromosomes non distribués aux cellules filles, ii) une multinucléation traduisant la présence d'au moins 2 noyaux de taille similaire ou non et qui résultent d'une séparation défectueuse durant la cytokinèse iii) ainsi que des cellules géantes. Une synthèse incomplète d'ADN

ainsi qu'une condensation des chromosomes prématurée sont aussi observées (Ianzini et Mackey, 1997 ; Mackey *et al.*, 1988). Il en résulte une ségrégation chromosomale aberrante aboutissant à l'activation de voies d'auto-destruction et *in fine* à la mort de la cellule (Okada et Mak, 2004). Cependant, dans certains cas, des caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont aussi observés, notamment la condensation de la chromatine en agrégats (Heald *et al.*, 1993).

A l'heure actuelle, 2 sous-types de catastrophe mitotique semblent exister. La catastrophe mitotique i) où la cellule meurt lors de la métaphase et indépendamment de p53 et ii) où la cellule meurt suite à une mitose défectueuse lors de l'activation du point de contrôle de la polyploidie et en partie dépendante de p53 (Castedo *et al.*, 2004a).

1.5.2 Mode d'action

Le point de transition G2→M est caractérisé par le complexe CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1)/cycline B. Active une fois déphosphorylée par CDC25C, la protéine CDK1 s'hétérodimérise avec la cycline B formant le complexe MPF (Mitosis-Promoting Factor). Ce dernier va phosphoryler de nombreux substrats impliqués dans la décomposition de l'enveloppe nucléaire, la séparation des chromosomes, l'assemblage du fuseau ainsi que la condensation de la chromatine. Une fois en anaphase, ce complexe est détruit par le complexe APC (Anaphase-Promoting Complex) et la cellule entre en cytokinèse à la fin de la mitose.

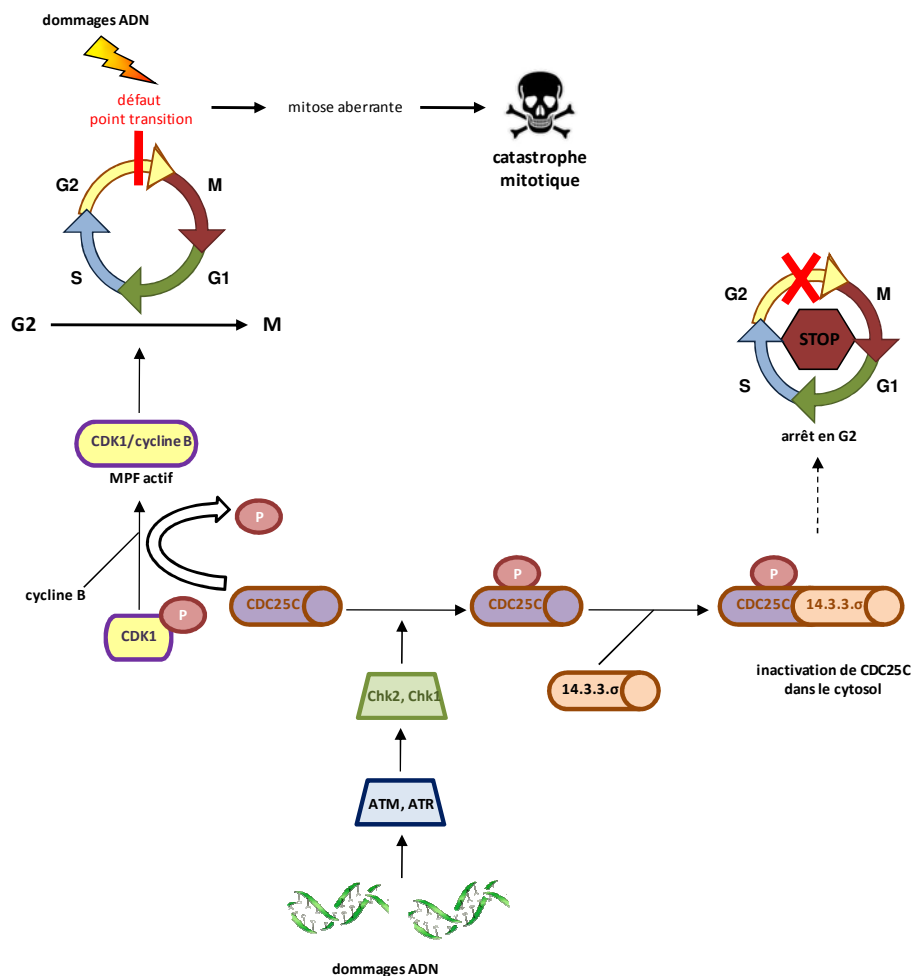


Figure 5 : Représentation schématique de la catastrophe mitotique

Suite à des dommages de l'ADN, le point de transition entre la phase G2 et la phase M bloque la mitose afin de réparer des dommages ou si ces derniers sont trop importants, active l'apoptose de la cellule. Si le point de transition G2→M est défectueux, la cellule entre alors de façon prématurée en mitose, avant que l'ADN ne soit complètement répliqué ou réparé. Il s'en suit une mitose aberrante conduisant à la mort de la cellule par catastrophe mitotique (Castedo *et al.*, 2004a). Cette mort est accompagnée d'une condensation de la chromatine, de la dépolarisation de la membrane mitochondriale, de la libération de la mitochondrie de facteurs apoptotiques, de l'activation de caspases et de la dégradation de l'ADN, c'est-à-dire les éléments clés de l'apoptose (Green et Kroemer, 1998 ; Zamzami et Kroemer, 2003). Les dommages de l'ADN sont détectés par des molécules senseurs appartenant à la famille des PI3K-related kinases (PI3KK), à savoir ATM (Ataxia telangiectasia mutated) et ATR (Ataxia telangiectasia- and RAD3-related). Une fois activées, ces protéines activent à leur tour respectivement Chk2 (Checkpoint kinase 2) et Chk1 (Checkpoint kinase 1) (Figure 5). Ces deux kinases phosphorylent CDC25C, laquelle s'associe alors à 14-3-3 σ , molécule cible de p53. Cette association résulte en la séquestration de CDC25C dans le cytosol et en son inactivation. L'activation du complexe CDK1/cyclineB est ainsi empêchée et le cycle cellulaire s'arrête en G2 (Abraham, 2001).

Ainsi, l'inhibition ou l'inactivation d'un des gènes intervenant dans la transition G2→M favorise la mort de la cellule par catastrophe mitotique (Okada et Mak, 2004). En effet, suite à des dommages de l'ADN, une déplétion de Chk2 entraîne, en plus de l'arrêt en G2, l'activation de la caspase-2 probablement au niveau du noyau. La caspase-2 favorise à son tour la dépolarisation de la membrane mitochondriale aboutissant à l'activation de la caspase 3 puis à la mort de la cellule (Castedo *et al.*, 2004b). Dans ce cas, la catastrophe mitotique peut être considérée comme un cas particulier d'apoptose. En effet, l'inhibition des caspases peut prévenir ou au moins retarder la catastrophe mitotique. De façon surprenante, des inhibiteurs de la dépolarisation de la membrane mitochondriale tels qu'une surexpression de Bcl-2 prévient aussi la catastrophe mitotique (Zamzami *et al.*, 1998). Une surexpression de Bcl-2 favorise aussi la division asymétrique des cellules, générant des cellules aneuploïdes (Kops *et al.*, 2005). La catastrophe mitotique peut donc être considérée comme un mécanisme de lutte contre l'aneuploidie (Castedo *et al.*, 2004a ; Kops *et al.*, 2005).

Dans le cas d'une catastrophe mitotique dépendante de p53, la protéine p53, de part sa fonction transcriptionnelle, initie indirectement la dépolarisation de la membrane mitochondriale. En effet, la fusion de cellules non synchronisées active la synthèse des protéines cibles Bax et PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) lors de la prophase (Roumier *et al.*, 2003 ; Perfettini *et al.*, 2004). Ces protéines gagnent alors la mitochondrie afin de déclencher la dépolarisation de la membrane mitochondriale puis la cascade d'évènements aboutissant à l'activation de la caspase-3 suivie de la fragmentation de l'ADN et de la mort de la cellule (Perfettini *et al.*, 2004).

La catastrophe mitotique est donc un phénomène complexe contrôlé par de nombreuses molécules telles que les différentes kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, p53 et ses différentes cibles (p21 qui intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire en G1, Bax...), les caspases, les membres de la famille Bcl-2 mais aussi la survivine, élément clé pour le maintien de l'intégrité du fuseau qui doit se former rapidement dans les cellules en division. Faiblement exprimé dans la majorité des tissus adultes, la survivine est fortement exprimée dans les cellules à croissance rapide telles que les cellules transformées et les cellules cancéreuses humaines (Altieri, 2003). Un défaut de survivine favorise la catastrophe mitotique. En effet, la survivine est un substrat de CDK1 (Lens *et al.*,

2003). A l'inverse, une surexpression de survivine confère une résistance des cellules cancéreuses à la mort cellulaire (Okada et Mak, 2004).

1.6. Apoptose

A ce jour, l'apoptose ou mort cellulaire programmée de type I est la forme de mort la mieux décrite et la mieux documentée (cf paragraphe 2).

1.7. Choix d'un type de mort

Les différents types de mort cellulaire programmée jouent tous un rôle important chez l'Homme, aussi bien physiologiquement que pathologiquement.

La mort cellulaire programmée est un réseau moléculaire complexe impliquant plus de 150 gènes. Selon les cellules et les stimuli, un seul type de mort peut prédominer. Suite à une lésion ischémique, selon la localisation des cellules affectées, la mort cellulaire pourra se dérouler *via* l'apoptose ou *via* la nécrose. Dans le cas d'une infection par *Salmonella enterica*, les macrophages meurent par autophagie (Hernandez *et al.*, 2003). De plus, le contexte métabolique joue aussi un rôle important dans le choix du type de mort. Par exemple, un fort taux de glucose et d'ATP favorise l'apoptose. A l'inverse, un faible taux tend en faveur de la nécrose (Nicotera *et al.*, 1999). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'exécution de l'apoptose requiert la présence d'ATP (Leist *et al.*, 1997).

De nombreuses connections existent entre les différentes formes de mort permettant des permutations. Dans de nombreux cas, un type de mort n'est pas le seul à être activé. Souvent au minimum deux types peuvent être activés mais l'un prédomine sur les autres. Ainsi, si l'une des voies est inhibée, la cellule peut quand même mourir en activant une seconde voie, présente mais minoritaire. Un exemple de ce mécanisme est l'interconnection existant entre l'autophagie et l'apoptose (Figure 6).

Contrairement à l'apoptose, mécanisme de démolition de la structure et des organites cellulaires rapide, l'autophagie est un phénomène plus lent et restreint au niveau spatial (Galluzzi *et al.*, 2007). Les connections existantes entre ces 2 voies sont complexes et font intervenir des éléments propres à chacune ainsi que des éléments régulateurs (Shintani et Klionsky, 2004). En effet, il a été montré que suite à un faible stress oxydatif, l'autophagie, en tant que mécanisme de défense, pouvait précéder l'apoptose dans certains cas afin de rétablir l'homéostasie. Par la suite, l'apoptose est activée (Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2004). A l'inverse, l'addition de stéroïdes aux glandes salivaires de *Drosophile* active d'abord les caspases suivies de la formation des autophagosomes (Lee et Baehrecke, 2001). De plus, les membres de la famille Bcl-2 sont des éléments clés de la balance entre apoptose et autophagie. En effet, les protéines à domaine BH₃ seul telles semblent exercer deux fonctions : i) elles induisent l'apoptose en se liant aux protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 entraînant la dépoliarisation de la membrane mitochondriale et ii) elles peuvent aussi se lier aux protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, ce qui libère Bcl-1, activant ainsi l'autophagie (Maiuri *et al.*, 2007b).

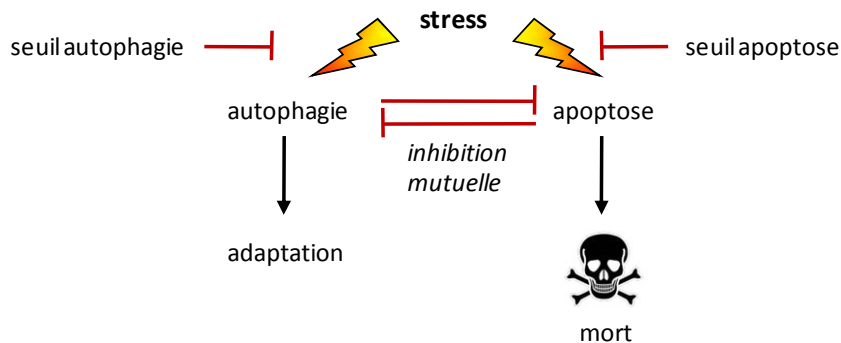


Figure 6 : La balance autophagie vs apoptose (Maiuri *et al.*, 2007b)

La balance apoptose vs autophagie est aussi contrôlée par la protéine autophagique Atg5. Une surexpression de Atg5 active l'autophagie des cellules HeLa et Jurkat, tout comme les traitements par la staurosporine ou CD95, connus pour induire l'apoptose de ces lignées. Cet effet est dû au clivage de Atg5 par des calpaines en un fragment de 24kDa dénommé tAtg5 (truncated Atg5) (Yousefi *et al.*, 2006). La protéine tAtg5 a une activité pro-apoptotique et agit de façon similaire à t-Bid. En effet, tAtg5 est transloquée à la mitochondrie où elle se lie à Bcl-xL permettant la libération du cytochrome *c* (cyt *c*) et *in fine* la mort par apoptose de la cellule (Yousefi *et al.*, 2006). Lors du traitement par la staurosporine, le clivage de Atg5 est aussi observé dans des cellules où l'apoptose est bloquée suite à une surexpression de Bcl-2. Les activités autophagique de Atg5 et pro-apoptotique de tAtg5 sont indépendantes.

Il a été montré qu'une inhibition de l'apoptose pouvait entraîner l'autophagie. En plus des protéines de la famille Bcl-2, une inhibition des caspases, protéases clés de l'apoptose, peut aussi entraîner une commutation de la mort au profit de l'autophagie. L'addition de z-VAD-fmk (z-VAD), inhibiteur de l'ensemble des caspases, sur des cellules Jurkat en apoptose inhibe l'apoptose au profit d'une mort par autophagie. Cet effet serait dû à une inhibition combinée de plusieurs caspases, notamment la caspase-8 considérée comme pouvant être un suppresseur de l'autophagie (Yu *et al.*, 2004) ainsi que d'autres protéases, probablement les calpaines (Madden *et al.*, 2007). Dans des cellules U937 traitées par les lipopolysaccharides, l'addition de z-VAD inhibe l'activité des protéases à cystéine et favorise l'autophagie. Cette dernière est atténuée si les cellules sont traitées par un siRNA Bécline-1 (Yue *et al.*, 2003).

A l'inverse, l'inhibition de l'autophagie peut dans certains cas favoriser l'apoptose. Suite à la dépolarisation de la membrane mitochondriale, les mitochondries sont davantage la cible de la mitophagie (Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2006). Dans ce contexte, l'inhibition de l'autophagie favorise l'induction de l'apoptose *via* la voie intrinsèque (Kroemer et Jaattela, 2005). Cependant, les mitochondries doivent être fonctionnelles pour induire l'apoptose. En empêchant le turn-over des protéines à longue durée de vie, l'inhibition de l'autophagie peut modifier l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques qui ont des demi-vies différentes (Boya *et al.*, 2005). Dans des cellules HeLa ou HCT116 en carence nutritionnelle, l'autophagie permet de recycler les éléments nécessaires à la survie de la cellule. Une inhibition de l'autophagie entraîne rapidement la mort par apoptose (Gonzalez-Polo *et al.*, 2005). Il est à noter que selon l'étape d'inhibition de l'autophagie, différentes alternatives existent. En effet, une inhibition lors des étapes précoces de l'autophagie active l'apoptose. Si cette inhibition intervient lors de la fusion des autophagosomes avec les

lysosomes, par des inhibiteurs de protéines lysosomiales telles que la chloroquine, une forme mixte de mort apoptose plus autophagie est observée (Gonzalez-Polo *et al.*, 2005).

Par ailleurs, il a été montré qu'une inhibition de l'activation des caspases, par inhibition chimique (Golstein et Kroemer, 2005) ou par élimination des activateurs des caspases tels que Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) (Kroemer et Martin, 2005), inhibait l'apoptose des cellules. Néanmoins, ces dernières meurent par nécrose. Ce même changement de phénotype a été observé en inhibant les étapes précoces de l'autophagie, les cellules meurent quand même mais cette fois-ci par nécrose.

Face à la présence de caractéristiques propres à plusieurs types de mort, de nouvelles dénominations ont été élaborées telles que nécroapoptose ou aponécrose (Nicotera et Melino, 2004).

Il est donc important de noter que la distinction des différents types de mort notamment en triade, apoptose vs autophagie vs nécrose, est loin d'être exhaustive. Par ailleurs, les différentes observations concernant la modification de la morphologie des cellules mourantes ont été réalisées principalement *in vitro*. Ainsi *in vivo*, les observations peuvent varier.

Tous ces éléments sont en faveur de l'existence d'une frontière floue entre les différents types de mort cellulaire. Dans ces conditions, une taxinomie claire et précise est difficile à mettre en place.

2. Apoptose

2.1. Historique et définition

L'apoptose, ou mort programmée de type I (PCD I) (Clarke, 1990), fait partie intégrante de la physiologie d'un organisme. Processus actif de mort cellulaire conservé à travers les espèces, l'apoptose est présente chez tous les organismes multicellulaires (Steller, 1995 ; Cicala *et al.*, 1999) : au cours des nombreuses mitoses et différenciations cellulaires aboutissant à la création d'un organisme à partir d'une cellule œuf, l'apoptose permet d'éliminer les cellules superflues ou potentiellement dangereuses. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige sa propre mort.

Ce mécanisme a été décrit en premier par les histologistes. En 1885, Walther Flemming observa que des cellules en décomposition ainsi que des débris cellulaires entouraient les cellules épithéliales des follicules ovariens de mammifères. Il appela ce phénomène la chromatolyse en référence à la disparition du noyau fragmenté (Flemming, 1885). Quelques mois plus tard, Franz Nissen observa ce phénomène dans des glandes mammaires (Nissen, 1886) (Figure 7A).

En 1914, Ludwig Gräper observa que les débris cellulaires étaient pris en charge par les cellules avoisinantes (Gräper, 1914).

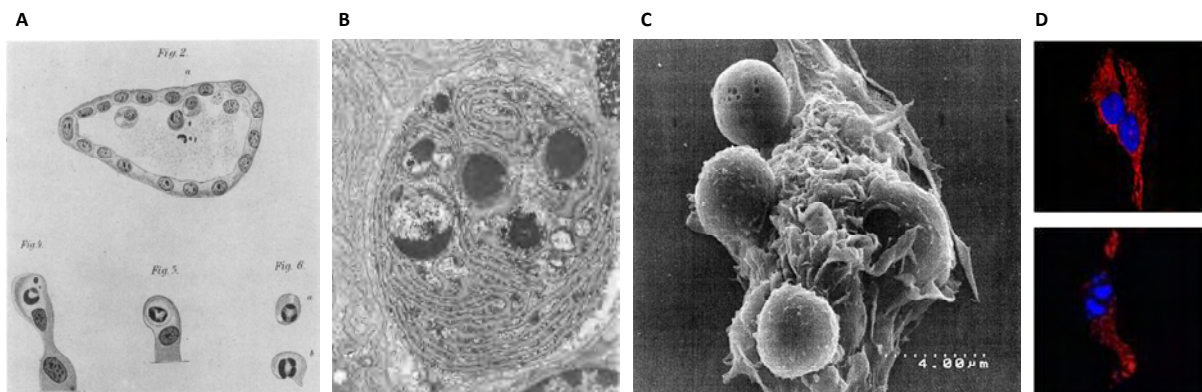


Figure 7 : Mise en évidence de l'apoptose au cours du temps.

A) apoptose des glandes mammaires selon Nissen, étudiant en médecine en 1886 (Majno et Joris, 1995) ; **B)** cellules de prostate de rat en apoptose suite à castration, microscopie électronique (Majno et Joris, 1995) ; **C)** cellules en apoptose phagocytées par un macrophage, microscopie à balayage (Chimini, 2004) ; **D)** cellules HeLa témoin (haut) et apoptotiques (bas) (12 h de staurosporine), microscopie confocale (rouge : mitochondrie ; bleu : noyau) (Nicolier, données non publiées).

La mort cellulaire physiologique ou normale a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens, puis au cours du développement aussi bien chez les invertébrés que chez les vertébrés (Weber, 1964 ; Lockshin et Zakeri, 2001). En 1971 et 1972, Kerr et ses collaborateurs ont décrit une mort cellulaire de même type dans divers tissus et types cellulaires : ces cellules présentaient des caractéristiques morphologiques similaires mais distinctes de celles observées dans des cellules nécrotiques (Kerr *et al.*, 1972). Ils ont suggéré que ces caractéristiques communes pouvaient être le

résultat d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire, qu'ils ont tout d'abord appelé « shrinkage necrosis » (Kerr, 1971) puis « apoptose » (Kerr *et al.*, 1972). Le nom apoptose provient d'un ancien terme grec dont l'origine remonte à Hippocrate et fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne : « *apo* » pour éloignement et « *ptose* » pour chute (Esposti, 1998).

L'apoptose est un suicide cellulaire discret qui met en œuvre une véritable machinerie interne de destruction de la cellule constituée de différentes phases parfaitement orchestrées (Duvall et Wyllie, 1986). L'apoptose se différencie de la nécrose par le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique, évitant tout déversement du contenu cellulaire et prévenant ainsi l'induction d'une réponse inflammatoire suite aux dommages infligés aux tissus avoisinants.

2.2. Rôles physiologiques et pathologies

2.2.1 Rôles physiologiques de l'apoptose

Mécanisme très conservé au cours de l'évolution, l'apoptose est essentielle lors du développement, de l'établissement et du maintien de l'architecture tissulaire. En effet, elle permet la conservation du nombre et de la qualité des cellules (Evan et Littlewood, 1998).

Au cours du développement, l'apoptose permet l'élimination des tissus, des organes transitoires ou des vestiges phylogénétiques. Par exemple, l'apoptose participe à la morphogenèse des doigts en éliminant les cellules de l'espace interdigital des doigts chez l'embryon (Wood *et al.*, 2000) (Figure 8). Chez les amphibiens, l'augmentation de la quantité des hormones thyroïdiennes circulantes induit l'apoptose des cellules de la queue aboutissant à la disparition de cet organe (Nishikawa et Hayashi, 1995). Au cours du développement embryonnaire, la synthèse excessive de neurones entraîne l'élimination par apoptose de 20 à 80% de ces derniers afin de créer un équilibre avec les cibles qu'ils innervent. La connexion neurone/cible se fait *via* le facteur de survie NGF (Nerve Growth Factor) produit par les cibles des neurones (Clarke *et al.*, 1998). Tout neurone n'ayant pas établi de connexion nerveuse *via* son axone est éliminé par apoptose. Lors de la mise en place des systèmes nerveux et immunitaire, l'apoptose assure la différenciation d'un nombre correct de cellules souches. Concernant le système immunitaire, seuls les lymphocytes portant des récepteurs aux antigènes spécifiques vont survivre. Le reste des cellules, c'est-à-dire les lymphocytes auto-réactifs, sera aussi éliminé par apoptose.

L'apoptose intervient aussi chez l'adulte pour maintenir l'homéostasie cellulaire, résultat d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (Jacobson *et al.*, 1997). Lors de la menstruation, les cellules de l'endomètre sont éliminées par apoptose. L'apoptose permet aussi de renouveler les kératinocytes de la peau (Weil *et al.*, 1999), et d'éliminer les lymphocytes T activés en surnombre, les lymphocytes dysfonctionnels ou auto-réactifs. Après la période d'allaitement et en absence du maintien du signal de prolifération/différenciation dû à la prolactine, les acini des glandes mammaires vont se résorber et perdre un nombre important de cellules épithéliales par un processus d'apoptose.



Figure 8 : Différenciation incomplète de deux orteils suite à un défaut d'apoptose

L'apoptose peut être activée par des signaux physiologiques normaux, intra- ou extracellulaires, mais aussi par des stimuli pathologiques. Elle est responsable de l'élimination de cellules endommagées suite à un stress oxydatif, des altérations génétiques, la maladie, un choc thermique ou l'exposition à des agents génotoxiques (chimio- et radiothérapie).

2.2.2 Pathologies liées à l'apoptose

De part son importance biologique, un dérèglement de l'apoptose ou de son contrôle aboutissant à une mort cellulaire excessive ou insuffisante, est à l'origine d'anomalies du développement et de certains pathologies (Thompson, 1995).

Un excès d'apoptose dans le système nerveux central peut induire des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Mattson, 2004), où la perte neuronale conduit à une atrophie cérébrale, la sclérose latérale amyotrophique (Sathasivam *et al.*, 2001) ou la maladie de Parkinson (Tatton *et al.*, 2003). De même, le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) sur-active l'apoptose de cellules T (CD4 et CD8) nécessaires à la défense anti-virale (Roshal *et al.*, 2001).

Un défaut d'apoptose peut aussi causer diverses affections telles que les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde), caractérisées par une apoptose insuffisante des cellules auto-immunes réactives. L'absence d'apoptose peut aussi permettre la survie et la croissance de cellules anormales, qui devraient normalement être éliminées, terrain favorable au processus de cancérogenèse (Thompson, 1995 ; Reed, 1999). Certaines cellules cancéreuses ont d'ailleurs développé des mécanismes de résistance au processus physiologique d'apoptose (Igney et Krammer, 2002).

2.3. Caractéristiques de l'apoptose

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

2.3.1 Aspects morphologiques

Lors de l'apoptose, les changements morphologiques observés sont la rétractation des pseudopodes, la diminution du volume cellulaire ou picnose, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN ou karyorrhexis, peu ou pas de modification des organites cytoplasmiques et le bourgeonnement de la membrane plasmique, laquelle reste intacte jusqu'à la phase terminale du processus (Kroemer *et al.*, 2005). Suite au bourgeonnement de la membrane plasmique, des corps apoptotiques se forment. Ces derniers sont le résultat d'une condensation cellulaire progressive. Ce sont de petites entités contenant des organites cytoplasmiques intacts ou des fragments nucléaires. Par la suite, les corps apoptotiques peuvent être éliminés par les cellules phagocytaires telles que les macrophages sans provoquer de processus inflammatoire dans les tissus (Emoto *et al.*, 1997) (Figure 9). En effet, la formation de corps apoptotiques avec une membrane plasmique intacte prévient la libération des constituants intracellulaires et donc la réaction inflammatoire. Les macrophages ne sont toutefois pas les seules cellules capables de phagocyter les corps apoptotiques. La phagocytose peut aussi se faire *via* les cellules épithéliales hépatiques (Dini *et al.*, 1995) ou les fibroblastes (Hall *et al.*, 1994), ce qui permet le transfert horizontal d'ADN aux cellules vivantes avoisinantes (Holmgren *et al.*, 2002).

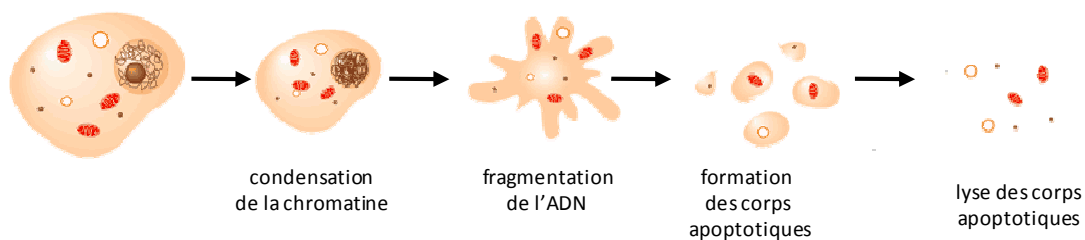


Figure 9 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

L'apoptose est donc une destruction en cascade rapide (quelques heures) de l'ensemble des structures et organites cellulaires (Danial et Korsmeyer, 2004 ; Green, 2005). L'un des points majeurs de l'apoptose est l'absence d'altération de l'intégrité de la membrane plasmique, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cytoplasmique et prévient tout dommage infligé aux tissus alentours.

2.3.2 Aspects biochimiques

Au niveau biochimique, l'apoptose se caractérise par l'externalisation des résidus phosphatidylsérines de la membrane plasmique, la chute du potentiel membranaire mitochondrial et la libération de facteurs apoptogènes de la mitochondrie au profit du cytosol. L'apoptose implique aussi l'activation d'enzymes cataboliques particulières, en particulier des protéases telles que les caspases (cf chapitre 2.4.1). D'autres protéases peuvent intervenir, telles que les calpaines, les cathepsines lysosomiales ou les granzymes (Galluzzi *et al.*, 2007). L'apoptose est donc un processus associé ou non à l'activation des caspases (Kroemer *et al.*, 2005). Une autre caractéristique biochimique de l'apoptose est la dégradation de l'ADN avec un profil caractéristique dit « en barreaux d'échelle », de taille équivalente à des multiples de 180 à 200 paires de bases. Ces

fragments d'ADN résultent de l'activation de l'endonucléase CAD (caspase activated DNase)/DFF40 (DNA fragmentation factor) qui coupe l'ADN entre les nucléosomes (Liu *et al.*, 1997). Cependant ce profil seul ne peut être utilisé pour caractériser l'apoptose puisque celle-ci peut s'effectuer en absence de fragmentation de l'ADN (Kroemer *et al.*, 2005). L'apoptose est aussi associée à la dégradation de certaines protéines cellulaires, telles que les lamines formant la membrane nucléaire ou la fodrine et la gelsoline dont le clivage conduit à une altération du cytosquelette, terrain favorable à la vésiculation membranaire.

2.3.3 Evolution : de *Caenorhabditis elegans* aux Mammifères

Les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose résultent de l'activation de mécanismes cellulaires complexes et variés. Les différents gènes contrôlant ces mécanismes ont d'abord été identifiés chez le ver nématode *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) (Hengartner et Horvitz, 1994b). Les recherches effectuées montrent que sur 1090 cellules produites durant le développement embryonnaire de *C.elegans*, 131 meurent par apoptose et pour certaines d'entre elles, cette mort s'effectue moins d'une heure après leur naissance (Ellis et Horvitz, 1986 ; Sulston et Horvitz, 1977). L'analyse de mutants génétiques a permis de mettre en évidence 11 gènes impliqués dans l'apoptose dont 4 jouant un rôle clé dans la régulation de ce processus : *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* (*Caenorhabditis elegans* death) et *egl-1* (*Egg-laying defective-1*).

Dans les mutants où *ced-3* et *ced-4* sont inactivés, la totalité des 1090 cellules survit. Les gènes *ced-3* et *ced-4* sont donc requis pour l'initiation et l'exécution de l'apoptose. A l'inverse, dans les mutants *ced-9*^{-/-}, l'ensemble des cellules de l'embryon meurt. Le gène *ced-9* agit en amont de *ced-3* et *ced-4* et code une protéine qui inhibe leurs activités pro-apoptotiques (Hengartner *et al.*, 1992). Le dernier gène clé régulant l'apoptose est le gène *egl-1* qui agit en amont des gènes *ced-9*, *ced-4* et *ced-3* et régule négativement l'activité de *ced-9* (Metzstein *et al.*, 1998).

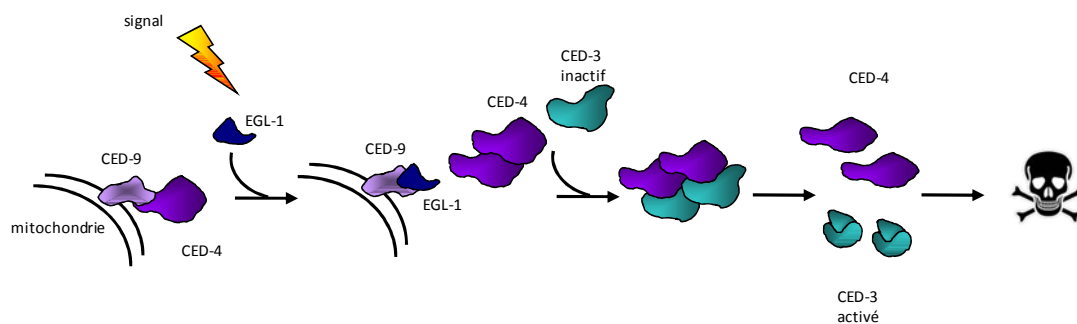


Figure 10 : Activation de l'apoptose chez le ver nématode *c.elegans*

Les analyses fonctionnelles des interactions des produits de ces gènes ont permis de définir un modèle d'activation de l'apoptose (Figure 10). Ainsi, la protéine anti-apoptotique Ced-9 interagit avec la protéine pro-apoptotique Ced-4, empêchant l'activation de Ced-3. Suite à un stimulus de mort cellulaire, la protéine Egl-1 se lie à Ced-9, la rendant inactive et libérant la protéine Ced-4. Les protéines pro-apoptotiques Ced-4 et Ced-3 s'oligomérisent entraînant l'activation de Ced-3 puis la mort de la cellule.

Des homologues de ces gènes ayant des rôles similaires dans la régulation de l'apoptose ont été découverts chez les Mammifères (Figure 11). La protéine Ced-3 est une protéase à cystéine de 56 kDa homologue à l'enzyme de conversion de l'interleukine-1- β humaine ou ICE (Interleukine-1 converting enzyme) appelée par la suite caspase-1 (Yuan *et al.*, 1993). La protéine ICE est davantage impliquée dans le déroulement du processus inflammatoire que dans l'apoptose mais elle a permis d'identifier une famille de protéases à cystéine, les caspases, enzymes clés de l'apoptose chez les Mammifères (cf chapitre 2.4.1). Synthétisée sous forme d'une pro-enzyme, la protéine Ced-3 contient un pro-domaine et 2 sous-unités de 17 et 15 kDa. Au sein du prodomaine, la protéine Ced-3 possède un domaine CARD (Caspase recruitment domain), ce qui lui permet d'interagir avec d'autres protéines possédant elles aussi un domaine CARD, comme la protéine Ced-4. Cette association Ced-3/Ced-4 est nécessaire pour l'activation par protéolyse de Ced-4. L'homologue mammifère du gène *ced-4* correspond à Apaf-1 (Zou *et al.*, 1997). Le complexe formé par les protéines Ced-3 et Ced-4 est un complexe multiprotéique apparenté à l'apoptosome observé chez les Mammifères (Chinnaiyan *et al.*, 1997 ; Otilie *et al.*, 1997). Les homologues mammifères du gène *ced-9* correspondent à une famille de gènes codant les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, régulateurs clés de l'apoptose notamment par leur action au niveau de la mitochondrie (cf chapitre 2.4.3.2) (Hengartner et Horvitz, 1994a). Le gène *Egl-1* a quant à lui des homologies fonctionnelles et moléculaires avec les gènes codant les protéines pro-apoptotiques à domaine BH₃ seul de la famille Bcl-2 (cf chapitre 2.4.3.2).

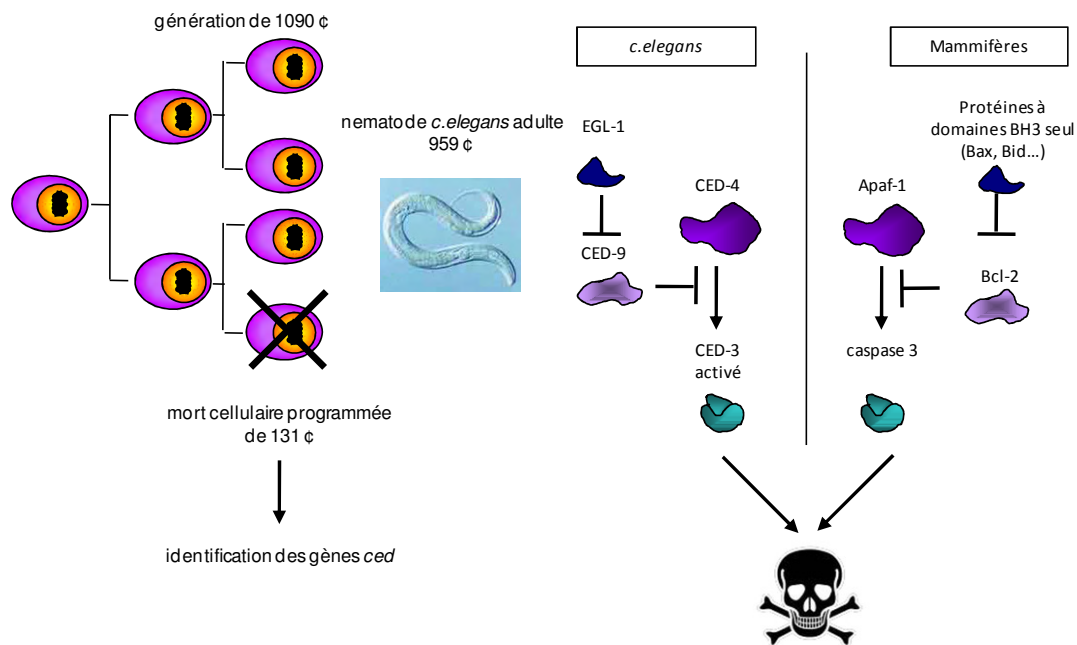


Figure 11 : Apoptose chez le vers nématode *C. elegans* et homologie avec les Mammifères

2.4. Différentes voies apoptotiques

Nous avons observé précédemment la difficulté à établir une taxinomie ordonnée. La même problématique se pose concernant l'apoptose à proprement parler. En effet, l'apoptose caractérise un type de mort cellulaire particulier mais plusieurs sous-types co-existent. Ces sous-types présentent les mêmes caractéristiques morphologiques et se différencient par l'activation de voies distinctes pouvant interagir entre elles. Deux grandes voies d'activation de l'apoptose sont classiquement décrites : la voie dite extrinsèque ou des récepteurs de mort membranaires et la voie dite intrinsèque ou mitochondriale. Chaque voie comporte au minimum 3 phases distinctes : i) l'initiation, ii) la prise de décision/l'intégration et iii) la phase exécutive/la dégradation (Kroemer *et al.*, 1997).

2.4.1 Caspases, famille de protéases importantes

2.4.1.1. Définition

Les principales protéases impliquées dans la mort par apoptose dont l'archétype est Ced-3 identifié chez le ver nématode *C.elegans* (Yuan *et al.*, 1993) sont regroupées au sein d'une même famille (Thornberry *et al.*, 1992). Ces enzymes sont des protéases à cystéine caractérisées par une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu aspartique (D). Depuis 1996, ces protéases apoptogènes sont regroupées au sein d'une même nomenclature sous le terme CASPASE (Cystein Aspartic Acid Protease) (Alnemri *et al.*, 1996) où le « c » fait référence à la cystéine du centre actif (QACXG), pentapeptide très conservé et « aspase » à la spécificité stricte de clivage des substrats de ces protéases après un acide aspartique.

A ce jour, 14 caspases ont été identifiées chez les Mammifères dont 10 ont des homologues chez l'Homme. Chronologiquement, la protéine ICE a été la première caspase identifiée et a été rebaptisée caspase-1. Parmi cette famille, au moins 8 caspases jouent un rôle important lors de l'apoptose (Shi, 2002).

2.4.1.2. Structure des caspases

Une structure très conservée comprenant 3 domaines caractérise l'ensemble des caspases. Le prodomaine situé à l'extrémité NH₂-terminale est de taille et de séquence variable, le domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (17 à 24 kDa) renferme le site actif de l'enzyme et le dernier domaine deviendra après clivage la petite sous-unité (10 à 14 kDa) (Figure 13). Les deux derniers domaines sont liés par un domaine de liaison.

Selon leur fonction, les caspases peuvent être classées en 2 groupes (Figure 12) (Rupinder *et al.*, 2007). i) **Les caspases dites inflammatoires** (caspases-1, -4, -5, -13, -14, -m11 et -m12) sont impliquées dans la maturation des cytokines (IL-1 β , IL-18) contenues dans les stocks intra-cellulaires (Tschopp *et al.*, 2003). ii) **Les caspases dites apoptotiques** transduisent et exécutent les signaux de mort. Ces dernières sont sub-divisées en 2 sous-groupes : les caspases initiatrices (caspases-2, -8 ou FLICE (FADD-like IL-1 β converting enzyme), -9 et -10) sont impliquées dans l'initiation de l'apoptose en activant les caspases effectrices ou exécutrices (caspases-3, -6 et -7). Les caspases initiatrices peuvent aussi être répertoriées en 2 catégories selon la nature du stimulus : les caspases

extrinsèques, qui regroupent les caspases-8 et -10, et les caspases intrinsèques, qui regroupent les caspases-2 et -9. Dans notre étude, nous nous focaliserons sur les caspases dites apoptotiques (Kumar, 2007).

La taille des prodomaines permet aussi de classer les caspases. Il semble que les caspases à prodomaine long activent celles à prodomaine court (Kumar et Colussi, 1999). Par ailleurs, les prodomaines semblent jouer un rôle important dans les interactions protéine/protéine. En effet, les prodomaines des caspases-8 et -10 abritent un domaine effecteur de mort (DED : Death Effector Domain) permettant un recrutement par les récepteurs à domaine de mort *via* des molécules adaptatrices FADD (Fas Associated Death Domain) (Boldin *et al.*, 1995) ou TRADD (TNF R1-Associated Death Domain) (Hsu *et al.*, 1995). D'autres caspases (caspases-2, et -9) ont des domaines CARD, domaine médiateur des interactions entre Apaf-1 et la procaspase-9 (Li *et al.*, 1997). De même, la caspase-2 semble pouvoir s'associer aux récepteurs de mort *via* son domaine CARD avec la molécule adaptatrice RAIDD/CRADD (Duan et Dixit, 1997). Ainsi, les prodomaines des caspases permettent de lier le stimulus apoptotique à l'activation des caspases.

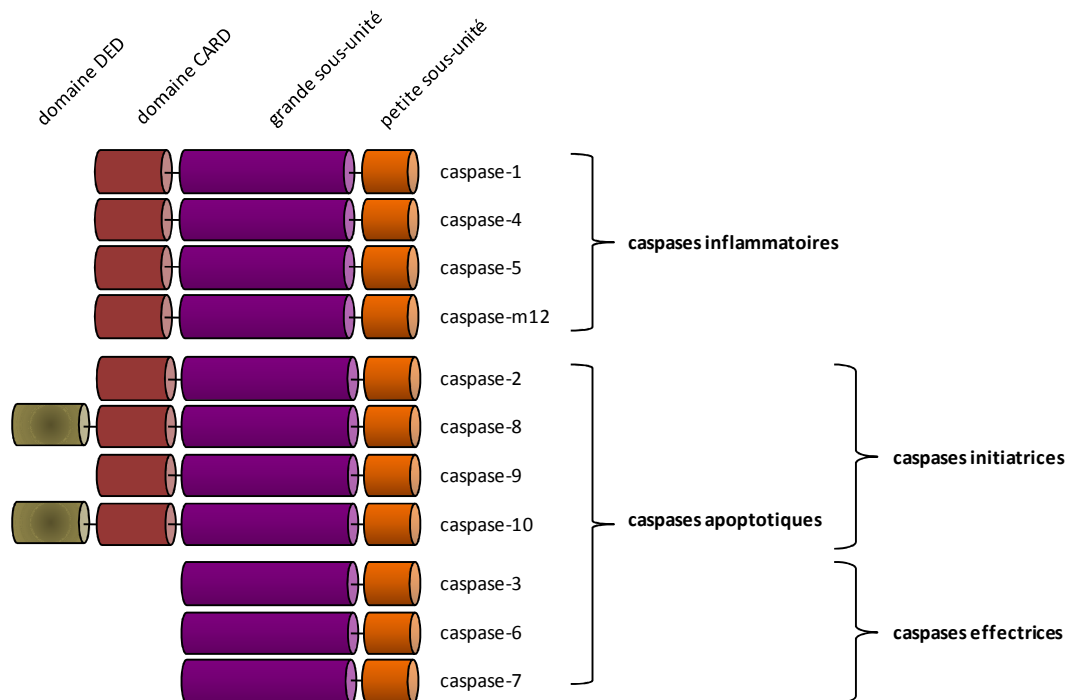


Figure 12 : Classification des caspases (d'après Rupinder Rupinder *et al.*, 2007)

2.4.1.3. Activation des caspases

Le mot caspase est un terme générique employé pour désigner l'ensemble des protéases à cystéine impliquées dans la mort cellulaire. Les caspases peuvent être retrouvées sous deux formes : par convention, le terme procaspase désigne la proenzyme inactive et le terme caspase l'enzyme sous sa forme active. Par commodité, le terme caspase peut aussi désigner une caspase inactive.

La conversion de la procaspase en une caspase mature se fait par deux clivages successifs et séquentiels au niveau de la liaison D 296 (acide aspartique en 296)-X (Figure 13). La première

coupure a lieu entre la grande et la petite sous-unité et permet de libérer cette dernière du reste de la molécule et conduit à la perte du domaine de liaison. Le second clivage a lieu au niveau du résidu aspartique 119 et permet la libération du prodomaine. Présentes sous forme de dimères, les procaspases effectrices doivent être clivées afin de générer deux grandes et deux petites sous-unités. Les procaspases initiatrices existent quant à elles, sous forme monomérique et elles doivent se dimériser ou s'oligomériser pour être activées. Cette activation peut se faire sans clivage protéolytique (Salvesen et Abrams, 2004).

La caspase s'assemblera sous sa forme active en homodimère, composé de 2 grandes sous-unités et de 2 petites sous-unités (Walker *et al.*, 1994 ; Rotonda *et al.*, 1996). L'activation des caspases conduit à des changements conformationnels de la protéine aboutissant à la formation du site de fixation du substrat à l'enzyme. Ce site de fixation est composé de 4 sites notés S1 à S4. Les sites S1 et S3 sont quasiment identiques pour toutes les caspases et les emplacements des sites S2 et S4 sont très conservés (Shi, 2002). La composition du site S4 détermine quant à elle la spécificité de la caspase pour les substrats. Une poche hydrophobe volumineuse en S4 est propre aux caspases-8 et -9.

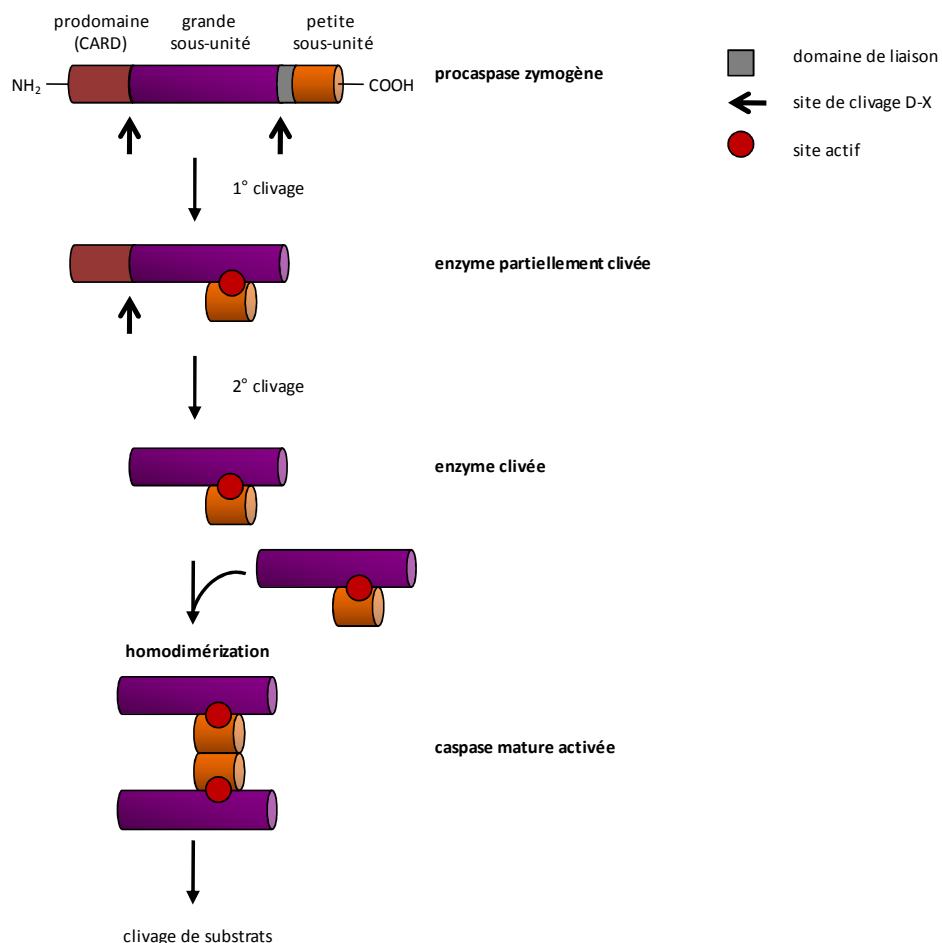


Figure 13 : Activation en cascade des caspases

Les caspases peuvent s'auto-activer (auto-activation) et/ou être activées par d'autres caspases (trans-activation) aboutissant à une activation en cascade des caspases. Ainsi la suite d'évènements conduisant à une apoptose dépendante des caspases comporte 3 étapes : une induction réversible

comprenant l'activation des caspases initiateuses ; une phase exécutive finement régulée mettant en jeu les caspases effectrices et une phase de démantèlement de la cellule avec clivage de nombreuses protéines cibles.

2.4.1.4. Substrats des caspases

Suite à leur activation, les caspases clivent un grand nombre de protéines cellulaires, aboutissant au démantèlement de la cellule puis à sa mort par apoptose. Les caspases ne s'engagent pas dans une digestion aléatoire mais sont des endopeptidases extrêmement sélectives. En effet, un certain nombre de protéines cellulaires sont des protéines cibles des caspases et leur clivage intervient au niveau d'une séquence térapeptidique P4-P3-P2-P1 très conservée. Le clivage a lieu après l'acide aspartique requis en P1. Ce résidu va se nicher dans la poche S1 de l'enzyme activée. On peut noter qu'une quelconque substitution en P1 diminue de 100 fois l'activité protéolytique de la caspase-1 (Sleath *et al.*, 1990). Certaines caspases peuvent aussi cliver après un résidu glutamate (E) (Hawkins *et al.*, 2000 ; Srinivasula *et al.*, 2002). La nature des résidus P2, P3 et surtout P4 définit l'affinité des caspases pour leur substrat (Garcia-Calvo *et al.*, 1998). Pour l'ensemble des caspases des Mammifères, le résidu P3 est un résidu glutamate (E) (Thornberry et Lazebnik, 1998). Ainsi chez les Mammifères, le site préférentiel de clivage des caspases est X-E-X-D. De plus, la séquence de clivage peut être propre à une ou à plusieurs caspases (McStay *et al.*, 2008). Ces différents acides aminés P1 à P4 sont reconnus par les sites de liaison au substrat S1 à S4 situés sur l'enzyme active. Chaque site de liaison s'associe par de multiples interactions à un acide aminé du substrat, ce qui permet le clivage de ce dernier.

Une centaine de protéines ont été décrites comme étant des substrats des caspases (<http://www.casbah.ie>) (Luthi et Martin, 2007 ; Timmer et Salvesen, 2007). Il s'agit de protéines impliquées dans la structure du cytoplasme et du noyau (fodrine, caténines, kératines, lamines), dans la transduction du signal, dans la transcription [SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein), STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription 1)], dans le contrôle du cycle cellulaire (p21, p27), dans la réplication (Topoisomérase I) et la réparation de l'ADN (PARP). L'un des premiers substrats des caspases identifié est la protéine PARP dont le clivage par la caspase-3 compromet son activité de réparation favorisant ainsi la mort de la cellule (Tewari et Dixit, 1995). La protéine PARP peut aussi être clivée par les caspases-7 ou -9. Ce clivage sépare le domaine de liaison à l'ADN de PARP de son domaine catalytique (D'Amours *et al.*, 1999). Il en résulte une inhibition des réparations ainsi qu'une activité excessive de PARP, induisant un épuisement des stocks en NAD⁺ et donc un défaut de synthèse d'ATP. Ces événements perturbent l'équilibre énergétique de la cellule (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999 ; D'Amours *et al.*, 1999). Les conséquences fonctionnelles (activation ou inhibition) du clivage des protéines cibles sont donc très variables.

Un grand nombre de substrats des caspases sont des protéines structurales dont le clivage est nécessaire au démantèlement de la cellule. Par exemple, le clivage de la vimentine par les caspases-3, -6 et -7 est en partie responsable du démantèlement des filaments intermédiaires (Byun *et al.*, 2001) et celui de la protéine acinus par la caspase-3 intervient dans la condensation de la chromatine (Sahara *et al.*, 1999).

Un des principaux mécanismes étudiés concerne l'activation de nucléases aboutissant à la fragmentation de l'ADN. La caspase-3 clive la sérine/thréonine kinase DNA-PK (DNA-Activated Protein Kinase) impliquée dans la fragmentation de l'ADN (Mandal *et al.*, 1999). La nucléase

CAD/DFF40 coupe l'ADN génomique entre les nucléosomes en fragments multiples de 180-200 paires de bases. Cette nucléase est activée suite au clivage en 2 sites de sa forme inactive ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase)/DFF45 par la caspase-3 (Enari *et al.*, 1998 ; Sakahira *et al.*, 1998). Ce clivage permet la libération et la translocation au noyau de CAD/DFF40 (Liu *et al.*, 1998) où elle induit la fragmentation de l'ADN génomique (Mitamura *et al.*, 1998).

D'autres substrats des caspases sont des régulateurs clés de l'apoptose et peuvent être activés ou inhibés par clivage. Le clivage de telles cibles, et donc l'activation de molécule pro-apoptotiques, peut amplifier le processus apoptotique. Tel est le cas lorsqu'une caspase initiateur active par clivage les procaspases effectrices conduisant ainsi à une activation dite « en cascade des caspases ». De plus, la protéine pro-apoptotique Bid est activée suite à son clivage par la caspase-8 (Li *et al.*, 1998 ; Luo *et al.*, 1998). A l'inverse, le clivage des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL conduisant à leur inactivation, favorise la mort (Cheng *et al.*, 1997 ; Xue et Horvitz, 1997).

2.4.1.5. Régulation des caspases

Des modèles cellulaires où certaines caspases sont déficientes ont permis de mettre en évidence des voies de compensation pour l'activation des caspases (Zheng *et al.*, 2000). Un déficit en caspase-3 peut être compensé par la présence des caspases-6 et -7 alors qu'un déficit en caspase-9 est quant à lui compensé par les caspases-2 et -6 (Zheng *et al.*, 2000). Une activation inopportune des caspases pourrait conduire à des effets dévastateurs. C'est pour cela que l'activation des caspases est soumise à une régulation étroite, qui se fait à différents niveaux :

i) **Au niveau transcriptionnel**, les gènes des procaspases peuvent être transcrits et subir un épissage alternatif en plusieurs ARNm différents (Wang, L. *et al.*, 1994 ; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1995a, 1995b ; Boldin *et al.*, 1996). Par exemple, les gènes des caspases-2, -3 et -9 peuvent générer des isoformes courtes [procaspase-2S (Droin *et al.*, 2001), caspase-2L-Pro (Droin *et al.*, 2000), procaspase-3S (Huang *et al.*, 2001) et procaspase-9b (Seol et Billiar, 1999 ; Srinivasula *et al.*, 1999) qui régulent négativement l'apoptose. Les procaspases sont détectables dans la plupart des types cellulaires mais les niveaux d'expression varient, notamment la procaspase-3 (Krajewska *et al.*, 1997). Le niveau d'expression des procaspases est régulé au niveau transcriptionnel. Le taux d'expression de l'ARNm de certaines caspases, notamment la caspase-2, est modulé par un traitement à l'étoposide (Droin *et al.*, 1998). Une méthylation du promoteur du gène de la caspase-8 diminue l'expression de cette protéine dans les neuroblastomes de l'enfant et induit une résistance de ces cellules à l'apoptose induite par la cytokine TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) (Teitz *et al.*, 2000 ; Fulda *et al.*, 2001).

ii) **Au niveau protéique**, des variations d'expression existent aussi. L'expression des caspases-3 et -6 est faible dans les cellules HeLa et CaSki et celle de la caspase-8 est faible dans les cellules SiHa voire indétectable dans les cellules C33A (Arechaga-Ocampo *et al.*, 2008).

Par ailleurs, des **inhibiteurs naturels** régulent les caspases (Callus et Vaux, 2007). Par exemple, la protéine p35, synthétisée par le baculovirus, peut inhiber de nombreuses caspases (caspases-1, -2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10) *in vitro* et *in vivo* (Miller, 1999) sans inhiber les protéases à sérine ni les autres protéases à cystéine. Codée par un gène précoce du virus de la vaccine (cowpox virus), la protéine CrmA (Cytokine response modifier A) est l'unique serpine (inhibiteur des sérines protéases) capable

d'inhiber les caspases-1 et -8 (Zhou *et al.*, 1997). Une fois clivées par une caspase, ces deux protéines virales, p35 et CrmA, se lient aux caspases empêchant la dégradation de nouveaux substrats, ce sont donc des inhibiteurs compétitifs (Komiyama *et al.*, 1994 ; Bump *et al.*, 1995).

Les **IAPs** (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Dubrez-Daloz *et al.*, 2008) sont des protéines inhibitrices des caspases puisqu'en interagissant avec ces dernières, elles empêchent leur liaison avec leurs substrats (Shiozaki *et al.*, 2003). Chez l'Homme, 8 IAPs ont été identifiées et sont caractérisées par la présence à l'extrémité NH₂-terminal d'au moins un domaine BIR (Baculovirus IAP Repeats) de 70 kDa. Ces domaines sont essentiels pour lier et inhiber les caspases (Liston *et al.*, 2003). Parmi elles, les protéines XIAP (X linked IAP), c-IAP1 (cellular-inhibitor of apoptosis protein 1) et c-IAP2 possèdent trois domaines BIR permettant d'interagir avec la procaspase-9, ce qui prévient son activation au sein de l'apoptosome mais elles peuvent aussi interagir avec les caspases-3 et -7. En plus de son rôle clé pour le maintien de l'intégrité du fuseau mitotique (cf chapitre 1.5.2), la survivine est une IAP abritant un domaine BIR et peut inhiber les caspases-3 et -7 (Ambrosini *et al.*, 1998 ; Grossman *et al.*, 2001). De plus, il existe des inhibiteurs de ces IAPs. En effet, l'interaction des protéines Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP Binding protein with low pI), HtrA2 (High temperature requirement protein A2)/Omi (Chai *et al.*, 2000 ; Martins, 2002) et XAF1 (XIAP-Associated Factor-1) avec les IAPs les inactivent. Contrairement à Smac/DIABLO ou à HtrA2/Omi, XAF1 n'a pas besoin d'un signal d'activation et peut constitutivement interagir avec XIAP (Liston *et al.*, 2001). Exprimée dans la plupart des tissus normaux, XAF1 est présente en très faible quantité voire indétectable dans certaines cellules tumorales (Fong *et al.*, 2000).

Les **protéines de stress ou de choc thermiques** (HSP : Heat Shock Protein) sont activées en réponse à différents stimuli de mort et leur effet peut amplifier ou diminuer le signal de mort (Parcellier *et al.*, 2003). Chez les Mammifères, les HSPs sont divisées en deux groupes : les grandes HSPs telles que HSP90, HSP70 et HSP60 et les petites HSPs telles que HSP27. En plus de leur rôle de molécules chaperonnes (Bukau et Horwich, 1998), certaines HSPs jouent un rôle clé dans la régulation des caspases. La protéine HSP27 (Garrido *et al.*, 2006a) peut séquestrer le *cyt c* cytosolique (Bruey *et al.*, 2000) bloquant alors la formation de l'apoptosome. La protéine HSP27 peut aussi inhiber l'activation de la procaspase-3 en se fixant directement sur cette dernière (Pandey *et al.*, 2000a) et inhiber la redistribution de Bid (Paul *et al.*, 2002). Quant à elle, la protéine HSP70 (Garrido *et al.*, 2006a) protège les cellules de l'apoptose en prévenant l'activation des caspases, les dommages mitochondriaux et la fragmentation nucléaire (Buzzard *et al.*, 1998). En effet, HSP70 empêche le recrutement et l'activation de la procaspase-9 au sein de l'apoptosome (Beere *et al.*, 2000 ; Saleh *et al.*, 2000). HSP70 prévient aussi l'apoptose indépendante des caspases en se liant à AIF par une liaison ATP-indépendante et en inhibant la condensation de la chromatine induite par AIF (Ravagnan *et al.*, 2001). Selon le stimulus apoptotique, la protéine HSP90 stimule ou prévient le signal de mort. Dans des conditions physiologiques, HSP90 inhibe l'apoptose induite par la staurosporine et prévient l'activation des procaspases en système acellulaire (Pandey *et al.*, 2000b). HSP90 interagit directement avec Apaf-1 en bloquant son oligomérisation et le recrutement de la procaspase-9 (Pandey *et al.*, 2000b). HSP90 peut aussi stabiliser la protéine PKB (protéine kinase B)/Akt qui peut donc exercer sa fonction anti-apoptotique en phosphorylant plusieurs acteurs impliqués dans le contrôle de l'apoptose tels que Bad et la procaspase-9 (Sato *et al.*, 2000).

iii) **Au niveau post-traductionnel**, des modifications, telles que la phosphorylation ou la S-nitrosylation peuvent moduler l'activité de certaines caspases. Par exemple, la phosphorylation au niveau de la sérine 196 de la procaspase-9 par la kinase Akt inhibe l'activité protéolytique de la

caspase-9 (Cardone *et al.*, 1998). La kinase Akt est incapable de phosphoryler les procaspases-3, -6 ou -7. A son tour, la kinase Akt peut être inhibée par la staurosporine (Hill *et al.*, 2001). L'activité optimale des caspases se produit donc dans un environnement réducteur et le moindre changement dans les conditions réductrices à l'intérieur d'une cellule peut rendre les caspases inactives. Le peroxyde d'hydrogène module le statut rédox de la cellule en oxydant des résidus cystéines des caspases, ce qui supprime l'activation des caspases et bloque leur activité (Hampton et Orrenius, 1997).

iv) **Au niveau de la localisation sub-cellulaire**, les caspases sont avant tout cytosoliques. Cependant, certaines d'entre elles ont été localisées dans des compartiments cellulaires, notamment la mitochondrie, le noyau, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. La séquestration des procaspases dans certains compartiments subcellulaires pourrait les séparer de leurs substrats et leur relocalisation pourrait contribuer à accroître la spécificité avec laquelle telle ou telle enzyme clive un substrat donné. Présente dans l'espace intermembranaire mitochondrial dans la plupart des organes et des lignées cellulaires (Susin *et al.*, 1999a ; Zhivotovsky *et al.*, 1999), la procaspase-9 est transloquée au cours de l'apoptose dans le cytosol où elle est activée. Ces événements sont bloqués par une surexpression de Bcl-2 (Susin *et al.*, 1999b). La procaspase-3 est aussi présente dans l'espace intermembranaire mitochondrial de divers tissus et lignées cellulaires (Mancini *et al.*, 1998) où elle est complexée aux protéines HSP60 et HSP10 (Samali *et al.*, 1999). Lors de l'apoptose, la procaspase-3 est libérée dans le cytosol où elle est activée et cette activation est accélérée par HSP60 et HSP10 (Samali *et al.*, 1999). Par la suite, la procaspase-3 et/ou la caspase-3 sont transloquées du cytosol vers le noyau (Nakagawara *et al.*, 1997 ; Zhivotovsky *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 2000) où la caspase-3 pourra cliver ses protéines cibles, aboutissant à la condensation de la chromatine et à la fragmentation de l'ADN. Lors de l'apoptose induite par un engagement des récepteurs de mort membranaires, les procaspases-8 et -10 gagnent la membrane plasmique où elles participent à la formation du DISC (Death Inducing Signaling Complex) avant d'être activées par oligomérisation (Ashkenazi et Dixit, 1998). La procaspase-8 a aussi été détectée dans les mitochondries (dans l'espace intermembranaire, dans la membrane interne, dans la matrice mitochondriale) et le noyau de fibroblastes humains et de cellules murines. Un signal apoptotique favorise la translocation de la procaspase-8 de la mitochondrie vers le cytosol où elle est activée (Qin *et al.*, 2001).

v) Enfin, des **activateurs exogènes** tels que le granzyme B peuvent amplifier le signal pro-apoptotique en activant directement les caspases. Le granzyme B est une protéase à sérine, aspartate spécifique, localisée dans les granules des cellules T cytotoxiques. La perforine et le granzyme B coopèrent pour induire l'apoptose dans les cellules tumorales ainsi que dans les cellules infectées par des pathogènes. La perforine perméabilise la cellule cible en formant des pores, permettant le passage du granzyme B dans le cytoplasme (Trapani, 2001). Le granzyme B active alors les procaspases initiateuses telles que la procaspase-8 mais aussi les caspases effectrices (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1995a , 1995b ; Chinnaiyan *et al.*, 1996 ; Darmon *et al.*, 1996). Le granzyme B peut aussi cliver directement Bid (Sutton *et al.*, 2000) et provoquer la libération du cyt c sous le contrôle de Bcl-2 et Bax (Pinkoski *et al.*, 2001). Le granzyme B peut ainsi amplifier le signal apoptotique en activant directement les caspases ou en utilisant directement la voie mitochondriale (Atkinson *et al.*, 1998 ; Barry *et al.*, 2000).

2.4.2 Voie des récepteurs de mort membranaires

2.4.2.1. Présentation

La voie apoptotique des récepteurs de mort membranaires ou voie extrinsèque est activée suite à la liaison spécifique d'un ligand à un récepteur de mort (DR : Death Receptor) présent au niveau de la membrane plasmique (Figure 14). Ces récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs du TNF. Ce sont des protéines trans-membranaires de type I (Nagata, 1997) comportant une partie extra-cellulaire riche en cystéine (Beutler et van Huffel, 1994) et une partie intra-cytoplasmique présentant un domaine de mort (DD). Ce domaine permet la transduction du signal de mort (Fesik, 2000 ; Inoue *et al.*, 2000). Actuellement, on distingue 6 récepteurs de mort capables d'induire la mort de la cellule (Vermeulen *et al.*, 2005) :

- DR-1, TNF-R1 ou CD120a;
- DR-2, Fas, Apo-1 ou CD95 ;
- DR-3, TRAMP, Apo-3 ou LARD ou WSL1;
- DR-4 ou TRAIL-R1 (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptor-1) ou Apo-2;
- DR-5, TRAIL-R2, KILLER ou TRICK2 ;
- DR-6.

Les ligands sont des protéines de type II et appartiennent à la famille du TNF qui compte plus de 20 membres (Nagata et Golstein, 1995). FasL (Fas Ligand) et TRAIL peuvent aussi exister sous forme soluble suite à la protéolyse de la forme membranaire respectivement par une métalloprotéase (Kayagaki *et al.*, 1995) ou par une protéase à cystéine (Mariani et Krammer, 1998). La majorité des membres de cette famille active des signaux impliqués dans la réponse immunitaire, la différenciation et la survie. Seulement trois sont impliqués dans la mort : TNF- α qui active TNF-R1, FasL qui se lie à Fas et TRAIL qui active DR-4 et DR-5 (Igney et Krammer, 2002). Les ligands de mort sont exprimés dans divers types cellulaires afin d'éradiquer les cellules transformées (Locksley *et al.*, 2001).

L'engagement d'un récepteur de mort peut conduire à l'apoptose dépendante des caspases (Enari *et al.*, 1995 ; Longthorne et Williams, 1997). Après fixation du ligand spécifique, le récepteur se trimérise entraînant son activation. Il recrute alors des protéines intracellulaires par interactions homotypiques pour former un complexe multiprotéique (Locksley *et al.*, 2001). Le domaine de mort intracytoplasmique du récepteur recrute une protéine adaptatrice possédant également un domaine de mort (FADD pour les récepteurs Fas, DR-4 et DR-5 ; TRADD pour le récepteur TNF-R1). En plus du domaine de mort, la molécule adaptatrice FADD possède aussi un domaine effecteur de mort (DED) permettant le recrutement des procaspases-8 ou -10. Le complexe ainsi formé est appelé le DISC ou casposome et permet l'activation autocatalytique de la procaspase-8/-10 en caspase-8/-10, laquelle est alors libérée. Selon la quantité de caspase-8 activée, deux issues sont envisageables (Ozoren et El-Deiry, 2002) (Figure 14) :

- i) Si la caspase-8 est activée en grande quantité, on parle de cellules de type I telles que les lymphocytes (Scaffidi *et al.*, 1998). Au sein du DISC, l'oligomérisation des procaspases-8

induit leur activation très rapide (dans les 5 secondes suivant la fixation du ligand) par autoprotéolyse (Martin *et al.*, 1998 ; Salvesen et Dixit, 1999 ; Kidd *et al.*, 2000). Le clivage de la procaspase-8 libère la sous-unité p18 lentement convertie en sous-unité active p16 (Scaffidi *et al.*, 1998). De grands agrégats ou clusters de ligand et récepteur se forment avant d'être finalement internalisés, ces 2 étapes étant dépendantes de la caspase-8 activée et de l'actine (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002). La formation de clusters de ligands se fait dans une région de la membrane où les filaments d'actine sont déstructurés (Kulms *et al.*, 2002). La caspase-8 active alors les caspases effectrices sous-jacentes telles que la caspase-3 et ce, dans les 30 minutes suivant l'interaction ligand/récepteur (Scaffidi *et al.*, 1998). Le clivage de la procaspase-3 libère le fragment p20, lequel est par la suite converti en p17, sous-unité active (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996). Une fois activées, les caspases effectrices vont alors cliver leurs protéines cellulaires cibles aboutissant *in fine* à la mort de la cellule.

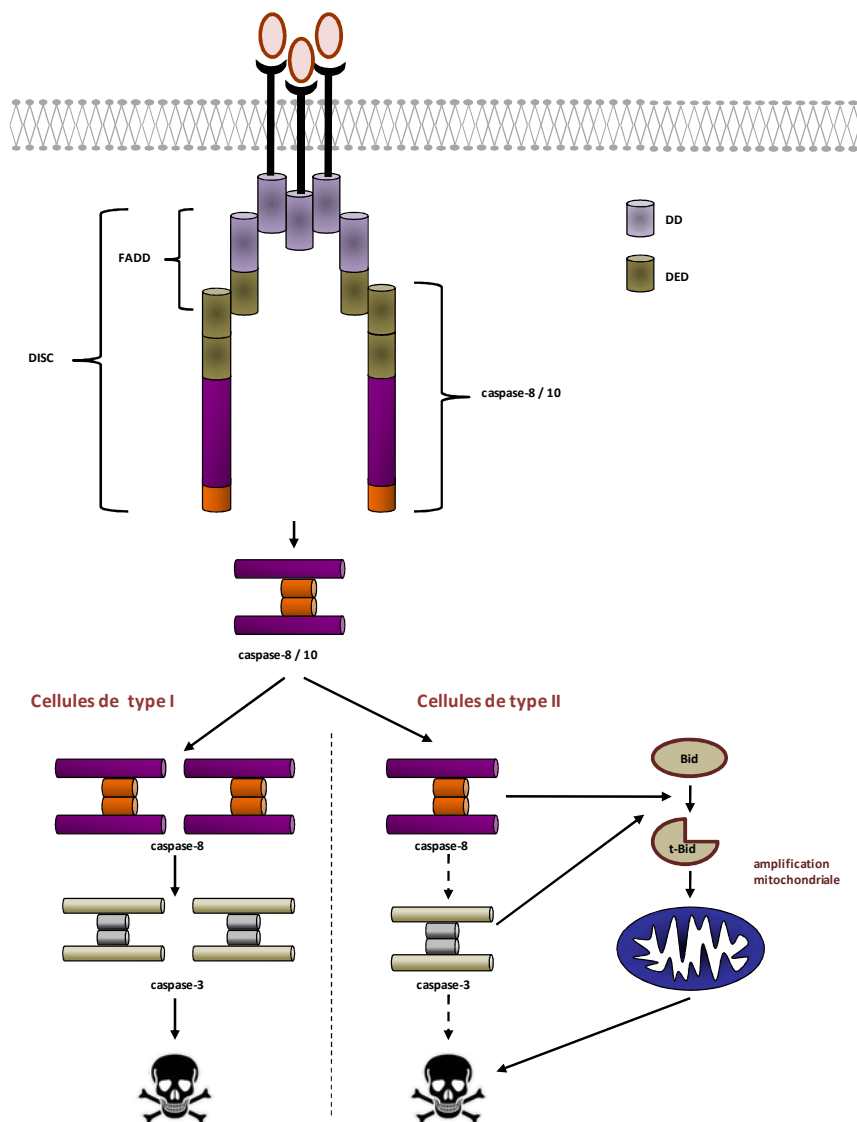


Figure 14 : La voie des récepteurs de mort

- ii) Dans les cellules de type II telles que les hépatocytes, la quantité de caspase-8 activée est trop faible, rendant impossible une activation directe des caspases effectrices. Une très faible quantité de procaspase-8 est activée au sein du DISC, les clusters formés sont de petite taille, leur formation est indépendante de la caspase-8 et les complexes ne sont pas internalisés (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002). L'activation des caspases-8 et -3 est alors plus tardive et génère des fragments de clivage différents : le clivage de la procaspase-8 libère p16, sans clivage intermédiaire, et celui de la procaspase-3 libère directement p17, sans passer par p20 (Scaffidi *et al.*, 1998). Dans ce contexte, le signal est amplifié par la voie apoptotique mitochondriale. La faible quantité de caspase-8 au niveau du DISC suffit au clivage de Bid, membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 et dont la séquence LETD est reconnue par la caspase-8, en t-Bid (Thornberry *et al.*, 1997). Ce dernier est alors transloqué à la mitochondrie (Gross *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 1998) où il permet l'activation de la voie apoptotique mitochondriale en agissant de concert avec Bax et Bak (cf chapitre 2.4.3.2) (Luo *et al.*, 1998). Par ailleurs, la protéine Bid peut aussi être clivée par la caspase-3, ce qui peut constituer une boucle d'amplification du phénomène (Slee *et al.*, 2000).

L'engagement d'un récepteur de mort peut aussi générer un signal de survie *via* l'activation du facteur de transcription NF- κ B ou de prolifération *via* l'activation des molécules ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2) (Budd, 2002). De plus, par l'intermédiaire de la protéine RIP (cf chapitre 1.4.2), l'engagement du récepteur de mort TNF-R1 peut conduire à la nécrose associée à la production d'espèces réactives à l'oxygène (Holler *et al.*, 2000).

2.4.2.2. Différents systèmes ligand/récepteur

A l'heure actuelle, 3 systèmes ligand/récepteur impliqués dans l'apoptose sont décrits dans la littérature (Figure 15):

- Système TNF- α /TNF-R1

Concernant ce système, 2 types de complexe ont été décrits :

- Le complexe I est un complexe membranaire composé de TNF-R1, TRADD-1, la kinase RIP-1, TRAF-2 et c-IAP1 qui active la signalisation de survie *via* NF- κ B ;
- Le complexe II est un complexe cytoplasmique dans lequel TRADD et RIP-1 dissociés du TNF-R1 s'associent à FADD et à la procaspase-8 conduisant à la mort de la cellule en l'absence d'activation de NF- κ B (Micheau et Tschopp, 2003).

- Système FasL/Fas

Ce système semble jouer un rôle dans l'homéostasie du système immunitaire (sélection clonale des lymphocytes autoréactifs, limitation de l'expansion clonale...) et dans l'activité cytotoxique des cellules immunitaires (T et NK) (Krammer, 2000). Ce modèle est similaire au modèle TRAIL/TRAIL-R développé ci-dessous.

Ces deux systèmes FasL/Fas et TNF- α /TNF-R1 sont des voies d'activation importante pour le maintien de l'immunité. En effet leur activation permet l'élimination de cellules cancéreuses qui prolifèrent mais des effets toxiques sur les cellules normales sont observés, limitant ainsi leur développement en thérapeutiques. Dans ce contexte, le TNF- α a été approuvé seulement en traitement combiné avec une perfusion de membre isolé sur des tissus de sarcome mou (Grunhagen *et al.*, 2006).

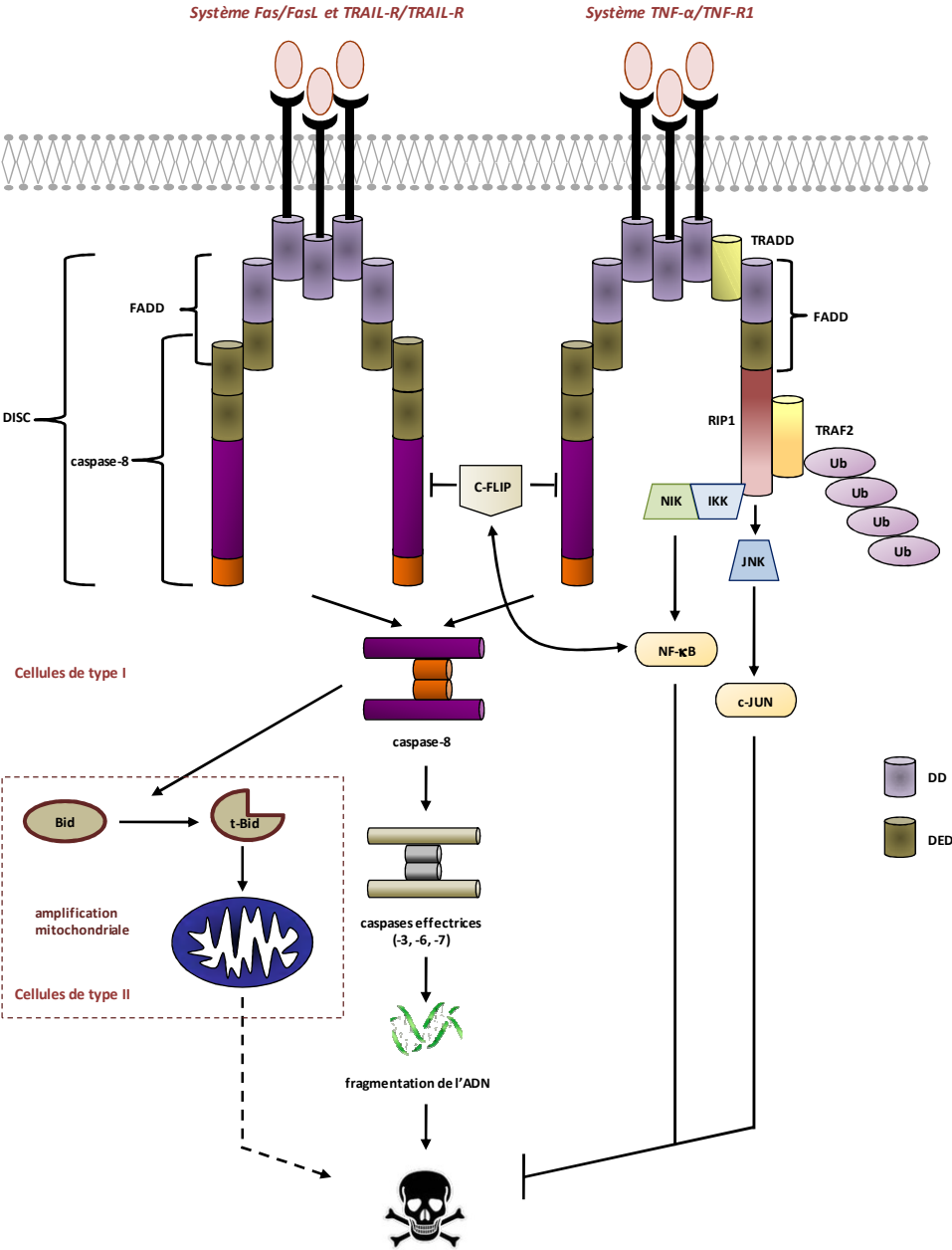


Figure 15 : Les différents systèmes ligands/récepteurs de mort

- Systeme TRAIL/DR-4 ou DR-5

Ce système est certainement le plus intéressant d'un point de vue thérapeutique. En effet, TRAIL induit spécifiquement l'apoptose des cellules tumorales, sans affecter la viabilité des cellules saines voisines (Wiley *et al.*, 1995 ; Pitti *et al.*, 1996). Bien que TRAIL et ses récepteurs DR-4/TRAIL-R1 et DR-5/TRAIL-R2 soient exprimés de façon constitutive dans la majorité des tissus, leur interaction induit rapidement la mort uniquement des cellules cancéreuses (Wiley *et al.*, 1995 ; Pitti *et al.*, 1996). Cette spécificité semble être liée à l'expression de récepteurs leurres (DcR : Decoy Receptor) présents à la surface de la cellule et qui lient TRAIL sans induire la cascade apoptotique car ils sont dépourvus de site catalytique (LeBlanc et Ashkenazi, 2003). A l'heure actuelle, trois récepteurs leurres ont été identifiés : DcR1 ou TRAIL-R3, DcR2 ou TRAIL-R4 et l'ostéoprotégérine circulante (OPG) (Falschlehner *et al.*, 2007). Ces récepteurs leurres sont considérés comme un important mécanisme de contrôle de l'apoptose induite par TRAIL (Emery *et al.*, 1998 ; Clancy *et al.*, 2005). En effet, l'expression différentielle de récepteurs leurres entre cellules cancéreuses et cellules normales pourrait participer à l'induction sélective de l'apoptose médiée par TRAIL. Par ailleurs, il a été montré récemment que les récepteurs leurres inhibent différemment l'apoptose induite par TRAIL (Merino *et al.*, 2006) : DcR1 entre en compétition avec les récepteurs agonistes et bloque ainsi la signalisation apoptotique de TRAIL alors que DcR2 est inclus dans le DISC aux côtés de DR-5 et inhibe l'activation de la caspase-8. Dans ce contexte, beaucoup de travaux sont menés afin d'utiliser le système TRAIL/TRAIL-R en thérapie anti-cancéreuse (Carlo-Stella *et al.*, 2007 ; Huang et Sheikh, 2007). Par exemple, un recombinant TRAIL est actuellement en essai clinique de phase I (Camidge, 2007) et un anticorps monoclonal agoniste de TRAIL-R humain, le lexatumomabe, est en essai clinique de phase II (Marini, 2006).

En plus de son rôle d'inducteur de l'apoptose, TRAIL est aussi impliqué dans les voies de signalisation de survie et de prolifération médiées par NF- κ B, JNK ou les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Kimberley et Screaton, 2004 ; Kruyt, 2008)). Les radeaux lipidiques, connus pour favoriser la transduction du signal médiée par FasL (Cremesti *et al.*, 2001 ; Chaigne-Delalande *et al.*, 2008), sont des microdomaines de la membrane plasmique enrichis en sphingolipides et en cholestérol régulant la signalisation à la surface cellulaire (Simons et Toomre, 2000). Ces radeaux renferment différentes protéines clés dans l'apoptose, notamment FADD, procaspases-8 et -10, Bid, caspase-3, JNK (Fleischer *et al.*, 2006) et Bad (Fleischer *et al.*, 2004). Dans les cellules cancéreuses de poumon non à petites cellules (NSCLC) sensibles à TRAIL, les DISCs assemblés au sein des radeaux lipidiques permettent l'activation de la caspase-8 alors que les DISCs formés en dehors des radeaux favorisent le recrutement de c-FLIP (cellular-FLICE Inhibitory Protein) et RIP, aboutissant à l'activation d'un signal de pro-survie tel que l'activation de NF- κ B ou ERK1/2 (Kruyt, 2008).

2.4.2.3. Régulation

La voie apoptotique extrinsèque est une voie multi-étapes dont chaque événement est contrôlé par différentes protéines afin d'éviter toute activation inappropriée.

Les inhibiteurs endogènes les mieux décrits sont les membres de la famille FLIP encore appelée CASH/Flame-1/CLARP/MRIT/usurpine. A l'heure actuelle, 3 variants issus d'épissage alternatif ont été décrits : c-FLIP_L, transcrit le plus long, c-FLIP_S, isoforme le plus court, et c-FLIP_R (Golks *et al.*, 2005).

Présentant 2 domaines effecteurs de mort, ces variants sont des isomorphes de la caspase-8 mais sont dépourvus de site actif (Irmiler *et al.*, 1997). Ils sont donc recrutés au niveau du DISC prévenant ainsi l'activation de l'apoptose (Xiao *et al.*, 2002). Les variants c-FLIP_S et c-FLIP_R ont des fonctions similaires en bloquant le recrutement et l'activation de la caspase-8 au sein du DISC par inhibition compétitive avec la procaspase-8 (Falschlehner *et al.*, 2007). Le rôle de la protéine c-FLIP_L est quant à lui controversé. En effet, c-FLIP_L peut être anti-apoptotique en agissant de façon analogue à c-FLIP_S (Thome et Tschopp, 2001) mais elle peut aussi avoir une activité pro-apoptotique en facilitant l'activation de la caspase-8 cytosolique au sein du DISC (Chang *et al.*, 2002 ; Dohrman *et al.*, 2005). En effet, des souris déficientes en c-FLIP_L présentent le même phénotype que celles déficientes en caspase-8 ou en FADD (Rasper *et al.*, 1998 ; Yeh *et al.*, 1998 ; Yeh *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que c-FLIP altère la formation du DISC au sein des radeaux lipidiques induisant une résistance des cellules NSCLC à l'apoptose induite par TRAIL (Song *et al.*, 2007).

La voie apoptotique extrinsèque est régulée aussi par de nombreux oncogènes tels que c-Myc. Répresseur transcriptionnel de c-FLIP, c-Myc facilite l'assemblage du DISC (Ricci *et al.*, 2004b). De plus, c-Myc active l'expression de DR-5 et facilite l'activation de la caspase-8 (Wang *et al.*, 2004). La protéine c-Myc inhibe la transcription de gènes régulateurs clés tels que *Mcl-1* et *c-IAP2*, ce qui bloque l'activation dépendante de NF- κ B et favorise la mort par apoptose induite par TRAIL (Ricci *et al.*, 2007). D'autres oncogènes peuvent faciliter l'activation de la voie apoptotique extrinsèque, notamment E2F-1, la cycline D1 ou des oncogènes viraux tels que E1A de l'adénovirus (Nieminen *et al.*, 2007).

Certains composants spécifiques de la matrice extra-cellulaire peuvent aussi favoriser la mort par voie extrinsèque dans différents types cellulaires tels la glycoprotéine EMILIN-2 (Elastin Microfibril Interface-Located Protein 2) (Mongiat *et al.*, 2007). Cette voie peut aussi être régulée par les protéines IAPs et HSPs (cf chapitre 2.4.1.5) ainsi que par des protéines kinases. En effet, l'activation de PKC (protéine kinase C) inhibe le recrutement de FADD au sein du DISC (Harper *et al.*, 2003) et les protéines MAPK (Frese *et al.*, 2003) et PKB/Akt (Thakkar *et al.*, 2001) sensibilisent les cellules à l'apoptose induite par TRAIL.

Dans les cellules de type II, la voie apoptotique extrinsèque est aussi régulée par les membres de la famille Bcl-2 (cf chapitre 2.4.3.2). Par exemple, Bax, membre pro-apoptotique, participe à l'apoptose médiée par TRAIL. En effet des cellules cancéreuses de colon déficientes en Bax sont résistantes au ligand TRAIL (LeBlanc *et al.*, 2002). Par ailleurs, une sur-expression de Bcl-2, protéine anti-apoptotique, inhibe l'apoptose induite par TRAIL (Fulda *et al.*, 2002). Cependant, l'effet cytoprotecteur de Bcl-2 ne serait que partiel et uniquement dans le cas d'une faible dose de TRAIL (Rudner *et al.*, 2005). Un autre membre anti-apoptotique de cette famille, Mcl-1, interagit avec t-Bid, empêchant son interaction avec Bax/Bak et donc l'amplification de la mort par la voie apoptotique mitochondriale (Clohessy *et al.*, 2006).

2.4.3 Mitochondries, éléments centraux de l'apoptose

2.4.3.1. Généralités sur les mitochondries

Les mitochondries, du grec « *mitos* », fil, et « *chondros* », grain, sont les seuls organites de la cellule, à l'exception du noyau, qui possèdent leur propre ADN, suggérant une origine exogène : elles sont le résultat de l'endosymbiose d'une α -protéobactérie par une cellule eucaryote primitive (Andersson *et al.*, 1998 ; Gray *et al.*, 2001). Présentes dans toutes les cellules aérobies, les mitochondries emmagasinent sous forme d'ATP l'énergie libérée par l'oxydation enzymatique de molécules nutritives. Elles consomment 80% de l'oxygène respiré par une cellule et produisent 90% de l'énergie utilisée. Elles interviennent aussi dans d'autres fonctions telles que la thermogenèse, la synthèse des hèmes et des stéroïdes, l'équipement enzymatique particulier permettant des échanges importants avec le cytoplasme ainsi que des conversions enzymatiques notamment la β -oxydation des acides gras, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (Delbart, 2000). De part la relation entre nombre de mitochondries et consommation énergétique de la cellule, la quantité de mitochondries par cellule est fonction du type cellulaire et varie entre 1000 et 1600 formant un véritable réseau, le mitochondriome, à l'intérieur duquel les échanges énergétiques sont rapides. Ce vaste réseau est du au fait qu'une mitochondrie provient uniquement de la croissance puis de la division d'une autre mitochondrie déjà existante. Ainsi, avant la division cellulaire, la mitochondrie double sa masse puis se scinde en deux, on parle de fission mitochondriale. A l'inverse, les mitochondries peuvent aussi fusionner (Figure 16).

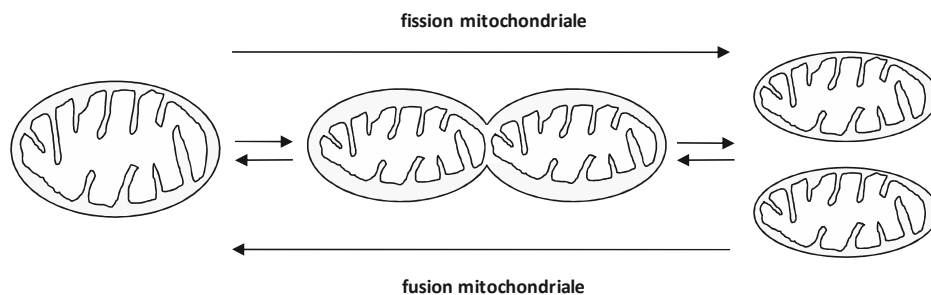


Figure 16 : Les mécanismes de fission et fusion mitochondriales

Les mitochondries sont constituées de 2 membranes, la membrane externe et la membrane interne, séparées par un espace, la chambre externe ou l'espace inter-membranaire. La chambre interne délimitée par la membrane interne est appelée matrice (Figure 17).

La membrane externe est formée à 60% de protéines et à 40% de lipides. Elle contient de nombreuses protéines transmembranaires, les porines, qui forment des pores aqueux pour permettre le passage de métabolites hydrophiles de moins de 10 kDa par diffusion passive, tels que les anions, les cations, les acides gras, le pyruvate et les nucléotides. Le membre le plus connu de cette famille est le VDAC (Voltage-Dependant Anion Channel). La membrane interne est constituée à 75% de protéines, dont certaines sont impliquées dans la chaîne respiratoire, principal acteur de conversion énergétique, et à 25% de lipides, dont les cardiolipines qui renferment 4 acides gras, ce qui rend cette membrane imperméable aux ions. Cette imperméabilité permet aux complexes I-IV de la chaîne respiratoire d'accumuler au travers de la membrane interne un gradient de protons nécessaire pour la phosphorylation oxydative (Mitchell et Moyle, 1965a, 1965b). Ce gradient de

protons est à la base du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et est utilisé par le complexe V de la chaîne respiratoire pour permettre la synthèse d'ATP. Le maintien de ce gradient étant vital pour la cellule, les échanges avec le cytoplasme, notamment de constituants de la matrice mitochondriale et de métabolites, sont hautement régulés *via* des pores très sélectifs dont l'ouverture/fermeture instantanée entraîne une perte partielle du $\Delta\Psi_m$ (Kroemer *et al.*, 1998 ; Zoratti et Szabo, 1995). A l'inverse, une perte soutenue voire permanente du $\Delta\Psi_m$ est considérée comme le point de non retour dans la cascade d'événements aboutissant à la mort de la cellule (Zamzami *et al.*, 1995) et est associée à un mécanisme de mort (Marchetti *et al.*, 1996 ; Zamzami *et al.*, 2005).

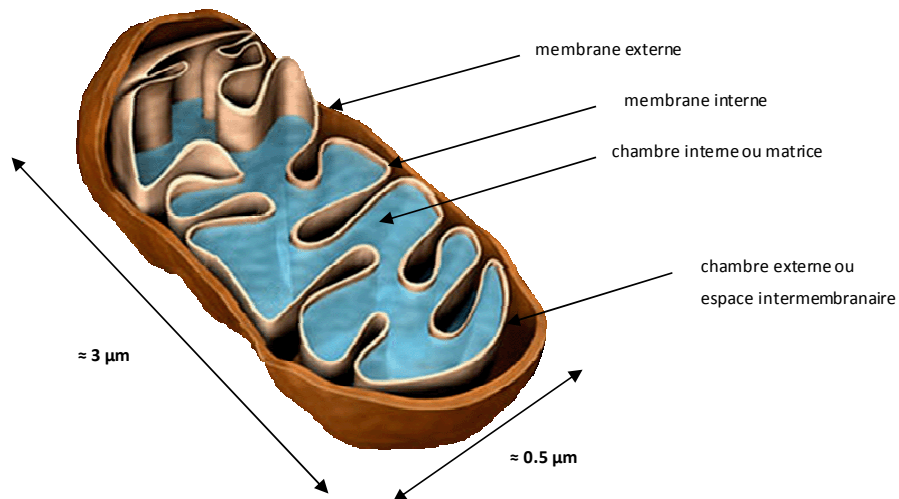


Figure 17 : Représentation schématique de la mitochondrie

Le génome mitochondrial est extrêmement dynamique et majoritairement hétéroplasmique. Il est constitué de 37 gènes dont 13 codent des peptides appartenant à la chaîne respiratoire, 22 codent des ARNt et 2 codent des ARNr. Ainsi, environ 10% des protéines sont directement synthétisées, *via* un code génétique propre, à partir de l'ADN mitochondrial dans la matrice mitochondriale par les mitoribosomes, plus petits que les ribosomes (70S au lieu de 80S). Toutes les autres protéines mitochondriales, environ 1500, sont codées sous forme de précurseurs par le génome nucléaire. Un peptide signal de 15 à 30 AA situé à l'extrémité amino-terminale permet leur reconnaissance puis leur importation à la mitochondrie (Rusch et Kendall, 1995 ; Schatz et Dobberstein, 1996). Les protéines, dénaturées, traversent alors les membranes mitochondriales externes et/ou internes grâce à des translocases.

Une fois transloqué dans le bon compartiment, le peptide signal est clivé par une protéase. A l'heure actuelle, 5 systèmes de translocases ont été caractérisés (Figure 18) (Baker *et al.*, 2007). i) Au niveau de la membrane externe, le complexe TOM (translocase of the outer membrane), complexe multiprotéique comportant la sous-unité TOM40, permet l'importation depuis le cytosol de toutes les protéines. Selon leur destination finale, les protéines utilisent ensuite des translocases différentes. ii) Les protéines qui seront ancrées dans la membrane externe sont prises en charge par le complexe SAM (sorting and assembly machinery of the outer membrane) aussi appelé TOB (topogenesis of the outer membrane β -barrel protein). iii) Les protéines destinées à la matrice sont prises en charge au niveau de la membrane interne par le complexe TIM23 (translocase of the inner

membrane 23). La protéine chaperonne mtHsp70 se fixe à TIM23 grâce à la séquence PAM (presequence translocase-associated motor) pour transloquer les protéines dans la matrice mitochondriale où une protéase clive leur peptide signal. iv) Les protéines localisées dans l'espace intermembranaire et destinées à être en partie insérées dans la membrane interne *via* un domaine transmembranaire sont ancrées dans la membrane interne par TIM23 associé à TIM21 et le peptide signal sera également clivé par une protéase matricielle. v) Une fois dans l'espace intermembranaire, les protéines destinées à la membrane interne sont prises en charge par le complexe TIM22 qui facilite leur insertion dans la membrane interne.

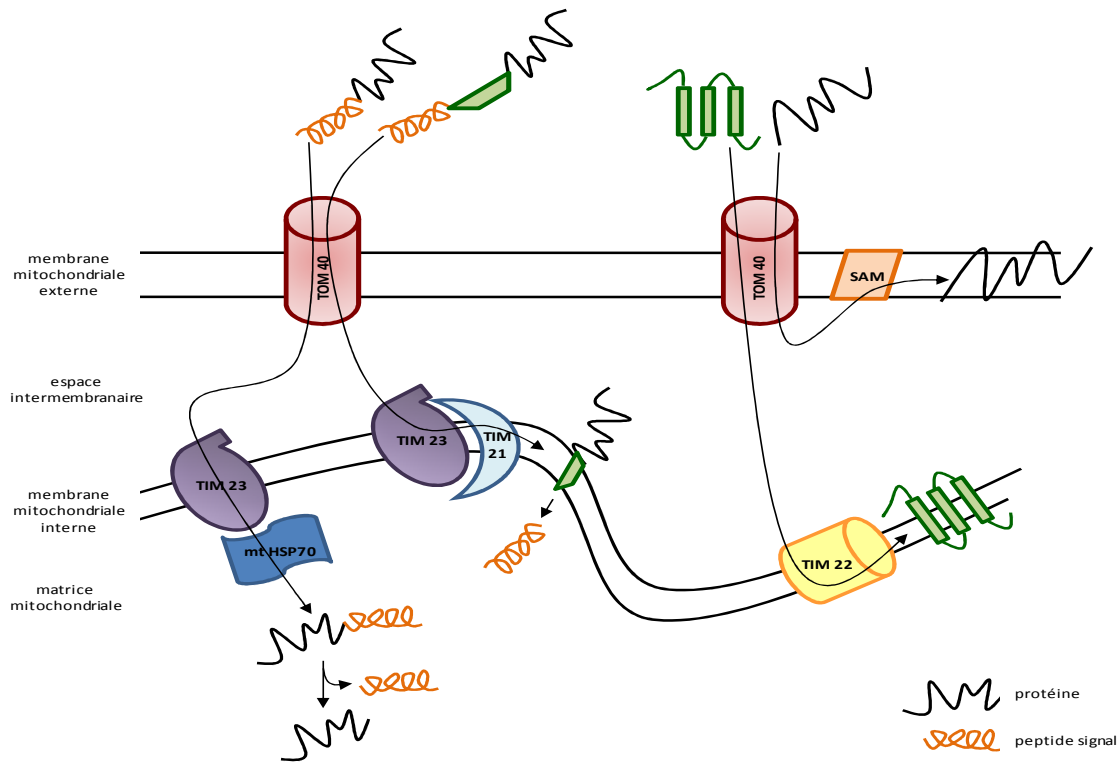


Figure 18 : Les différentes translocases mitochondriales (d'après Baker *et al.*, 2007)

Au cours de la mort, le rôle des mitochondries est indéniable : elles sont considérées comme une prison hautement surveillée renfermant un escadron de mort (Delbart, 2000). Lors de l'apoptose, l'intégrité des mitochondries est atteinte, le potentiel membranaire chute ($\Delta\Delta\Psi_m$), le transport des électrons au sein de la chaîne respiratoire est stoppé et des protéines situées dans l'espace intermembranaire sont libérées dans le cytosol. Cependant, la chronologie de ces différents évènements est loin d'être établie avec exactitude. De part leur rôle prédominant lors de l'apoptose, les mitochondries sont des cibles pharmacologiques potentielles pour de nouveaux traitements anti-cancéreux. En effet les mitochondries sont à l'intersection des voies apoptotiques dites classiques et le processus de mort se déroule en 3 étapes détaillées ci-dessous (Kroemer *et al.*, 1997). Des défauts lors des 2 premières phases peuvent stopper l'évolution du processus apoptotique alors qu'une défaillance lors de la 3^e et ultime phase ne modifiera pas l'issue fatale mais peut changer les manifestations phénotypiques de la mort.

2.4.3.2. Phase 1 de la voie apoptotique mitochondriale : initiation

L'initiation de la voie apoptotique mitochondriale est une étape hautement régulée par les différents membres de la famille Bcl-2 mais aussi par la protéine p53.

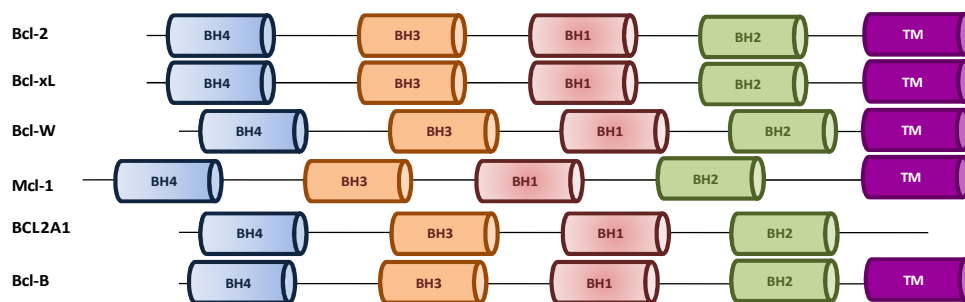
- Famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) sont de puissants régulateurs de la voie apoptotique mitochondriale dont le prototype, la proto-oncoprotéine Bcl-2, a été identifiée dans des lymphomes folliculaires de type B (Tsujiimoto *et al.*, 1985). Cette famille de protéines est composée actuellement d'une trentaine de membres décrits, dont certains préviennent (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1...) alors que d'autres induisent (Bax, Bak, Bad, Bid, PUMA...) l'apoptose (Willis et Adams, 2005). Ces protéines sont caractérisées par la présence de 1 à 4 domaines d'homologie BH (Bcl-2 Homology) communs et conservés dont la nature semble déterminer la fonction des membres de cette famille. Selon la présence des différents domaines BH, les protéines de la famille Bcl-2 ont été regroupées en trois classes (Figure 19). Les membres anti-apoptotiques possèdent les 4 domaines d'homologie BH : BH1, BH2, BH2 et BH4, alors que les membres pro-apoptotiques sont quant à eux divisés en deux catégories. Ainsi les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines (Bax, Bak...) ne possèdent pas le domaine BH4 alors que certaines protéines pro-apoptotiques possèdent un seul domaine, le domaine BH3, et sont dites protéines à domaine BH3 seul ou « BH3 only proteins » (Bid, PUMA...). Le domaine BH3 semble être le domaine nécessaire à l'induction de l'apoptose par les protéines pro-apoptotiques (Puthalakath et Strasser, 2002). Tous les membres de la famille Bcl-2, à l'exception des protéines à domaine BH3 seul, possèdent le plus souvent un domaine transmembranaire hydrophobe à l'extrémité carboxy-terminale permettant leur ancrage dans la membrane mitochondriale, la membrane du réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire externe (Schinzel *et al.*, 2004). Dans les cellules viables, les protéines anti-apoptotiques ainsi que la protéine pro-apoptotique Bak sont insérées principalement dans la membrane externe de la mitochondrie, alors que les protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bid, Bad sont cytosoliques ou en périphérie de la mitochondrie. Lors de l'apoptose, ces dernières vont subir différentes modifications rendant leur extrémité amino-terminale accessible, ce qui permet leur translocation au niveau de la membrane externe mitochondriale où elles s'inséreront pour s'oligomériser et propager le signal de mort.

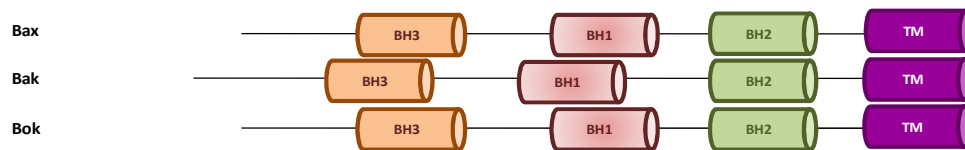
La principale fonction de l'ensemble des membres de la famille Bcl-2 est le contrôle de l'intégrité de la membrane mitochondriale externe *via* la régulation de la formation et/ou l'ouverture de pores membranaires mitochondriaux permettant la libération de facteurs apoptogènes de la mitochondrie au profit du cytosol lors de l'apoptose (cf partie 2.4.3.3) (Skommer *et al.*, 2007). La plupart de ces protéines peuvent former des homo- ou hétérodimères. Dans les conditions physiologiques, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL protègent la mitochondrie d'une chute du potentiel membranaire en séquestrant les protéines pro-apoptotiques présentes au niveau de la membrane mitochondriale, qui pourraient conduire à la dépolarisation de la membrane mitochondriale (Kroemer *et al.*, 2007). Cette interaction s'effectue *via* les domaines BH1, BH2 et BH3 des protéines anti-apoptotiques et *via* le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques (Zha *et al.*, 1996 ; Simonen *et al.*, 1997). La protéine Bcl-2 prévient la translocation de Bax à la mitochondrie, se lie à l'extrémité

amino-terminale de Bak, empêchant l'oligomérisation de Bax/Bak et donc inhibe la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Mikhailov *et al.*, 2001 ; Mikhailov *et al.*, 2003). Par ailleurs, les protéines à domaine BH3 seul jouent en rôle clé lors de l'apoptose. En effet, une fois activées, ces protéines vont i) lier et activer directement les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, ces dernières vont alors s'oligomériser au niveau de la membrane mitochondriale et/ou ii) lier les protéines anti-apoptotiques, les rendant inactives, les protéines à domaine BH3 ont alors un rôle dit de dé-répresseurs. L'ensemble de ces événements permet l'activation de la voie apoptotique mitochondriale. Dans ce contexte, la balance entre la vie et la mort de la cellule semble influencée par le type et la proportion de complexes pro- et anti-apoptotiques formés (Opferman et Korsmeyer, 2003).

protéines anti-apoptotique



protéines pro-apoptotique



protéines à domaine BH3 seul

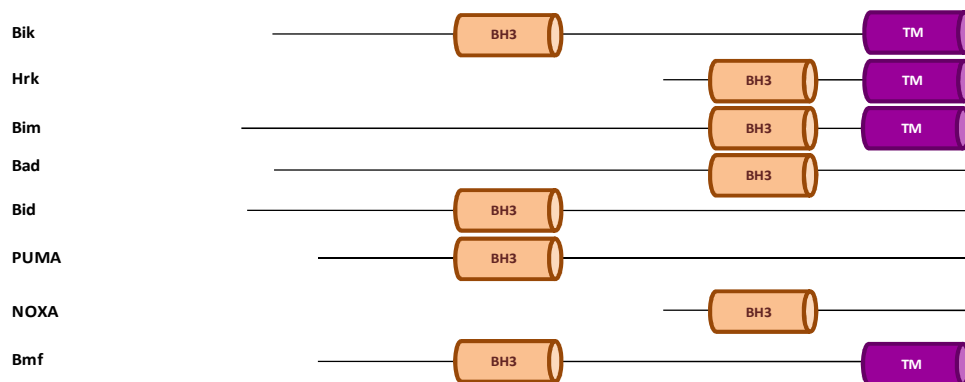


Figure 19 : Classification des membres de la famille Bcl-2

L'activité des différents membres de la famille Bcl-2 est régulée aux niveaux transcriptionnel et traductionnel par divers facteurs de survie ou de mort tels que p53. En effet la protéine suppresseur de tumeur p53 induit l'apoptose en activant l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax, Bak ou

Bid et en bloquant l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Schuler et Green, 2005 ; Yee et Vousden, 2005). En plus de p53, d'autres protéines sont impliquées dans la régulation de l'activité des membres de la famille Bcl-2. La protéine nucléaire Ku70, impliquée dans les réparations de l'ADN, peut inhiber la translocation de Bax à la mitochondrie (Sawada *et al.*, 2003) alors que le récepteur orphelin TR3 peut être transloqué du noyau à la mitochondrie où il interagit avec Bcl-2, permettant aux membres pro-apoptotiques d'induire la dépolarisation de la membrane mitochondriale (Lin *et al.*, 2004).

En plus du processus de dimérisation permettant aux protéines de la famille Bcl-2 de s'activer ou de s'inhiber, d'autres modifications post-traductionnelles régulent leur activité. En effet, la phosphorylation de Bcl-2 au niveau de résidus sérine est associée selon les types cellulaires aussi bien à son activation (Ito *et al.*, 1997) qu'à son inactivation (Haldar *et al.*, 1995). L'activité de la protéine pro-apoptotique Bad est aussi dépendante de sa phosphorylation : en absence de stimulus apoptotique, activée par la protéine PI3K, la protéine kinase PKB/Akt phosphoryle Bad, cette dernière se lie alors à la protéine 14-3-3 qui la séquestre dans le cytoplasme. En réponse à un stimulus apoptotique, la protéine PKB/Akt est inactivée tandis que la calcineurine activée, phosphatase calmoduline-dépendante, déphosphoryle Bad, ce qui libère cette dernière de la protéine 14-3-3. Bad migre alors vers la mitochondrie et interagit avec Bcl-2, induisant l'apoptose (Datta *et al.*, 1997 ; Fang *et al.*, 1999). De plus, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL peuvent être clivées par les caspases-3 et -1 lors de l'apoptose (Cheng *et al.*, 1997 ; Fujita *et al.*, 1998), éliminant le domaine BH4 ce qui rend ces protéines tronquées pro-apoptotiques. Récemment il a été montré que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 pouvaient aussi être clivées par un dimère de caspase-9, rendant aussi les protéines tronquées pro-apoptotiques (Chen *et al.*, 2007). Ainsi les membres de la famille Bcl-2 font partie d'un vaste réseau à l'intérieur duquel les différents membres sont connectés entre eux mais sont régulés par de nombreux facteurs environnementaux.

- t-Bid

Protéine à domaine BH3 seul de la famille Bcl-2, Bid (BH3-interacting domain death agonist) (Wang *et al.*, 1996a) joue un rôle clé dans l'initiation de la voie apoptotique mitochondriale. En effet, elle permet de transmettre le signal de mort au niveau de la mitochondrie.

La protéine Bid a été mise en évidence suite à son clivage en t-Bid (truncated-Bid), fragment p15 carboxy terminal actif, par la caspase-8 en réponse à l'activation des récepteurs de mort (cf partie 2.4.2.3). La forme tronquée t-Bid gagne alors la mitochondrie afin d'amplifier la réponse suite à un signal de mort (Li *et al.*, 1998 ; Gross *et al.*, 1999 ; Zamzami *et al.*, 2000). A ce niveau, l'insertion de t-Bid à la membrane mitochondriale nécessite la présence de cardiolipines (Lutter *et al.*, 2000). En plus des caspases, d'autres protéases peuvent tronquer Bid en t-Bid, notamment le granzyme B dans des cellules T cytotoxiques, les calpains dans le cas d'ischémie/reperfusion, les enzymes lysosomiales, les calpains ou d'autres protéases suite à des dommages de l'ADN (Yin, 2006). De part le nombre important de protéases pouvant l'activer, Bid est considéré comme une véritable sentinelle permettant d'activer la voie apoptotique mitochondriale afin d'initier ou d'amplifier la réponse de mort (Yin, 2006).

Dans tous les cas, le clivage protéolytique de Bid est spécifique et limité au sein des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Ce clivage entraîne un changement de conformation favorisant l'exposition du domaine BH3, domaine par lequel t-Bid interagit avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak et qui aboutit à l'activation de la voie apoptotique mitochondriale (Yin, 2006). Une fois inséré dans la membrane

externe mitochondriale, ce domaine BH3 reste accessible (Oh *et al.*, 2005). Dans ce contexte, la forme t-Bid est davantage efficace dans la transduction du signal que Bid. De plus, l'affinité de t-Bid pour la membrane mitochondriale externe est augmentée par la N-myristoylation du résidu glycine (G) en position 60. En effet t-Bid myristoylé a 350 fois plus d'affinité que t-Bid pour se fixer à la membrane mitochondriale externe et permettre *in fine* la libération du cyt c (Zha *et al.*, 2000). Par ailleurs, le clivage de Bid est régulé par phosphorylation. En effet, la phosphorylation de la thréonine (T) en position 59 par la caséine kinase II inhibe le clivage de Bid par la caspase-8 (Degli Esposti *et al.*, 2003).

Un élément clé dans l'initiation de la voie apoptotique mitochondriale est la régulation de l'expression de Bid par p53 : une surexpression de p53 entraîne une transcription accrue des ARNm de Bid dans diverses lignées cellulaires et chez la souris (Sax *et al.*, 2002). Des fibroblastes déficients en Bid sont davantage résistants que des fibroblastes sauvages avec des dommages à l'ADN induits par l'adriamycine et le 5-fluorouracile (5-FU), connus pour stabiliser la protéine p53 endogène. Il semble donc que la régulation de Bid par p53 contribue aux mécanismes de sensibilité en réponse aux traitements chimiothérapeutiques.

Par ailleurs, le rôle clé de t-Bid dans l'activation de la voie apoptotique mitochondriale est lié au fait qu'il permet la libération de la mitochondrie vers le cytosol du facteur apoptotique Smac/DIABLO, lequel va alors fixer XIAP, empêchant cette dernière d'inhiber l'activation de la caspase-3 (Li *et al.*, 2002) (cf partie 2.4.1.5).

Impliquée dans le développement des leucémies promyélocytaire aiguës en inhibant l'apoptose, la protéine PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger), qui affecte la croissance des cellules myéloïdes, inhibe l'expression de Bid, ce qui pourrait expliquer la résistance des cellules Jurkat exprimant le gène *PLZF* lors de l'apoptose induite par une privation en sérum (Parrado *et al.*, 2004).

En plus de son rôle lors de l'apoptose, des fonctions alternatives de Bid ont récemment été mises en évidence. En effet Bid pourrait jouer un rôle dans la prolifération cellulaire en facilitant la transition G₀/G₁ (Bai *et al.*, 2005) du cycle cellulaire. Par ailleurs Bid serait aussi impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase S afin réparer les dommages à l'ADN (Kamer *et al.*, 2005 ; Zinkel *et al.*, 2005).

- p53

La protéine suppresseur de tumeur p53 dite « gardienne du génome » a été découverte en 1979 (DeLeo *et al.*, 1979). C'est un puissant facteur de transcription impliqué dans de nombreuses fonctions telles que le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, le contrôle de l'intégrité du génome et la mort cellulaire (Vogelstein et Kinzler, 1992 ; Levine, 1997). Protéine nucléaire de 53 kDa, p53 est constituée de plusieurs domaines fonctionnels : un domaine de transactivation (AA 22-42), un domaine de fixation à l'ADN (AA 100-293), un domaine de localisation nucléaire (AA 316-325) et un domaine d'oligomérisation (AA 319-366) (Figure 20).

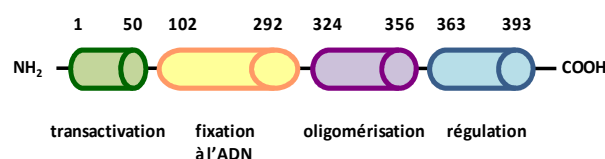


Figure 20 : Structure de p53

Active sous forme de tétramère, p53 s'accumule dans le cytosol au cours de la phase G₁ du cycle cellulaire et est transloquée dans le noyau au début de la phase S (Chowdhury *et al.*, 2006). L'activation de p53 est contrôlée par sa biosynthèse mais aussi par de nombreuses modifications post-transcriptionnelles (Fuster *et al.*, 2007). Les domaines carboxy- et amino-terminaux de p53 contiennent plusieurs sites d'acétylation et de phosphorylation. A l'extrémité carboxy-terminale, ces modifications de conformation permettent la fixation du domaine de liaison à l'ADN sur l'ADN alors qu'à l'extrémité amino-terminale, les phosphorylations de certaines sérines contrôlent l'activité transcriptionnelle de p53 et son interaction avec d'autres protéines (Buzzard *et al.*, 1998). Dans une cellule normale, MDM2 (murine double minute 2), principal régulateur négatif de p53 (Yang, *et al.*, 2004), ubiquitinye les résidus lysines situés à l'extrémité carboxy-terminale de p53, ce qui favorise la dégradation de p53 et maintient l'expression de cette protéine à un taux très faible. Suite à des lésions de l'ADN, la phosphorylation de p53 inhibe cette liaison p53/MDM2, ce qui favorise son accumulation et son activation. Par ailleurs, l'acétylation de p53 sur les résidus lysine (K) en position 320 et 382 modifie les interactions entre le domaine carboxy-terminal et le domaine de liaison à l'ADN, permettant l'acquisition d'une conformation active. Une fois activée, p53 a pour fonction principale de réguler la transcription de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes d'arrêt de la prolifération ou de mort cellulaire. Cette fonction a pour conséquence, un arrêt du cycle cellulaire et/ou une réparation des dommages de l'ADN ou la mort par apoptose de la cellule. La réponse cellulaire suite à l'activation de p53 sera donc fonction de la nature des gènes activés ou réprimés par p53 (Fuster *et al.*, 2007). Concernant les gènes impliqués dans la voie apoptotique mitochondriale, la protéine p53 régule i) positivement l'expression de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, à savoir Bid, Bax, PUMA et NOXA, impliquées dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale lors de l'apoptose (Oda *et al.*, 2000 ; Nakano et Vousden, 2001) et ii) négativement l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-2. Les protéines PUMA et NOXA lient alors les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, rendant inactif ces inhibiteurs de l'apoptose.

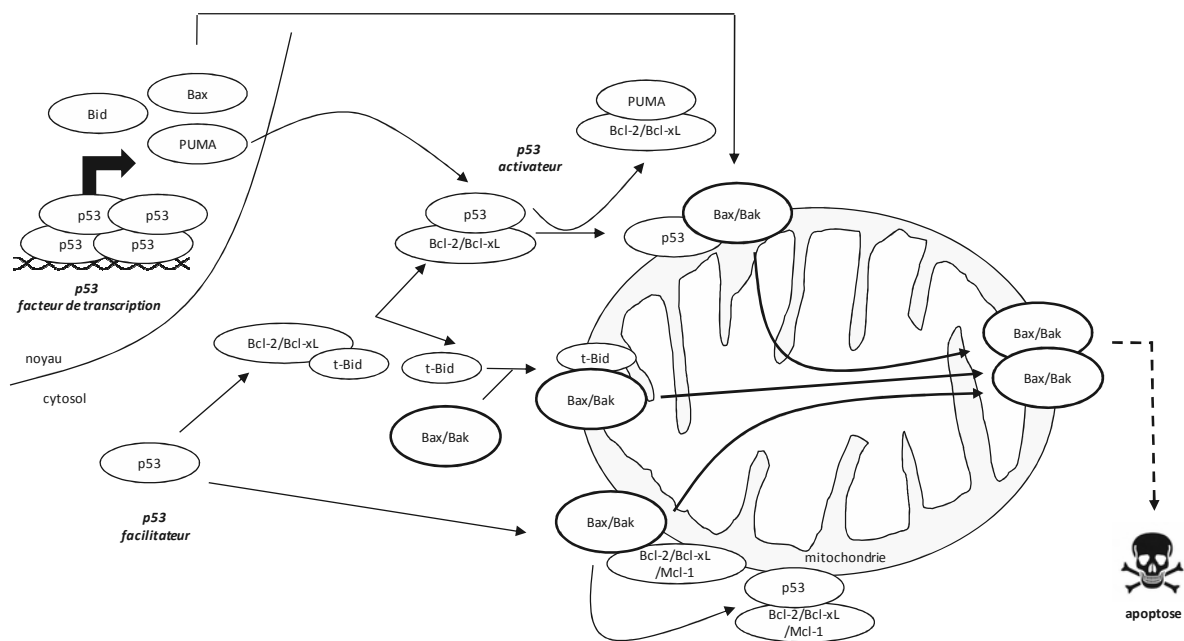


Figure 21 : Impact de p53 sur la voie apoptotique mitochondriale (schéma modifié à partir de Skommer *et al.*, 2007)

Des modèles d'apoptose dépendants ou non de p53 ont montré qu'indépendamment de son rôle transcriptionnel, p53 se localise rapidement à la mitochondrie dès l'initiation du processus apoptotique dépendant de p53 (Marchenko *et al.*, 2000 ; Mihara et Moll, 2003). Cette translocation est par ailleurs favorisée par l'ubiquitination de p53 par MDM2 (Marchenko *et al.*, 2007). Une fois transloquée au niveau de la mitochondrie, p53 ubiquitinylée sera alors déubiquitinylée par la protéine mitochondriale HAUSP (herpes virus-associated ubiquitin-specific protease) afin de pouvoir exercer son activité apoptotique (Marchenko *et al.*, 2007 ; Marchenko et Moll, 2007). A ce niveau, p53 forme des complexes avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2 (Mihara *et al.*, 2003). Les protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak, séquestrées par les protéines anti-apoptotiques, sont alors libérées (Figure 21). L'interaction entre p53 et Bcl-2 se fait *via* le domaine de liaison à l'ADN de p53. En effet des p53 mutées au niveau du domaine de liaison à l'ADN ne peuvent lier Bcl-2 (Tomita *et al.*, 2006). Par ailleurs, PUMA, cible transcriptionnelle de p53, semble coupler les fonctions nucléaires et cytosoliques de p53 (Chipuk *et al.*, 2005). En effet, en absence de stress cellulaire, la faible quantité de p53 nucléaire est insuffisante pour activer l'expression de PUMA et au niveau du cytosol, p53 est séquestrée par Bcl-xL. L'activation d'oncogènes ou l'induction de dommages à l'ADN par les rayonnements ultra-violetts augmente rapidement la quantité de p53 nucléaire, laquelle active l'expression de PUMA. Cette dernière se lie alors à Bcl-xL, libérant p53 (Chipuk *et al.*, 2005) (Figure 21). De plus, p53 peut faciliter la translocation, l'ancrage puis l'oligomérisation de Bax au niveau de la mitochondrie, entraînant la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Chipuk *et al.*, 2004). La protéine p53 peut aussi interagir directement avec Bak, la libérant de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, ce qui aboutit à l'oligomérisation de Bak suivie de la dépolarisation de la membrane mitochondriale (Leu *et al.*, 2004).

Par ailleurs, il a été démontré que 2 variants alléliques de p53 au niveau du résidu 72 (Arg/R ou Pro/P) se localisent différemment au niveau de la membrane mitochondriale (Dumont *et al.*, 2003). En effet, la forme arginine se localise préférentiellement à la mitochondrie, entraînant une activité apoptotique plus importante comparée à celle observée avec la forme proline. La présence du polymorphisme Arg/Pro au codon 72, situé à l'extrémité amino-terminale de p53 semble jouer un rôle prépondérant dans l'activité apoptotique de p53 indépendante de son activité transcriptionnelle (Chipuk et Green, 2003 ; Chipuk *et al.*, 2004).

La transformation tumorale nécessite une stimulation de la prolifération ainsi qu'une inhibition des voies d'induction de l'apoptose (Malumbres et Barbacid, 2001 ; Green et Evan, 2002). L'inactivation de p53 semble être un facteur prédisposant à l'émergence des cancers (Donehower *et al.*, 1992) et essentielle à la transformation tumorale (Mowat *et al.*, 1985). Les mutations de p53 sont caractéristiques d'au moins 50% des cancers humains (colon, poumon, sein, cerveau) (Fuster *et al.*, 2007) et sont retrouvées dans 92% des cas au niveau du domaine de liaison à l'ADN (Soussi *et al.*, 2000). Dans les autres cas, bien que la protéine p53 soit sauvage, des mutations affectent les effecteurs en amont et en aval de p53 tels que Chk2, Bcl-2, Bax, Apaf-1 (Mullauer *et al.*, 2001). De façon intéressante, l'activité mitochondriale de p53 joue un rôle clé dans l'apoptose des organes sensibles aux radiothérapies contrairement aux organes résistants à ces traitements (Erster et Moll, 2004). Il semblerait donc que l'activité mitochondriale de p53 soit un élément clé dans la sensibilité des organes aux radiothérapies.

2.4.3.3. Phase 2 de la voie apoptotique mitochondriale : intégration/décision

La phase d'intégration/décision fait suite à l'initiation de la voie apoptotique mitochondriale. Au cours de cette phase, la décision de mourir est prise et le point de non-retour est dépassé. Cette phase est caractérisée par l'augmentation de la perméabilité membranaire mitochondriale associée ou non à la formation et/ou l'ouverture de différents pores membranaires mitochondriaux (Kroemer *et al.*, 2007).

- Perméabilisation membranaire mitochondriale : MMP

Les mitochondries sont de véritables carrefours connectant les signaux induisant la mort et ceux favorisant la survie. Ces signaux proviennent de différents organites, notamment le noyau, le cytosol, les lysosomes et le réticulum endoplasmique. Lorsque les facteurs pro-morts prédominent, la membrane mitochondriale se perméabilise. La perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP : mitochondrial membrane permeabilization) est une des caractéristiques de l'activation de la voie apoptotique intrinsèque et est considérée comme le point de non-retour dans la cascade d'évènements aboutissant à la mort de la cellule (Green et Kroemer, 1998 ; Green et Kroemer, 2004). Elle est observée dans des types cellulaires nombreux et variés, notamment les hépatocytes, les cellules épithéliales, les lymphocytes, les neurones et les ostéoblastes. Les mécanismes responsables de la perméabilisation de la membrane mitochondriale sont complexes et sont probablement le résultat de l'exécution coordonnée de plusieurs étapes. Cette perméabilisation est caractérisée par : i) la libération de molécules apoptogènes notamment le cyt c, AIF, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, EndoG ; ii) l'altération du potentiel membranaire mitochondrial, iii) une catastrophe bioénergétique avec notamment un arrêt de la phosphorylation oxydative et l'accumulation d'espèces réactives à l'oxygène (ERO). La cinétique de l'ensemble de ces évènements n'est pas clairement établie. En effet selon la nature de la membrane atteinte en premier, à savoir la membrane externe ou la membrane interne, les mécanismes responsables de la perméabilisation de la membrane mitochondriale diffèrent.

- Perméabilisation de la membrane externe

La membrane externe est, dans les cellules viables, perméable aux métabolites et solutés jusqu'à 5 kDa et imperméable aux protéines, grâce à la présence du VDAC, protéine de la membrane externe la plus abondante. Lors de l'apoptose, la perméabilité de la membrane externe augmente, ce qui libère des protéines solubles retenues dans l'espace intermembranaire. Une fois dans le cytosol, ces dernières peuvent gagner le noyau ou le réticulum endoplasmique.

- ✓ Perméabilisation de la membrane externe médiée par le VDAC

Seul, le VDAC peut former un pore « alternatif » impliqué dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. En l'absence de signaux apoptotiques, le VDAC est ouvert grâce à la protéine Bcl-xL et il participe aux échanges d'ATP, de calcium et d'autres ions. Suite à un stimulus apoptotique, la fermeture du VDAC par les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 inhibe la

sortie d'ATP et de différents solutés qui s'accumulent dans la matrice mitochondriale. Il s'en suit une hyperpolarisation transitoire de la membrane mitochondriale interne suivie d'un déséquilibre osmotique et de la rupture de la membrane mitochondriale externe (Zhu *et al.*, 2002 ; Bouchier-Hayes *et al.*, 2005). Les facteurs apoptogènes mitochondriaux sont alors libérés (Vander Heiden *et al.*, 1999 ; Vander Heiden *et al.*, 2000 ; Vander Heiden *et al.*, 2001).

✓ Perméabilisation de la membrane externe médiée par Bax/Bak

L'implication des membres de la famille Bcl-2 dans la formation des pores membranaires a été mise en évidence grâce à des similarités structurales observées avec des domaines de plusieurs toxines bactériennes formant des pores (Muchmore *et al.*, 1996).

Ce modèle de pores est basé sur l'interaction directe des protéines de la famille Bcl-2 au niveau de la membrane externe. Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 résident principalement au niveau de la membrane externe où elles protègent les mitochondries de la perméabilisation de la membrane en neutralisant les membres pro-apoptotiques de cette famille.

Dans les cellules viables, la protéine pro-apoptotique Bak est associée à la membrane externe alors que la protéine pro-apoptotique Bax est sous forme de monomère, soit libre dans le cytosol, soit faiblement attachée à la membrane externe de la mitochondrie. Dans de nombreux modèles de mort, l'expression d'au moins une de ces deux protéines est nécessaire pour la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Wei *et al.*, 2001). Ainsi les fibroblastes murins déficients en Bax et Bak sont résistants à l'induction de la perméabilisation membranaire puis à l'activation de la voie apoptotique mitochondriale (Wei *et al.*, 2001). Cependant dans ces conditions, la perméabilisation peut être induite par d'autres mécanismes notamment une forte concentration de Ca^{2+} ou par l'ouverture du pore VDAC/hexokinase (cf ci-dessous).

Suite à l'induction de l'apoptose, Bax est transloquée à la mitochondrie où elle s'insère au sein de la membrane mitochondriale externe (Wolter *et al.*, 1997). A ce niveau, seule ou en association avec d'autres molécules apoptotiques telles que Bak, t-Bid ou Bim, Bax participe par oligomérisation à la formation de pores membranaires mitochondriaux (Figure 22). Constituées d'une zone hydrophobe et d'une hélice α entourée de 5 hélices amphipatiques (Schendel *et al.*, 1998), ces protéines peuvent, après changement de conformation aboutissant à l'exposition de leur extrémité aminotermine, s'hétéro- ou s'homo-oligomériser et s'insérer dans la bicouche lipidique pour former des pores dans la membrane mitochondriale (Basanez *et al.*, 2002) entraînant des discontinuités transitoires de la membrane externe (Korsmeyer *et al.*, 2000 ; Roucou *et al.*, 2002a ; Roucou *et al.*, 2002b ; Mikhailov *et al.*, 2003). Ces canaux sont dépendants du pH, du voltage et ont une faible sélectivité ionique (Schlesinger *et al.*, 1997). Les oligomères Bax et Bak ainsi formés se regroupent au niveau de la membrane externe. Ce phénomène est indépendant des caspases et est totalement inhibé par Bcl-xL (Nechushtan *et al.*, 2001).

Une fois formés, ces différents pores permettent la libération du *cyt c* mais le mécanisme exact est encore controversé.

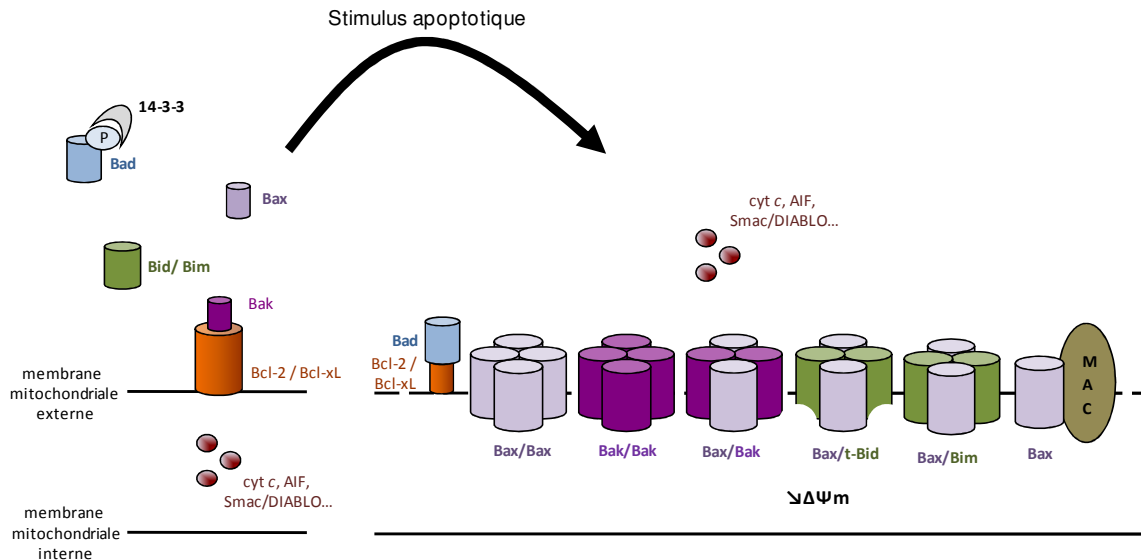


Figure 22 : Les pores de la famille Bcl-2

Lors de l'apoptose, les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 seul agissent selon 2 mécanismes : la protéine pro-apoptotique Bad est déphosphorylée, ce qui la libère de la protéine 14-3-3. Bad peut alors gagner la mitochondrie où elle interagit avec les protéines anti-apoptotiques, libérant les protéines pro-apoptotiques (cf partie 2.4.3.2). La protéine Bad facilite donc la formation de ces canaux. Les protéines t-Bid et Bim sont quant à elles des activateurs car elles interagissent directement avec Bax et Bak (Adams et Cory, 2007). La formation d'oligomères de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 est inhibée par les membres anti-apoptotiques de cette famille qui peuvent interagir directement avec les constituants des pores ou neutraliser les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 seul (Letai *et al.*, 2002).

En plus de former des pores chevauchant la membrane, les membres de la famille Bcl-2 participent aussi à la formation d'un autre type de pore au niveau de la membrane externe, le MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel) (Figure 22). Différentes études ont montré que le MAC permettait la libération du cytochrome *c* dans les étapes précoces de l'apoptose et par des études immunologiques, moléculaires et pharmacologiques, il a été montré que Bax serait l'un des constituants de ce pore (Pavlov *et al.*, 2001 ; Dejean *et al.*, 2005 ; Martinez-Caballero *et al.*, 2005 ; Dejean *et al.*, 2006).

✓ Détection de la perméabilisation de la membrane externe

La localisation subcellulaire des protéines stockées physiologiquement dans l'espace intermembranaire peut être utilisée pour caractériser la perméabilisation de la membrane externe (Figure 24). Parmi l'ensemble des protéines, le cytochrome *c* et l'AIF sont considérés comme les prototypes des protéines apoptogènes libérées *via* la perméabilisation de la membrane externe, puisque seule, chacune peut déclencher, une fois libérée, l'apoptose nucléaire (Zhivotovsky *et al.*, 1998 ; Susin *et al.*, 1999b). D'autres protéines peuvent aussi servir de marqueurs de perméabilité membranaire, notamment Smac/DIABLO et dans certains cas, certaines procaspases (cf partie 2.4.1.5.iv). Cependant, selon le modèle d'étude et/ou le stimulus apoptotique, ces protéines ne sont pas

libérées simultanément. En effet la libération du cyt *c* peut se faire avant, simultanément ou après celle de l'AIF. Différents pores semblent donc être impliqués (Saito *et al.*, 2000). Il est à noter que les mécanismes de rétentions mitochondriaux peuvent aussi varier. En effet, le cyt *c*, fixé à la bicouche lipidique *via* les cardiolipines, est détaché de ces dernières suite à leur oxydation (Orrenius et Zhivotovsky, 2005) alors que l'AIF, aussi insérée dans la membrane interne, est clivée par les protéases telles que les calpains afin d'être solubilisée (Polster *et al.*, 2005). Dans ce contexte, l'étude de la localisation subcellulaire de plusieurs protéines de l'espace intermembranaire est conseillée. Cette détection peut se faire par western-blotting sur des fractions purifiées (mitochondrie, cytosol, noyau) ou par immuno-fluorescence en détectant une protéine d'intérêt marquée par un fluorochrome. Le compartiment mitochondrial peut d'autre part être caractérisé *via* une protéine mitochondriale, telle que HSP60, marquée à l'aide d'un fluorochrome différent de celui de la protéine d'intérêt (Li, P. *et al.*, 1997 ; Kohler *et al.*, 1999 ; Susin *et al.*, 1999a).

La perméabilisation de la membrane externe peut aussi être caractérisée sur des cellules vivantes. Pour se faire, les cellules sont transfectées de façon transitoire ou stable par une chimère protéine d'intérêt-GFP (Green Fluorescent Protein). Une fois la protéine d'intérêt libérée dans le cytosol, la fluorescence diffuse, le signal est donc moins intense. Dans certains cas particuliers, la microscopie électronique peut être aussi utilisée pour visualiser, suite au gonflement de la matrice mitochondriale, les interstices de la membrane externe à travers lesquels la membrane interne va former des hernies (Vander Heiden *et al.*, 1999 ; Terauchi *et al.*, 2005). Cette perméabilisation est irréversible et est associée à des dysfonctions de la mitochondrie ainsi qu'à la libération de facteurs apoptogènes. Cependant, aucun consensus n'existe quant à la participation de la rupture de la membrane externe lors de la perméabilisation membranaire.

Malgré leur non-utilisation en test de routine dans les laboratoires de recherche liée à une moindre efficacité, des tests biochimiques peuvent permettre de mettre en évidence cette perméabilisation membranaire tels que la diffusion des métabolites synthétisés par les enzymes de l'espace intermembranaire comme la phosphocréatine produit par la créatine kinase (Rostovtseva *et al.*, 2005). De même la disponibilité des enzymes respiratoires suite à l'administration exogène de leurs substrats (NADH oxydase avec NADH et cytochrome *c* oxydase avec le cyt *c*) peut permettre de quantifier l'état d'ouverture du pore VDAC.

- *Perméabilisation de la membrane interne*

La membrane interne est quasiment imperméable à tous les ions, notamment les protons. Ceci permet l'établissement par la chaîne respiratoire d'un gradient de protons qui sera utilisé par le complexe V de la chaîne respiratoire pour la synthèse d'ATP. Ce déséquilibre de charge est à l'origine du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), dont le maintien est vital pour la cellule (Mitchell et Moyle, 1965a, , 1965b). Ainsi les échanges entre la matrice et l'extérieur sont contrôlés par des pores très sélectifs. Une perte transitoire du $\Delta\Psi_m$ à travers l'un de ces pores peut se produire dans les conditions physiologiques (Zoratti et Szabo, 1995 ; Kroemer *et al.*, 1998) mais une dissipation prolongée ou permanente du $\Delta\Psi_m$ est souvent associée à la mort cellulaire (Marchetti *et al.*, 1996 ; Zamzami *et al.*, 2005).

✓ Perméabilisation de la membrane interne médiée par le PTP

Lors de l'apoptose, le principal mécanisme entraînant la perméabilisation de la membrane interne est la transition de perméabilité (PT : permeability transition), qui est une augmentation soudaine de la perméabilité de la membrane interne à des solutés de plus de 1,5 kDa grâce à l'ouverture d'un pore particulier, le PTP (permeability transition pore). L'entrée massive de solutés et d'eau (Hunter *et al.*, 1976) entraîne l'augmentation du volume de la matrice mitochondriale, ce qui aboutit à une distension et une désorganisation des cristaux.

La nature du PTP est encore source de débat mais un consensus tend en faveur d'un complexe multi-protéique nommé le PTPC (permeability transition pore complex) (Figure 23). Ce canal non sélectif de haute conductance et dépendant du voltage est formé par diverses protéines : i) l'ANT, localisée au sein de la membrane interne, appartient à une famille de transporteurs mitochondriaux (Wohlrab, 2005) et est considérée comme l'un des éléments principaux du pore car elle est vitale pour la cellule en permettant les échanges stoechiométriques ADP/ATP au niveau de la membrane interne et peut devenir létal en formant des pores (Halestrap et Brennerb, 2003) ; ii) le VDAC est localisé au niveau de la membrane externe et iii) la cyclophiline D (Cyc D), protéine de l'espace inter-membranaire (Crompton *et al.*, 1999). L'assemblage de ces différents éléments se fait au niveau de points de contacts entre les membranes externe et interne (Zoratti et Szabo, 1994 ; 1995). D'autres protéines peuvent aussi participer à la constitution de ce pore, notamment la créatine kinase localisée au niveau de l'espace intermembranaire et l'hexokinase cytosolique (Beutner *et al.*, 1998 ; He et Lemasters, 2002 ; Bernardi *et al.*, 2006). Différents niveaux d'ouverture du PTP semblent exister : une conformation à faible conductance où la perméabilité est très limitée et une conformation à haute conductance. Dans les mitochondries saines, le PTP fluctue rapidement entre ces deux niveaux de conductances (Petronilli *et al.*, 1999).

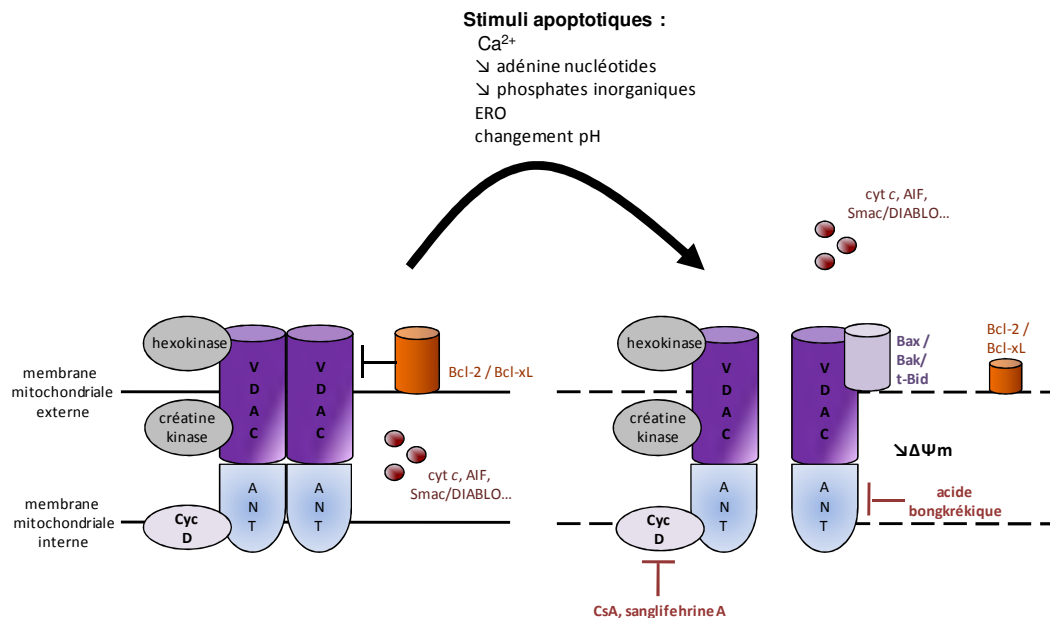


Figure 23 : Le pore de transition de perméabilité ou PTP

L'ouverture du pore peut être induite par différents effecteurs physiologiques tels que le calcium, la diminution de la concentration en adénine nucléotides ou en phosphates inorganiques, la production de radicaux libres oxygénés ou le changement de pH (Crompton *et al.*, 1999). Par ailleurs le pore peut être ouvert en présence des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, tels que Bax, Bak et t-Bid. L'ouverture du pore entraîne une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), un déséquilibre chimique entre la matrice mitochondriale et le cytosol, un découplage de la phosphorylation oxydative provoquant un gonflement osmotique de la matrice mitochondriale, ce qui favorise la libération des molécules apoptogènes par le PTP (Ichas et Mazat, 1998 ; Ly *et al.*, 2003). Cependant il semble que différentes isoformes de VDAC interagissent différemment avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. En effet, la protéine VDAC-2 séquestre Bak, prévenant ainsi son activation et donc l'apoptose (Cheng *et al.*, 2003) : VDAC-2 est donc plutôt anti-apoptotique. Dans d'autres modèles, l'isoforme VDAC-1 interagit directement avec Bax (Pastorino *et al.*, 2002) et est donc davantage pro-apoptotique.

L'ouverture de ce méga-canal peut être inhibée par des inhibiteurs spécifiques du PTP (Figure 23) tels que la cyclosporine A (CsA) (Halestrap *et al.*, 1997 ; Charlot *et al.*, 2004) et la sangliféhrine A (Clarke *et al.*, 2002) (ligands de la cyclophiline D), l'acide bongkrékique (ligand antagoniste de l'ANT ; (Halestrap et Brennerb, 2003)) et les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui peuvent interagir avec le VDAC (Shimizu, S. *et al.*, 2000).

Le rôle exact du PTP lors de la perméabilisation de la membrane mitochondriale est controversé. En effet le gonflement de la matrice mitochondriale n'est pas toujours observé dans des cellules en apoptose et la libération du cyt c précède souvent la dissipation du $\Delta\Psi_m$ et peut même avoir lieu en absence de cette dernière (Goldstein *et al.*, 2005 ; Martinez-Caballero *et al.*, 2005). Par ailleurs il a été montré qu'une inhibition des caspases pouvait protéger les cellules de la chute du $\Delta\Psi_m$ (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998 ; Waterhouse *et al.*, 2002 ; Ricci *et al.*, 2003 ; Bouchier-Hayes *et al.*, 2005). En effet les caspases-3 et -7 sont des médiateurs de la dépolarisation de la membrane mitochondriale lors de l'apoptose (Lakhani *et al.*, 2006). L'ouverture dépendante des caspases du PTP pourrait amplifier la boucle par laquelle la libération précoce du cyt c induirait les modifications au niveau mitochondrial et conforterait l'hypothèse selon laquelle la libération du cyt c précède la dissipation du $\Delta\Psi_m$ (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998).

Par ailleurs, lors de l'apoptose, le rôle de la membrane interne, caractérisé par la chute du $\Delta\Psi_m$, est lui aussi controversé. Selon les modèles d'étude, cette dissipation peut avoir lieu quelques minutes après la perméabilisation de la membrane ou peut nécessiter l'activation des caspases (Green et Kroemer, 2004 ; Ricci *et al.*, 2004a). Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de constituants de la membrane interne impliqués dans les pores membranaires, tels que la cyclosporine A et l'acide bongkrékique, confirme l'implication de la dissipation du $\Delta\Psi_m$ et donc de la membrane interne lors de l'apoptose (Marchetti *et al.*, 1996 ; Zamzami *et al.*, 1996 ; Charlot *et al.*, 2004).

✓ Détection de la perméabilisation de la membrane interne

Dans les conditions physiologiques, la concentration en cations dans la matrice mitochondriale est deux à trois log plus importante que celle observée dans le cytosol. Ainsi, pour mesurer le $\Delta\Psi_m$, différents fluorochromes cationiques peuvent être utilisés (Metivier *et al.*, 1998 ; Castedo *et al.*, 2002), tels que DIOC₆(3) (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide) ($\lambda_{\text{émission}}$: 552nm, vert), MitoTrackerRed ou CMXRos ($\lambda_{\text{émission}}$: 599nm, rouge), TMRM (tétraméthylrhodamine méthylester, $\lambda_{\text{émission}}$: 580nm, orange) et JC-1 (5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazolcarbocyanine iodide,

$\lambda_{\text{émission}}$ fonction de son oligomérisation). Pour l'analyse cytométrique, DIOC₆ et MTRed sont très pratiques car une faible dose est suffisante (Metivier *et al.*, 1998) alors que la rhodamine n'est pas recommandée. Quant à la sonde JC-1, elle s'insère dans la membrane mitochondriale sous forme de monomère ($\lambda_{\text{émission}}$: 527nm, vert) ou sous forme d'agrégats ($\lambda_{\text{émission}}$: 590nm, rouge) si elle est fortement concentrée traduisant un fort $\Delta\Psi_m$. Ainsi le ratio fluorescence vert/fluorescence rouge donne une indication du $\Delta\Psi_m$. L'ensemble de ces fluorochromes peut être utilisé pour étudier la dissipation du $\Delta\Psi_m$ lors de l'apoptose.

La perte transitoire du $\Delta\Psi_m$ observée dans les conditions physiologiques peut aussi être mesurée *via* la méthode de quenching de la calcéine. Cette méthode repose sur la charge des cellules entre la sonde fluorescente calcéine et de son quencher, le cobalt (Co^{2+}) (Huser *et al.*, 1998) (Figure 24). En effet sous forme d'esters acétoxyméthyle, la calcéine est localisée dans divers compartiments cellulaires, notamment les mitochondries alors que son quencher, le cobalt, est à l'extérieur de la matrice mitochondriale puisque la membrane interne est imperméable aux ions : la fluorescence ponctuée marque donc la présence de la calcéine dans la mitochondrie. A l'inverse, suite à la perméabilisation de la membrane interne, Co^{2+} pénètre dans la matrice mitochondriale et abolit le signal fluorescent. Grâce à cette méthode, il a été montré que suite à des dommages à l'ADN ou à une activation de p53, la translocation à la mitochondrie de Bax précédait légèrement ou était simultanée à la perméabilisation de la membrane interne (Pastorino *et al.*, 1999 ; Scorrano *et al.*, 2003).

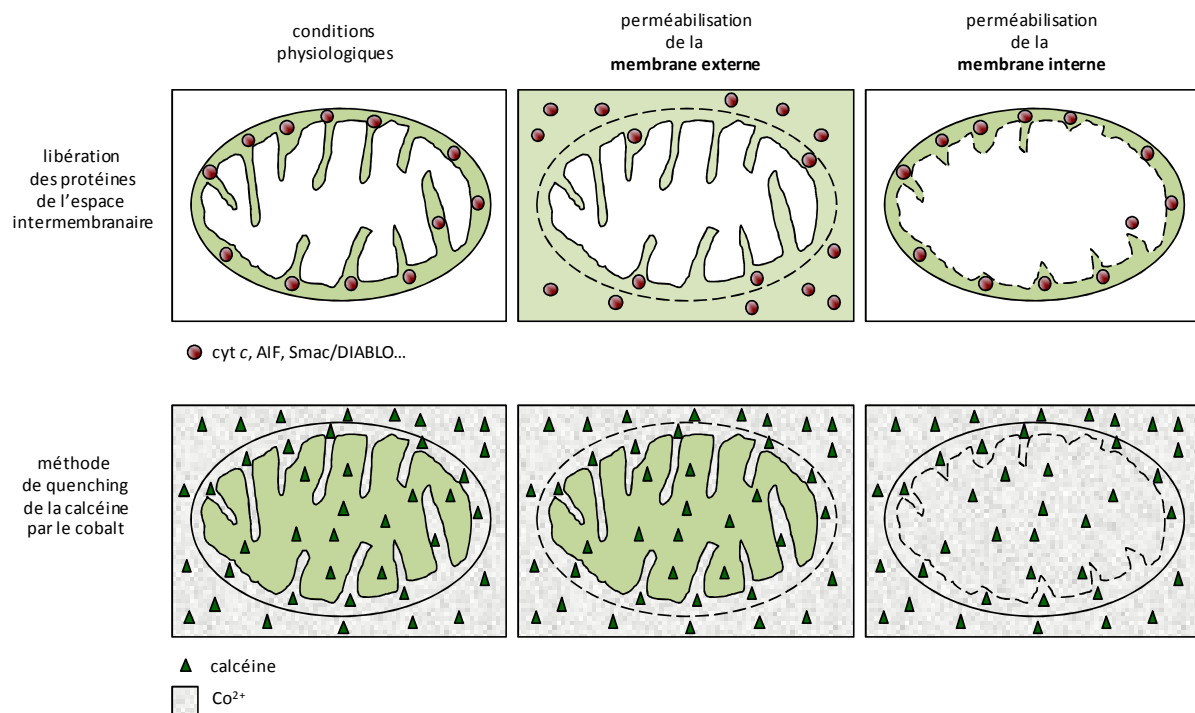


Figure 24 : Détection de la perméabilisation des membranes externe et interne (d'après Kroemer *et al.*, 2007)

Pour obtenir des informations supplémentaires sur la perméabilisation de la membrane interne, la microscopie électronique peut aussi être utilisée afin de visualiser l'augmentation du volume de la matrice suite à l'entrée massive des solutés et d'eau. Il s'en suit une distension et une désorganisation des cristaux ainsi qu'une diminution de la densité des électrons dans la matrice. Ce procédé a été utilisé *in vivo* lors de l'apoptose d'hépatocytes induite par Fas ou par une déplétion en glutathion (Feldmann *et al.*, 2000 ; Haouzi *et al.*, 2001).

Les protéines Bax et Bak peuvent donc médier la perméabilisation de la membrane mitochondriale en agissant ou non avec les protéines du PTP. Dans ce contexte, 2 mécanismes sont responsables de cette perméabilisation: la perméabilisation de la membrane externe médiée par Bax et indépendante de la membrane interne et la perméabilisation médiée par le PTP impliquant les membranes externe et interne. Ces 2 mécanismes permettent la libération de molécules apoptogènes de l'espace intermembranaire et *in fine* la mort de la cellule par apoptose. Le ou les mécanisme(s) responsable(s) du passage des molécules de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol restent toutefois controversés et dépendent probablement du contexte cellulaire. Cependant, ces 2 modèles semblent coexister au sein des cellules en apoptose. En effet la contribution du PTP à la perméabilisation de la membrane mitochondriale médiée par Bax semble liée à la concentration de Bax ainsi qu'à son état d'oligomérisation (Pastorino *et al.*, 1999). En effet, une grande quantité de Bax administrée à des mitochondries isolées entraîne la perméabilisation de la membrane *via* le PTP puisque la cyclosporine A inhibe cet évènement. Il s'en suit un gonflement de la membrane mitochondriale suivie de la libération du cyt *c*. A l'inverse un faible taux de Bax ne provoque ni gonflement de la membrane mitochondriale ni dépolarisation. Par ailleurs il a été montré que lors de la nécrose, la perméabilisation membranaire impliquerait davantage le PTP alors qu'elle nécessiterait les membres de la famille Bcl-2, indépendamment du PTP, lors de l'apoptose (Baines *et al.*, 2005 ; Nakagawa *et al.*, 2005 ; Kroemer *et al.*, 2007). Toutefois, dans de nombreux modèles, la mort cellulaire par apoptose est inhibée par la cyclosporine A (Halestrap *et al.*, 1997 ; Charlot *et al.*, 2004) et l'acide bongkrélique, inhibiteurs du PTP (Zamzami *et al.*, 2005).

- Rôle de la fission et de la fusion mitochondriales lors de la perméabilisation de la membrane mitochondriale

Une autre source de débat dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale est le rôle des protéines de fission (fragmentation discrète de l'organite en plusieurs entités) et de fusion (élongation des mitochondries formant un large réseau interconnecté) mitochondriales (Perfettini *et al.*, 2005). Ces protéines, notamment celles de la fission mitochondriale, ne semblent pas être impliquées mais peuvent, dans certains cas, accélérer la perméabilisation (Alirol et Martinou, 2006 ; Cereghetti et Scorrano, 2006). Les cristaux, responsables des repliements complexes de la membrane interne, forment des structures lamellaires et tubulaires qui communiquent avec l'espace intermembranaire *via* des jonctions serrées, créant une barrière. La majorité du cyt *c* (~85%) est contenue dans cet espace. Le cyt *c* doit donc migrer vers l'espace intermembranaire pour pouvoir être par la suite libéré de la mitochondrie au profit du cytosol. Le remodelage des cristaux permet l'élargissement des jonctions, la suppression de la barrière de diffusion et la translocation du cyt *c* (Scorrano *et al.*, 2002). Différentes protéines impliquées dans la dynamique (fusion et fission) jouent

un rôle lors de la réorganisation des cristaux au cours de l'apoptose. Par exemple, la protéine de fission Drp1 (Dynamamin-related protein 1) est nécessaire à la libération optimale du cyt c (Germain *et al.*, 2005). De plus, les jonctions serrées semblent être maintenues par la protéine Opa1 (optic atrophy 1) (Frezza *et al.*, 2006), protéine de la membrane interne impliquée dans la dynamique mitochondriale (Chen et Chan, 2005 ; Perfettini *et al.*, 2005). L'activité protéolytique de Opa1 est médiée par PARL (presenilin-associated rhomboid-like), protéase à sérine localisée au niveau de la membrane interne et dont l'orthologue chez la levure est impliquée dans la fusion mitochondriale (Cipolat *et al.*, 2006). Une fois clivée, Opa1 est libérée dans l'espace intermembranaire. Les 2 formes d'Opa1 forment des oligomères qui préservent les jonctions serrées dans une configuration tête-bêche (Cipolat *et al.*, 2006 ; Frezza *et al.*, 2006). Lors du remodelage des cristaux, c'est-à-dire lorsque les mitochondries sont exposées à Bid ou suite à un gonflement osmotique, ces oligomères sont perturbés. De nombreuses relations ont été établies entre la dynamique mitochondriale et l'apoptose (Perfettini *et al.*, 2005 ; Youle et Karbowski, 2005). Dans ce contexte, il serait intéressant de mieux cerner les relations et les rôles entre la fusion mitochondriale qui se déroule aussi lors de l'apoptose, le remodelage des cristaux et les différents constituants des pores membranaires.

2.4.3.4. Phase 3 de la voie apoptotique mitochondriale : exécution/dégradation

La grande variété de protéines stockées au sein de l'espace intermembranaire des mitochondries et libérées dans le cytosol au cours de l'apoptose indique le rôle clé de ces organites lors de l'exécution de l'apoptose.

En réponse à un stimulus apoptotique, la libération de diverses protéines semble suivre un ordre selon le type cellulaire et/ou le stimulus apoptotique. Cependant, de manière générale, le cyt c, HtrA2/Omi et Smac/DIABLO (Saelens *et al.*, 2004) seraient libérés en premier suivis par l'AIF et l'endonucléase G (EndoG) (Arnoult *et al.*, 2003 ; Penninger et Kroemer, 2003). Au cours de cet exposé, nous nous focaliserons sur l'étude de 2 protéines impliquées dans des voies apoptotiques distinctes : le cyt c avec la voie apoptotique mitochondriale dépendante des caspases et l'AIF, facteur impliqué dans la voie apoptotique mitochondriale indépendante des caspases.

- *Le cytochrome c et la voie apoptotique dépendante des caspases*

- ✓ *Le cytochrome c*

Codé par un gène nucléaire, le cytochrome c (cyt c), décrit en 1930 par Keilin (Keilin, 1930) est une protéine de petite taille d'environ 13 kDa synthétisée sous la forme d'un précurseur inapte à l'induction de l'apoptose, l'apocytochrome c. Pendant son transfert à la mitochondrie, il se lie avec un hème *via* la cytochrome c lyase. On parle alors d'holocytochrome c ou de cytochrome c. Au niveau mitochondrial où 2 pools de cyt c résident (Ott *et al.*, 2002), il est localisé au niveau de l'espace intermembranaire. Une minorité, environ 15%, liée par interactions électrostatiques et hydrophobes, participe activement à la chaîne respiratoire en transférant les électrons du complexe III (cyt c

réductase) au complexe IV (cyt c oxydase) (Ravagnan *et al.*, 2002). La majorité du cyt c, environ 85%, faiblement attachée à la membrane interne *via* de faibles interactions électrostatiques avec les cardiolipines, lipides membranaires, est facilement mobilisable. Les cardiolipines semblent nécessaires à l'ancrage du cyt c à la membrane mitochondriale interne. Ce pool ne participe pas à la chaîne respiratoire mais semble davantage impliquée dans l'activité peroxydase du cyt c (Kagan *et al.*, 2004).

En plus de son activité vitale pour la survie de la cellule, le cyt c est aussi impliqué dans la mort cellulaire programmée de nombreux organismes (*Xenopus Laevis*, souris, Homme...) (Li *et al.*, 1997 ; Ameisen, 2002). Un défaut de cyt c étant léthal pour l'organisme, la mise en évidence du rôle du cyt c lors de l'apoptose a été difficile. En 1996, il fut montré comme étant nécessaire à l'activation de la caspase-3 (Liu *et al.*, 1996). Par la suite, l'invalidation du gène codant le cyt c a confirmé son rôle primordial lors de l'apoptose (Li *et al.*, 2000). Un modèle de souris exprimant un mutant cyt c noté allèle KA a été mis au point. Dans ce modèle, le cyt c exerce pleinement sa fonction physiologique au niveau de la chaîne respiratoire alors que sa fonction lors de l'apoptose est défectueuse (Hao *et al.*, 2005), ce qui permet de mieux caractériser le rôle apoptotique du cyt c. Les anomalies observées chez ces souris sont comparables à celles décrites chez les souris déficientes en caspase-9 ou en Apaf-1. Les deux activités (transport des électrons et activation des caspases) sont dues à des domaines de la protéine différents et donc répondent à des principes biochimiques distincts. En effet, la substitution de l'atome de fer au niveau de l'hème abolit l'activité de transfert des électrons du cyt c mais n'affecte pas la fonction pro-mort (Kagan *et al.*, 2004). Par mutagenèse dirigée, le résidu lysine (K) en position 72 a été montré comme étant essentiel pour l'activité pro-apoptotique mais pas pour la fonction respiratoire (Sharonov *et al.*, 2005).

✓ La libération du cytochrome c et sa régulation

Aucun consensus n'existe quant à la libération des différentes protéines de l'espace intermembranaire, à savoir sont-elles libérées simultanément ou ont-t-elles des cinétiques et donc un ordre de libération différents ? En effet, dans certains modèles, la libération du cyt c est un évènement précoce qui précède la libération des autres facteurs apoptogènes de l'espace intermembranaire (Arnoult *et al.*, 2003). Ce délai peut être lié au fait que la libération des autres protéines, notamment AIF et Endo G, nécessite d'autres étapes telles que la maturation de l'AIF au sein de l'espace intermembranaire (Otera *et al.*, 2005) ou son clivage par des calpaines (Uren *et al.*, 2005). Une fois libérée dans le cytosol, l'AIF peut soutenir la libération du cyt c (Dumont *et al.*, 2000 ; Cregan *et al.*, 2004). Les différences observées quant à la libération du cyt c peuvent en partie s'expliquer par sa fixation à la membrane interne mitochondriale, suggérant que dans certains modèles, la perméabilisation de la membrane mitochondriale est suivie de la libération de l'AIF alors que le cyt c est encore attaché à la membrane interne. Dans ce contexte, la perméabilisation de la membrane mitochondriale est suivie de la libération notamment de Smac/DIABLO avant celle du cyt c (Uren *et al.*, 2005).

La libération du cyt c est considérée comme l'une des étapes clés de la voie apoptotique mitochondriale (Li *et al.*, 1997) mais est sujette à controverse. En effet, l'équipe du Pr Green a montré que cette libération était rapide (5 minutes) et totale et qu'elle précédait la chute du potentiel membranaire mitochondrial (Goldstein *et al.*, 2000a, 2000b). Dans certains modèles, la libération du cyt c semble être médiée par le PTP car cette libération est inhibée par la CsA (Scorrano *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.*, 2003 ; Karpnich *et al.*, 2006). A l'inverse, dans d'autres modèles, cette

libération est médiée par d'autres types de pores car ni la CsA (Eskes *et al.*, 1998 ; Brustovetsky *et al.*, 2005) ni un déficit en Cyc D (Baines *et al.*, 2005 ; Nakagawa *et al.*, 2005) n'affectent cette libération.

Par ailleurs, il a été montré que la libération du cyt *c* pouvait être simultanée à la chute du $\Delta\Psi_m$ (Heiskanen *et al.*, 1999). Cependant une libération de cyt *c* précédant la chute du $\Delta\Psi_m$ tend aussi en faveur de la co-existence de 2 pools de cyt *c* dans la mitochondrie. Le cyt *c* lié aux cardiolipines permettrait d'assurer la respiration mitochondriale lors de la libération du premier stock pour maintenir la production d'ATP nécessaire à la formation de l'apoptosome (Martinou *et al.*, 2000).

De nombreux travaux confortent l'hypothèse selon laquelle la libération du cyt *c* est biphasique (Scorrano *et al.*, 2002 ; Garrido *et al.*, 2006b). La perméabilisation de la membrane mitochondriale entraîne une première vague de libération du cyt *c*. Cette vague affecte le pool minoritaire de cyt *c*, celui soluble ou faiblement lié à la membrane mitochondriale interne. Par la suite, la seconde vague de cyt *c* va être libérée et concerne le principal pool de cyt *c*, celui séquestré par les cardiolipines (Ott *et al.*, 2002 ; Orrenius et Zhivotovsky, 2005). Dans ce modèle, la première vague de cyt *c* libérée permet la libération complète du cyt *c*, via 3 boucles d'amplifications (Figure 25).

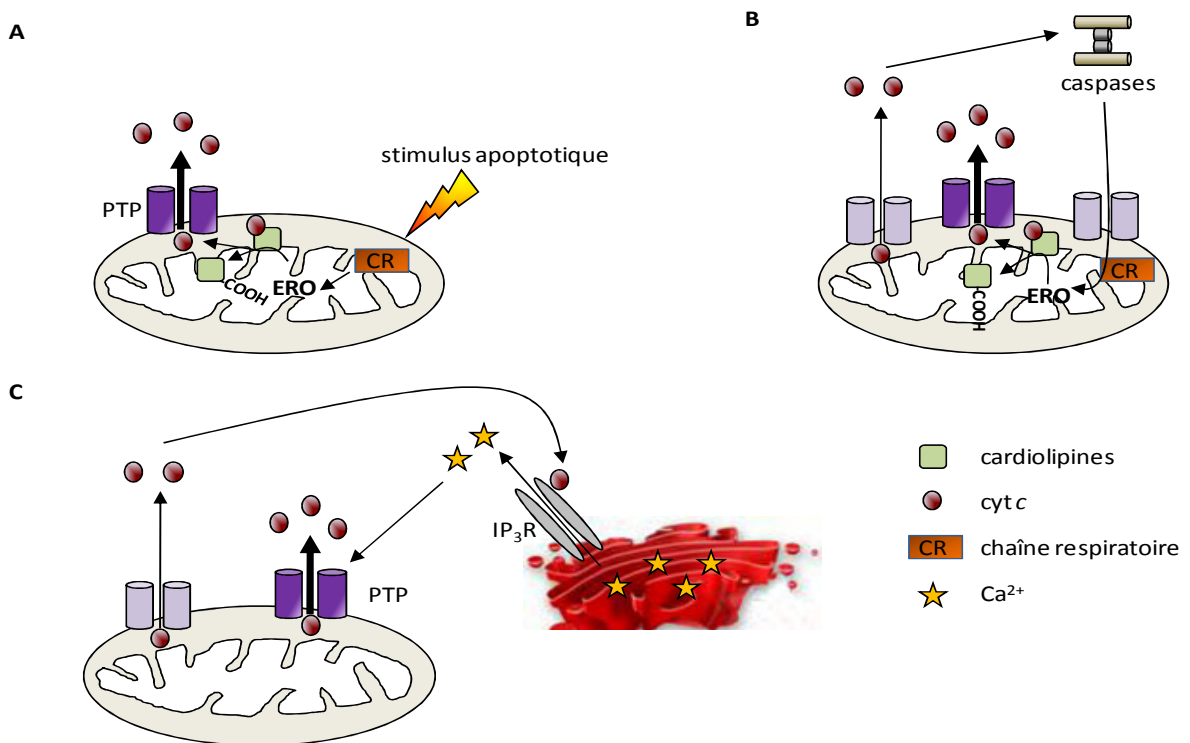


Figure 25 : Les boucles d'amplification permettant la libération biphasique du cyt *c* (d'après Garrido *et al.*, 2006b)

A) Amplification liée à la production des ERO et l'oxydation des cardiolipines.

B) Amplification liée à l'activation des caspases.

C) Amplification liée à la mobilisation du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique

La première boucle d'amplification est la production des ERO et l'oxydation des cardiolipines (Figure 25A). Lors de l'apoptose, le transport des électrons peut être perturbé, ce qui favorise la production par les complexes I et III de la chaîne respiratoire des ERO, molécules très réactives. Les cardiolipines, particulièrement riches en acides gras insaturés, sont des cibles privilégiées des ERO. Du fait de la demi-vie courte des ERO, les cardiolipines sont les seuls phospholipides de la membrane mitochondriale à être oxydés précocement lors de l'apoptose. Le cyt *c* lié aux cardiolipines peut aussi les oxyder (Kagan *et al.*, 2005). Les cardiolipines oxydées ont une moindre affinité pour le cyt *c*, lequel se détache et devient soluble dans l'espace intermembranaire (Orrenius et Zhivotovsky, 2005). De plus, les cardiolipines oxydées favorisent l'assemblage et l'activité du PTP (Kagan *et al.*, 2004 ; Nakagawa, 2004).

La seconde boucle d'amplification est liée à l'activation des caspases (Figure 25B). La caspase-8 peut activer la libération du cyt *c* par l'intermédiaire de t-Bid en favorisant la formation de pores membranaires Bax et/ou Bak. Par ailleurs la caspase-2 peut aussi favoriser la libération du cyt *c* en activant Bax directement (Park *et al.*, 2007) ou indirectement *via* t-Bid (Gogvadze *et al.*, 2006). Des siRNA caspase-2 bloquent la libération du cyt *c* induite par un stress génotoxique (Lassus *et al.*, 2002). La caspase-2 peut aussi induire la libération du cyt *c* en interagissant avec le pool lié aux cardiolipines (Gogvadze *et al.*, 2006) ou indépendamment de son activité enzymatique en altérant la fonction respiratoire (Robertson *et al.*, 2004). Toutefois, la majorité des études ont montré, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de caspases, que la libération initiale du cyt *c* était indépendante des caspases (Goldstein *et al.*, 2000b), ce qui permet le maintien de la chaîne respiratoire qui approvisionne ainsi la cellule en ATP, lequel est nécessaire pour l'activation subséquente des caspases dans le cytosol. Une fois activées, les caspases pénètrent dans la mitochondrie par les pores membranaires pour bloquer totalement la chaîne respiratoire, telle la caspase-3 qui clive la sous-unité de 75 kDa du complexe I, empêchant le transfert des électrons du complexe I au complexe II (Ricci *et al.*, 2004a). L'ensemble de ces phénomènes pouvant aboutir *in fine* à la mort de la cellule.

La troisième boucle d'amplification concerne la mobilisation du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique (Figure 25C). Le cyt *c* libéré précocement lors de l'apoptose peut lier au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique les récepteurs à l'IP₃ (inositol 1,4,5-triphosphate), ce qui favorise la libération du calcium du réticulum endoplasmique au profit du cytosol (Boehning *et al.*, 2003). Ce calcium active alors le PTP, ce qui résulte en la libération du cyt *c*. Les protéines Bax, Bak et Bcl-2 sont aussi présentes au niveau du réticulum endoplasmique où elles vont respectivement faciliter ou inhiber la libération du calcium (Oakes *et al.*, 2005 ; Hanson *et al.*, 2008).

Quelquesoit la boucle d'amplification, la libération du cyt *c* est un phénomène hautement régulé (Ow *et al.*, 2008). Parmi les régulateurs, la protéine t-Bid participe au remodelage des cristaux (Scorrano *et al.*, 2002) ce qui permet la libération maximale et facilite la mobilité du cyt *c* à l'intérieur des mitochondries (Gillick et Crompton, 2008). Un autre régulateur de la libération du cyt *c* est la fission mitochondriale (Martinou et Youle, 2006). En effet, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe ainsi que la libération du cyt *c* sont atténuées chez des souris déficientes pour la machinerie de fission mitochondriale. La quantité de cyt *c* libérée avant le recrutement des protéines de fission est suffisante pour permettre la formation de l'apoptosome. La fission mitochondriale permet d'amplifier la perméabilisation de la membrane externe et la libération du cyt *c* par un rétrocontrôle positif. La mitogaline, protéine mitochondriale codée par le gène *Galg* (*galectin-3 internal gene*) induit la mort cellulaire en favorisant la libération du cyt *c* suite à son interaction avec les cardiolipines (Gonzalez *et al.*, 2007). Cette libération de cyt *c* est inhibée par une

sur-expression de Bcl-xL mais n'est pas modifiée suite à la sur-expression de Bcl-2 (Duneau *et al.*, 2005). Par ailleurs, il semble que la quantité de cyt *c* libérée influence les événements en aval (Khodjakov *et al.*, 2004). En effet une concentration seuil qui varie selon le type cellulaire semble nécessaire pour permettre l'activation subséquente de la caspase-9.

✓ L'apoptosome

Une fois libéré dans le cytosol, le cyt *c* permet l'assemblage d'un complexe protéique de grande taille (700 kDa), l'apoptosome. Ce complexe est une plate-forme moléculaire constituée du cyt *c*, de la molécule adaptatrice Apaf-1, de la procaspase-9 et d'ATP/dATP (Bao et Shi, 2007) (Figure 26).

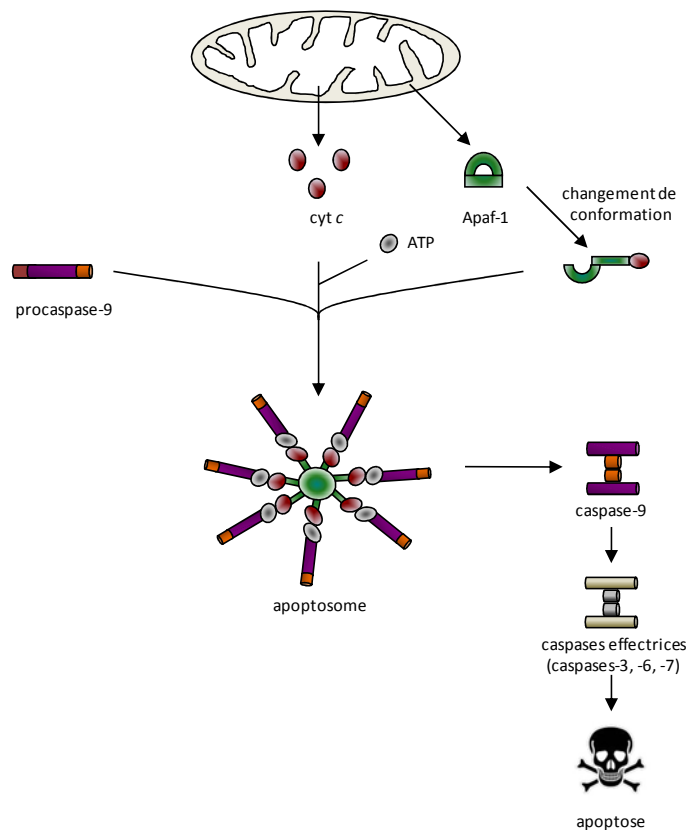


Figure 26 : Formation de l'apoptosome

La protéine Apaf-1 est une protéine cytosolique d'environ 130 kDa. Elle comporte un domaine CARD à l'extrémité amino-terminale, un domaine ayant une forte homologie avec CED-4 et un domaine contenant 12 à 13 motifs répétés WD-40 permettant la liaison avec le cyt *c* à l'extrémité carboxy-terminale (Zou *et al.*, 1997). La liaison du cyt *c* à Apaf-1 facilite l'association des nucléotides ATP/dATP à Apaf-1, ce qui expose le domaine CARD d'Apaf-1. Apaf-1 peut alors s'oligomériser rapidement. L'apoptosome ainsi formé permet de recruter la procaspase-9 *via* une interaction entre les domaines CARD (Adrain *et al.*, 1999 ; Jiang et Wang, 2000). La structure 3D de l'apoptosome est un heptamère avec des rayons et un centre, on parle de roue de la mort (Acehan *et al.*, 2002). L'activation de la caspase-9 est liée à la dimérisation médiée par interaction entre les domaines CARD et non à son clivage protéolytique (Riedl et Salvesen, 2007). La caspase-9 active alors une cascade de caspases *via* le recrutement de caspases effectrices sous-jacentes (caspase- 3, -6 et -7) qui sont à leur

tour clivées pour devenir actives (Slee *et al.*, 1999). Ces caspases contribuent au démantèlement de nombreuses structures cellulaires, notamment les mitochondries. En effet elles peuvent accéder à l'espace intermembranaire suite à la perméabilisation de la membrane externe où elles dégradent les principaux constituants du complexe I de la chaîne respiratoire, stoppant le flux d'électrons au niveau de la membrane interne mitochondriale (Ricci *et al.*, 2004a). Mais la principale activité des caspases effectrices est d'activer des nucléases et des hélicases. Dans le cytosol, les caspases-3 et -7 vont activer CAD/DFF40 en clivant son inhibiteur ICAD/DFF45. CAD est alors transloquée dans le noyau où elle participe à la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN (Liu *et al.*, 1997 ; Sakahira *et al.*, 1998). La caspase-3 clive aussi ACINUS (apoptotic chromatin condensation induced in the nucleus) qui condense alors la chromatine (Sahara *et al.*, 1999). Les caspases effectrices vont aussi cliver HELICARD, hélicase cytosolique contenant un domaine CARD. Dépourvue du domaine CARD, HELICARD gagne alors le noyau où elle accélère la dégradation de l'ADN induite par Fas (Kovacovics *et al.*, 2002). Ainsi, CAD, ACINUS et HELICARD agissent en aval des caspases pour réorganiser la chromatine des cellules en apoptose. Deux autres facteurs libérés de la mitochondrie participent aussi à la condensation de la chromatine nucléaire et la fragmentation de l'ADN : Endo G et AIF (cf partie ci-dessous).

✓ Régulation de l'apoptosome

L'apoptosome peut être régulé à différents niveaux par de nombreuses protéines (Figure 27) (Faddeel *et al.*, 2008), notamment les IAPs (cf partie 2.4.1.5) qui inhibent la mort cellulaire en inhibant l'activité protéolytique des caspases (Fesik et Shi, 2001). Les protéines Smac/DIABLO et HtrA2/Omi, libérées de la mitochondrie suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Cain *et al.*, 2002 ; Saelens *et al.*, 2004), interagissent, une fois dans le cytosol, avec les IAPs *via* un domaine de liaison aux IAPs en extrémité amino-terminale, ce qui les inactivent.

De plus le taux de nucléotides empêche la formation de l'apoptosome par un mécanisme d'interaction direct avec le cyt *c* (Chandra *et al.*, 2006). Ainsi les pools de nucléotides intra-cellulaires sont des facteurs de pro-survie. Une concentration intra-cellulaire physiologique de potassium (K^+) supprime la formation de l'apoptosome et cette inhibition est levée en présence d'une grande quantité de cyt *c* (Cain *et al.*, 2001). Les niveaux physiologiques de calcium préviennent l'activation de la caspase-9 mais ne semblent pas avoir d'effet sur l'assemblage de l'apoptosome (Bao et Shi, 2007). D'autres protéines peuvent aussi affecter l'activité de l'apoptosome, notamment les protéines de choc thermique HSP27, HSP70 et HSP90 (cf partie 2.4.1.5). De plus, l'oncoprotéine ProT (prothymosine- α), impliquée dans la prolifération cellulaire, empêche la formation de l'apoptosome (Jiang *et al.*, 2003) alors que la protéine suppresseur de tumeur PHAP1 (putative HLA-DR-associated protein-1) facilite l'activation de la caspase-9 (Jiang *et al.*, 2003) et de la caspase-3 (Hill *et al.*, 2004).

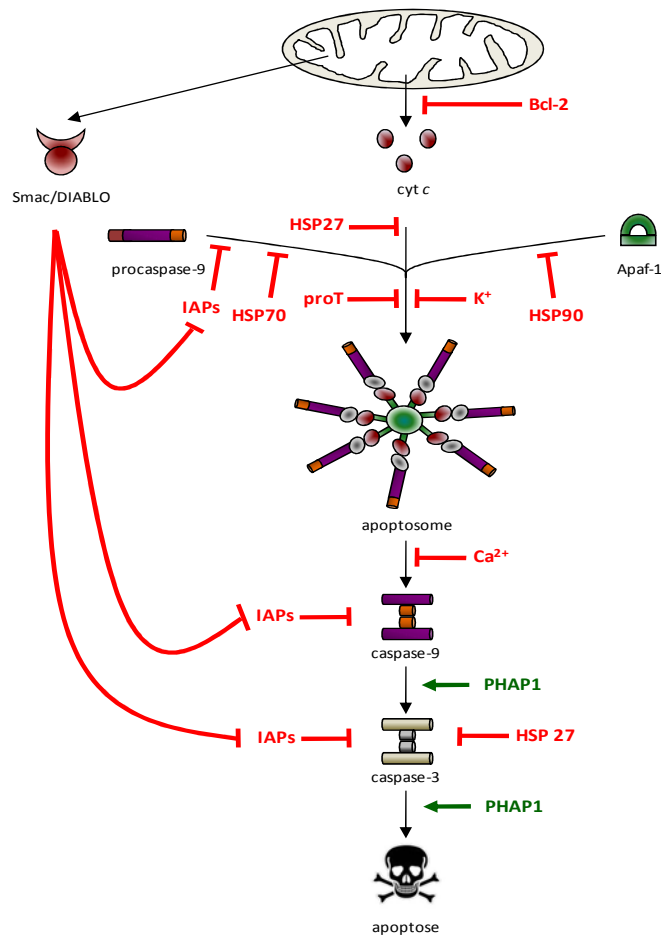


Figure 27 : Régulation de l'apoptosome

- L'AIF et la voie indépendante des caspases

✓ L'AIF

L'AIF ou apoptosis-inducing factor, clonée en 1999 par l'équipe de G.Kroemer (Susin *et al.*, 1999b) est une protéine bi-fonctionnelle qui joue un rôle important aussi bien dans une cellule saine que dans une cellule en apoptose. Seule, elle est capable d'induire l'apoptose de noyaux isolés malgré l'absence d'activité caspase (Susin *et al.*, 1999b). Cette protéine est la première à avoir été identifiée dans un mécanisme de mort en absence de caspases et est considérée, à l'heure actuelle, comme le principal effecteur de la mort cellulaire indépendante des caspases, mort nommée « apoptosis-like cell death » (Leist et Jaattela, 2001).

Codée par le gène nucléaire « *programmed cell death 8* » localisé sur le chromosome X, l'AIF est une protéine conservée phylogénétiquement et constituée de différents domaines : i) à l'extrémité amino-terminale, 2 séquences d'adressage à la mitochondrie, ii) une séquence intermédiaire composée du domaine de fixation au cofacteur FAD (flavine adenine dinucleotide) et iii) à l'extrémité carboxy-terminale, le domaine de liaison au NADH (nicotinamide adenine dinucleotide reduced) ainsi que 2 sites de localisation nucléaire (Susin *et al.*, 1999b).

L'AIF est synthétisée sous la forme d'un précurseur cytosolique d'environ 67 kDa. Grâce aux séquences d'adressage à la mitochondrie, ce précurseur est alors transloqué dans la matrice mitochondriale avant de retourner dans l'espace intermembranaire (Otera *et al.*, 2005). A ce niveau, la séquence d'adressage à la mitochondrie est clivée par une protéase (Otera *et al.*, 2005), l'AIF est alors ancrée à la membrane interne (Zhu *et al.*, 2003 ; Uren *et al.*, 2005) *via* un segment transmembranaire situé entre les résidus 67-87. L'extrémité amino-terminale est exposée dans la matrice et l'extrémité carboxy-terminale se situe dans l'espace intermembranaire (Otera *et al.*, 2005) (Figure 28).

Dans une cellule saine, l'AIF a une activité oxydo-réductase, caractérisée par les domaines de liaison au FAD et au NADH, qui transfère les électrons au niveau du complexe I (Vahsen *et al.*, 2004 ; Urbano *et al.*, 2005) et du complexe III (Vahsen *et al.*, 2004) de la chaîne respiratoire. Dans les cellules saines, la fonction d'oxydo-réduction confère à l'AIF une fonction physiologique vitale (Miramar *et al.*, 2001). En effet, une perte d'expression de l'AIF favorise la production d'ERO *via* le défaut de transfert d'électrons au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire, (Apostolova *et al.*, 2006). En retour, cette production d'ERO augmente la sensibilité des cellules au stimulus apoptotique (Perier *et al.*, 2005). Des études sur des souris déficientes en AIF ont confirmé le rôle protecteur de l'activité oxydo-réductase de l'AIF contre la production d'ERO (Joza *et al.*, 2005).

De plus, l'AIF est nécessaire pour le développement embryonnaire puisqu'une ablation totale du gène est létale (Joza *et al.*, 2001). En effet, l'AIF semble impliquée dans la première vague de mort cellulaire lors de la morphogénèse chez les Mammifères. Dans ce contexte, *in vivo*, le seul système viable abritant une protéine AIF mutée est la souris dite Harlequin (Hq), chez laquelle l'expression de l'AIF est réduite de 80% par rapport à l'expression de la protéine AIF sauvage (Klein *et al.*, 2002). Toutefois, ces souris Hq présentent une dégénérescence du système nerveux, la dégénérescence de la rétine conduisant à la cécité.

✓ Libération de l'AIF

Comme le *cyt c*, l'AIF est aussi un effecteur de mort dans la cellule en apoptose. La majorité des études ont montré que la libération de l'AIF est un évènement indépendant de l'activation des caspases (Susin *et al.*, 1999a ; Susin *et al.*, 1999b ; Susin *et al.*, 2000 ; Yu *et al.*, 2002) alors que dans certains cas, cette libération est prévenue par des inhibiteurs de caspases (Arnoult *et al.*, 2003). La contribution de l'AIF dans l'induction de la mort cellulaire semble fonction des espèces, du type cellulaire et du stimulus apoptotique (Cregan *et al.*, 2004).

La fonction létale (activité pro-apoptotique nucléaire) de l'AIF, qui est portée par l'extrémité carboxy-terminale (Cheung *et al.*, 2006), est indépendante de sa fonction d'oxydo-réduction (activité vitale mitochondriale) (Loeffler *et al.*, 2001 ; Miramar *et al.*, 2001). Suite à un stimulus apoptotique, l'AIF est libérée de la mitochondrie au profit du cytosol puis est transloquée au noyau. Cette libération se fait en 2 étapes successives (Figure 28). Tout d'abord, une protéase clive près de 100 AA, ce qui libère l'AIF de la membrane interne, puis, une fois soluble dans l'espace intermembranaire, l'AIF est libérée de cet espace au profit du cytosol suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Otera *et al.*, 2005 ; Uren *et al.*, 2005). Ces étapes de maturation peuvent expliquer la libération précoce du *cyt c* dans certains modèles alors que l'AIF est retenue (Uren *et al.*, 2005). Toutefois, dans d'autres cas, l'AIF est libérée avant le *cyt c*, ce dernier étant retenu par les cardiolipines (Zhu *et al.*, 2003 ; Uren *et al.*, 2005). De plus, il semble qu'un pool d'AIF mature mobile soit présent dans la matrice mitochondriale (Cregan *et al.*, 2004 ; Modjtahedi *et al.*, 2006). Plusieurs

études ont montré que la libération de l'AIF était moins rapide que celle des autres facteurs apoptogènes libérés simultanément, notamment le cyt c, Smac/DIABLO, Endo G (Munoz-Pinedo *et al.*, 2006). Cette libération plus lente tend en faveur de la nécessité d'une maturation de l'AIF (Munoz-Pinedo *et al.*, 2006).

L'AIF soluble est nommée aussi t-AIF (truncated-AIF) (Polster *et al.*, 2005 ; Yuste *et al.*, 2005). Le clivage de l'AIF pour obtenir la forme soluble pro-apoptotique est spécifiquement réalisé par deux familles de protéases à cystéine, différentes des caspases, les calpaines et les cathepsines (Figure 28). Le clivage de l'AIF au niveau des résidus 102 et 103 par les calpaines est dépendant du calcium alors que le clivage par les cathepsines est indépendant du calcium (Yuste *et al.*, 2005).

Impliquées dans de nombreux mécanismes régulés par le calcium, notamment la transduction du signal, la prolifération cellulaire, la fusion membranaire et la mort cellulaire programmée (Goll *et al.*, 2003), les calpaines sont une famille hétérogène de protéases à cystéine (Goll *et al.*, 2003 ; Saez *et al.*, 2006) fonctionnant sous formes d'hétérodimères. Le membre le plus étudié est la calpaine I ou μ -calpaine. Les calpaines sont activées suite à la fixation de calcium, ce qui entraîne un clivage autocatalytique à l'extrémité amino-terminale. Les calpaines sont impliquées dans la mort cellulaire programmée de type I (Toyota *et al.*, 2003) et de type III (Moubarak *et al.*, 2007). Elles régulent positivement et négativement la mort programmée de type I ou apoptose. En effet, les calpaines peuvent d'une part cliver les caspases-3 et -12 ce qui active l'apoptose et d'autre part dégrader p53 ainsi que les caspases-7 et -9, ce qui inhibe l'apoptose (Goll *et al.*, 2003). Les protéines pro-apoptotiques Bax (Cao *et al.*, 2003) et Bid sont aussi activées par les calpaines (Chen *et al.*, 2001). Une fois clivée, t-Bid favorise la perméabilisation de la membrane externe *via* la formation de pores membranaires, les calpaines cytosoliques peuvent alors intégrer l'espace intermembranaire (Figure 28). A ce niveau, la calpaine I clive l'AIF en forme soluble (Polster *et al.*, 2005). Cette connexion entre calpaines/protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2/AIF a été confirmée dans un modèle d'ischémie cérébrale focale (Culmsee *et al.*, 2005).

Quant aux cathepsines, elles sont principalement présentes au niveau des lysosomes où elles sont inactives. Lors de leur transfert dans le réticulum endoplasmique, elles sont clivées pour devenir des cathepsines matures (Turk *et al.*, 2000). Cette famille regroupe des protéases à cystéine mais aussi des protéases à sérine et à acide aspartique (Turk *et al.*, 2000). Les cathepsines sont impliquées dans la régulation de l'apoptose. La libération des cathepsines des lysosomes au profit du cytosol précède la chute du potentiel membranaire mitochondrial (Kagedal *et al.*, 2005). Les cathepsines peuvent cliver Bid en t-Bid (Stoka *et al.*, 2001). Ce dernier favorise alors la dépolarisation de la membrane mitochondriale externe aboutissant *in fine* à la libération de l'AIF (Yacoub *et al.*, 2006). En effet OSU-03012, inhibiteur de la kinase PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1), entraîne la mort de diverses cellules transformées *via* la libération de l'AIF médiée par la cathepsine B et Bid (Yacoub *et al.*, 2006) et la trichostatine A entraîne l'apoptose des cellules Akata (lymphome de Burkitt) à travers la libération de l'AIF médiée par la cathepsine B (Son *et al.*, 2006). Cependant, les cathepsines peuvent entraîner la mort de la cellule en absence de Bid (Houseweart *et al.*, 2003).

Le clivage de l'AIF par les calpaines et les cathepsines peut expliquer l'inefficacité du z-VAD, inhibiteur générique de l'ensemble des caspases, sur la libération de l'AIF (Arnoult *et al.*, 2003) puisque cette libération est considérée comme un phénomène indépendant de l'activation des caspases. Toutefois, le z-VAD peut aussi inhiber les calpaines et les cathepsines. Dans ce contexte, la libération de l'AIF serait influencée par le z-VAD en fonction du pool majoritaire présent au sein de la mitochondrie, à savoir forme soluble vs forme ancrée dans la membrane mitochondriale interne. Ce

dernier pool ne pourrait donc pas être converti en un pool soluble puisque les calpaines et les cathepsines sont inactivées par le z-VAD.

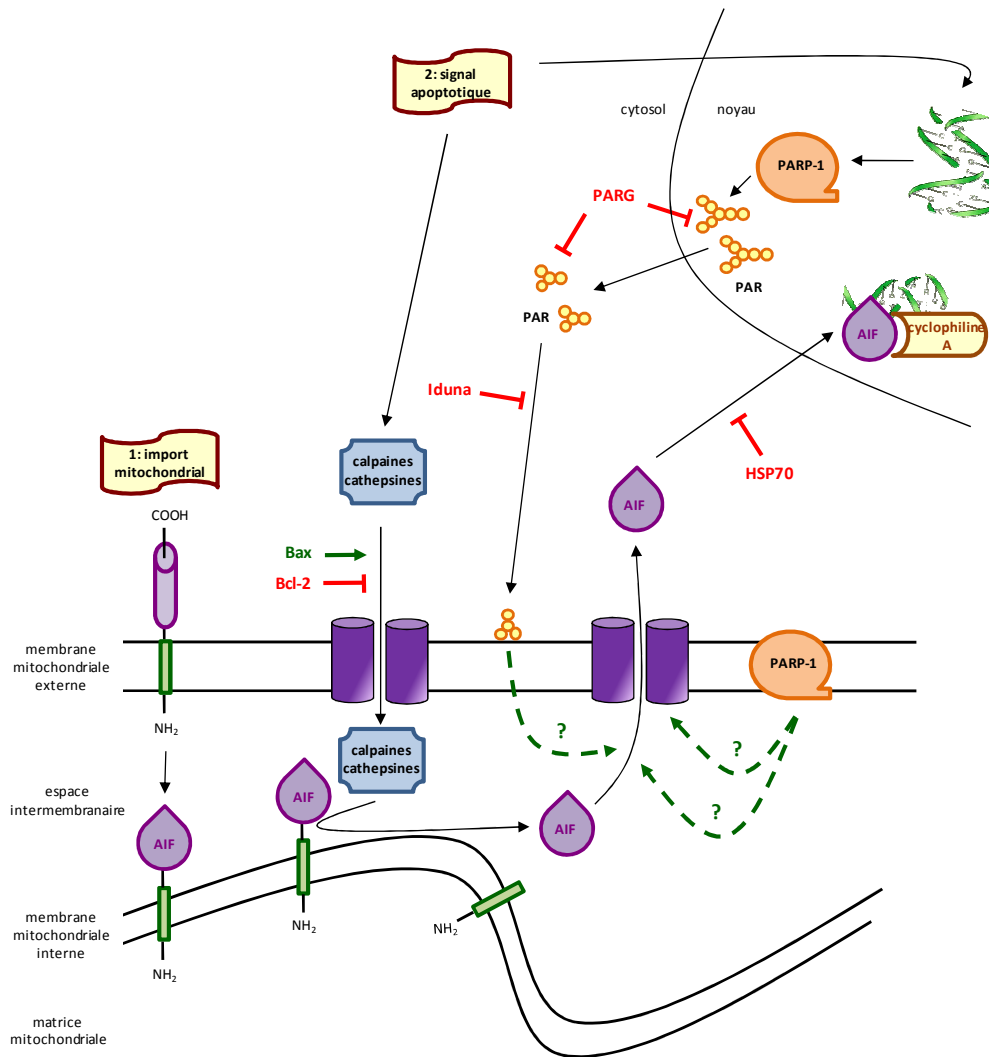


Figure 28 : Localisation sub-cellulaire et régulation de la libération de l'AIF (complété d'après Modjtahedi *et al.*, 2006)

✓ Translocation de l'AIF au noyau

Une fois dans le cytosol, l'AIF est transloquée au noyau grâce à 2 séquences de localisation nucléaire (Susin *et al.*, 1999b ; Ye *et al.*, 2002). A ce niveau, l'AIF interagit avec l'ADN et/ou l'ARN (Vahsen *et al.*, 2006) pour condenser la chromatine d'une manière indépendante des caspases et fragmenter l'ADN en fragments de haut poids moléculaire de 50 kpb (Susin *et al.*, 1999b ; Ye *et al.*, 2002). Des protéines AIF mutées au niveau de l'extrémité carboxy-terminale affectant la structure tertiaire de la protéine, telles que les protéines K510A et R584A, ne peuvent interagir avec l'ADN (Susin *et al.*, 1999b ; Ye *et al.*, 2002). Il semble donc que l'état de conformation de la protéine AIF permette sa liaison à l'ADN. La liaison de l'AIF à l'ADN nécessite aussi du magnésium (Mg^{2+}) et est stimulée par l'addition de $NADP^+$. L'AIF ne présente pas de propriété d'endonucléase (Susin *et al.*, 1999b ; Ye *et al.*, 2002). C'est pourquoi une fois dans le noyau, l'AIF recrute ou active une endonucléase pour faciliter la

condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Ye *et al.*, 2002 ; Krantic *et al.*, 2007) (Figure 28). L'interaction entre l'AIF et l'Endo G, DNase d'origine mitochondriale libérée aussi lors de l'apoptose indépendante des caspases, a été démontrée chez *C.elegans* (Wang *et al.*, 2002). Chez les Mammifères, cette interaction a été observée dans le cas de catastrophe mitotique indépendante des caspases (Niikura *et al.*, 2007). Diverses études ont montré que l'AIF formait avec la cyclophiline A le dégradosome, DNase active qui participe à la chromatinolyse (Cande *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 2007). D'autres endonucléases activées indépendamment des caspases telles que la L-DNase II (Samejima et Earnshaw, 2005) peuvent aussi coopérer avec l'AIF.

✓ Régulation de la libération et de la translocation nucléaire de l'AIF

Différentes protéines sont impliquées dans la régulation de la libération suivie de la translocation nucléaire de l'AIF (Ravagnan *et al.*, 2001) (Figure 28).

L'un des régulateurs clés est la protéine chaperonne HSP70 (Beere *et al.*, 2000 ; Ravagnan *et al.*, 2001 ; Daugaard *et al.*, 2007) qui lie l'AIF dans le cytosol, empêchant sa translocation au noyau *in vitro* (Ravagnan *et al.*, 2001) et *in vivo* (Matsumori *et al.*, 2005).

Les protéines de découplage mitochondrial (UCP : uncoupling proteins) ont un effet protecteur en réduisant les chutes du $\Delta\Psi_m$ (Maragos *et al.*, 2003), et par conséquent inhibe la libération de facteurs apoptogènes de la mitochondrie, notamment l'AIF.

Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL suppriment le clivage de la forme insérée de 62 kDa qui fournit la forme soluble de 57 kDa (Otera *et al.*, 2005).

✓ Libération de l'AIF par la voie médiée par PARP-1

Récemment a été mis en évidence un nouveau mécanisme responsable de la libération de l'AIF via l'activation de PARP-1 (Yu *et al.*, 2002) (Figure 28).

Principale isoforme de la famille PARP, la protéine PARP-1 aussi appelée poly(ADP-ribose)synthétase ou poly(ADP-ribose)transférase est une enzyme nucléaire présente chez les eucaryotes. Cette enzyme est activée suite à des dommages à l'ADN pour permettre leurs réparations. PARP-1 se lie à l'ADN lésé et forme des homodimères. PARP-1 catalyse alors le clivage de NAD^+ en nicotinamide et ADP-ribose. Ces derniers sont alors utilisés pour synthétiser des polymères de PAR (poly(ADP-ribose)) qui vont se fixer sur de nombreuses protéines nucléaires telles que les histones, les ADN polymérases, les topoisomérases, les facteurs de transcription (Shall et de Murcia, 2000 ; Smulson *et al.*, 2000) et PARP-1 elle-même (Oliver *et al.*, 1999). Les polymères de PAR sont rapidement dégradés par PARG (poly(ADP-ribose)glycohydrolase). Après avoir lié l'ADN endommagé, l'activité de PARP-1 est augmentée de 500 fois, ce qui entraîne une consommation énergétique excessive, caractérisée par une déplétion en NAD^+ et en ATP. Il en résulte une altération des enzymes impliquées dans la glycolyse, le shunt des pentoses phosphates et le cycle de Krebs. Si les dommages à l'ADN sont limités, ces derniers sont alors réparés (Shall et de Murcia, 2000 ; Haince *et al.*, 2005). Les cellules survivent et les niveaux cellulaires de NAD^+ sont restaurés en recyclant le nicotinamide avec deux molécules d'ATP. A l'inverse, si les dommages sont trop importants, la cellule ne peut pas réparer les lésions. La sur-activation de PARP-1 entraîne une déplétion trop importante des pools énergétiques NAD^+ et ATP, qui conduit à la mort de la cellule.

La protéine PARP-1 est aussi présente au niveau de la mitochondrie (Du *et al.*, 2003). La relation entre PARP-1 et la libération de l'AIF a été établie grâce à des inhibiteurs de PARP-1, à l'ablation

génétique de PARP-1, et à l'aide d'anticorps neutralisant l'AIF qui inhibent la mort cellulaire induite par des agents alkylants l'ADN (Yu *et al.*, 2002 ; Xu *et al.*, 2006 ; Moubarak *et al.*, 2007). Observée en absence de l'activation des caspases, cette voie médiée par PARP-1 induit la mort de la cellule suite à la libération de l'AIF de la mitochondrie au profit du cytosol suivie de sa translocation au noyau. En effet l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité de PARP-1 abolit la libération de l'AIF dans divers types cellulaires (Du *et al.*, 2003 ; Czapski *et al.*, 2006). A l'heure actuelle, 2 hypothèses semblent coexister pour expliquer le rôle de PARP-1 dans la libération de l'AIF (Figure 28) :

i) L'activation de l'enzyme PARP-1 résulte en une déplétion en NAD^+ (Alano *et al.*, 2004). Cette déplétion énergétique entraîne des changements structuraux de la mitochondrie, la dépolarisation de la membrane mitochondriale, la production d'ERO, la dégradation des cardiolipines et la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire. L'ensemble de ces événements favorisent l'ouverture et /ou la formation de pores membranaires (Hong *et al.*, 2004), suivie de la libération de l'AIF, libération qui précède celle du cyt *c* ainsi que l'activation des caspases (van Wijk et Hageman, 2005) ;

ii) La protéine PARP-1 contrôle la libération de l'AIF *via* son activité enzymatique. Dans le cytosol, PARP-1 permet la synthèse grâce au NAD^+ de polymères de PAR (Haince *et al.*, 2005) de grandes tailles et possédant des embranchements. Ces polymères sont rapidement dégradés dans le cytosol et le noyau par PARG. Les polymères de PAR sont donc de plus petite taille, libres et ils s'accumulent alors à la surface de la membrane des mitochondries. A ce niveau, les polymères de PAR induiraient la libération de l'AIF de la mitochondrie au profit du cytosol (Yu *et al.*, 2006b ; Heeres et Hergenrother, 2007). Ainsi la mort médiée par PARP-1 passerait par les polymères de PAR (Yu *et al.*, 2006b) qui constitueraient le véritable signal de mort (Andrabi *et al.*, 2006). Le mécanisme exact liant les polymères de PAR et la libération de l'AIF est inconnu. Deux hypothèses sont proposées : a) la dépolarisation de la membrane mitochondriale est due à la nature très chargée des polymères de PAR ou b) les polymères de PAR se lient *via* une protéine de la membrane mitochondriale, ce qui permet *in fine* la libération de l'AIF (Yu *et al.*, 2006b). La protéine Iduna, nouvellement caractérisée par l'équipe de Dawson, qui lie et neutralise les polymères de PAR dans le cytosol, semble être un régulateur clé de cette voie apoptotique médiée par PARP-1 (Golstein et Kroemer, 2007b), voie nommée parthanatose et caractérisée par la condensation du noyau en très petite taille (Yu *et al.*, 2006b).

3. Les chimiothérapies

3.1. Généralités sur le cancer

Le mot cancer vient du grec « *karkinos* » (dont dérivent carcinome, carcinologie, carcinogénèse) qui signifie crabe. Hippocrate, célèbre médecin généraliste de banlieue dans la Grèce des années 400 avant J-C avait comparé à un crabe et à ses pinces la tumeur cancéreuse et ses ramifications s'agrippant au tissu sain. Le cancer n'est pas une maladie nouvelle : des cancers du nasopharynx diagnostiqués sur des momies égyptiennes datant de plus de 2 000 ans avant J-C se sont avérés identiques aux cancers du nasopharynx observés actuellement en Afrique. Face à l'augmentation de l'espérance de vie, le cancer est considéré comme la maladie du siècle car sa fréquence croît avec l'âge. Aujourd'hui, les cancers représentent, en France, la première cause de mortalité chez l'homme et la seconde chez la femme, après les affections cardiovasculaires : un homme sur trois et une femme sur cinq meurent d'un cancer, soit 140 000 décès par an.

La plupart des cancers ont une origine sporadique c'est-à-dire qu'ils surviennent au hasard (99% des cas de cancers). Cependant, exposés à un environnement similaire, tous les individus ne courent pas le même risque. Cette différence interindividuelle est liée à la variation génétique : i) les gènes de prédisposition majeure sont responsables des formes familiales de cancers (environ 1% des cas de cancers) et augmentent fortement la probabilité d'apparition d'un cancer. Deux types de mécanismes sont alors observés : le plus souvent, il s'agit d'inhibitions germinales c'est-à-dire mono-alléliques d'un gène suppresseur de tumeur tels que *pRB* dans le rétinoblastome ou *BRCA* (breast cancer) dans le cancer familial du sein. Plus rarement, il s'agit de mutations germinales activatrices d'un oncogène : par exemple, la mutation du proto-oncogène *c-ret* à l'origine des formes familiales de cancers médullaires de la thyroïde et des néoplasies endocrines multiples de type 2A et 2B. Suite à une translocation chromosomique induite par des génotoxiques, ce gène est aussi impliqué dans certains cancers papillaires de la thyroïde. ii) Les gènes de prédisposition mineure augmentent faiblement mais significativement la probabilité d'apparition d'un cancer. Ce sont surtout des gènes impliqués dans l'activation ou la détoxification de génotoxiques ou dans le métabolisme hormonal (œstrogènes, androgènes, vitamine D...).

Au plan mondial, le cancer du col de l'utérus est le cancer le plus fréquent après celui du sein avec 230 000 décès et 470 000 nouveaux cas par an (Bosch *et al.*, 1995). Il représente 10% des cancers féminins (Ferlay *et al.*, 2001) et sa fréquence augmente avec l'âge, de 20 à 50 ans, pour se stabiliser par la suite. Les taux d'incidence de ce cancer varient de façon très importante à travers le monde : son incidence diminue dans les pays industrialisés notamment en Amérique du Nord, en Australie, au Moyen Orient et dans certains pays européens tels que l'Espagne, l'Italie et l'Angleterre mais demeure préoccupante dans les pays les plus pauvres tels qu'en Amérique Centrale, dans le sud de l'Afrique, en Amérique du Sud (sauf l'Argentine) et en Inde (Ferlay *et al.*, 2001). L'induction d'environ 20% des cancers humains, est liée, de façon directe ou non, à des agents infectieux à potentiel oncogénique. Parmi ces agents infectieux, les papillomavirus humains (HPV : human papillomavirus) à haut risque alpha sont les agents étiologiques du cancer du col de l'utérus (zur Hausen, 1999 ; Mougin *et al.*, 2003). En effet ils sont responsables de plus de 99,7% des cancers du col de l'utérus (Walboomers *et al.*, 1999 ; Munoz, 2000). Ces virus appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*

dont plus de 100 types différents ont été identifiés (Munoz *et al.*, 2004). Ces virus sont classés selon leur potentiel à transformer des cellules normales en cellules atypiques conduisant au développement de lésions cervicales intra-épithéliales (CIN) puis de cancers du col de l'utérus (Kjaer *et al.*, 1996 ; Brown *et al.*, 1999). Parmi les HPV retrouvés dans la muqueuse génitale, une quinzaine a été classée à haut risque oncogénique, tels que les HPV 16 et 18 qui sont responsables de plus de 70% des cancers invasifs du col de l'utérus (Clifford *et al.*, 2003). L'infection par un HPV haut risque est nécessaire mais pas suffisante pour induire des lésions (pré-)cancéreuses du col de l'utérus. En effet, seules les infections persistantes par un même type d'HPV haut risque constituent un facteur de risque de développement d'un cancer. La persistance de l'infection est influencée par plusieurs facteurs liés à l'hôte (mise en place de réponses immunitaires au niveau génital), à l'environnement et au virus (génotype, charge virale, intégration virale). L'acquisition du phénotype malin par la cellule épithéliale infectée est liée à l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte suite à sa linéarisation qui s'effectue le plus souvent dans le gène *E2*. Dès lors, la protéine *E2*, dont la fonction est d'inhiber l'expression des deux oncoprotéines virales *E6* et *E7*, n'est plus fonctionnelle. Il en résulte la surexpression de ces deux oncoprotéines virales fortement impliquées dans l'immortalisation et la transformation tumorale de la cellule. En effet, les effets combinés de ces deux oncoprotéines entraînent entre autre la dégradation de *p53* et *pRb* *via* le protéasome, abrogeant des points de contrôle du cycle cellulaire et inhibant l'apoptose.

La chimiothérapie des cancers a connu une forte progression au cours de la seconde moitié du XX^e siècle mais depuis quelques années, de nouvelles molécules visent à atteindre les mécanismes même de l'oncogenèse au lieu de se contenter d'inhiber la prolifération cellulaire. Face au nombre croissant de cancers, des moyens importants sont accordés à la recherche d'une meilleure compréhension des mécanismes de la carcinogenèse et à la mise au point de nouvelles modalités thérapeutiques permettant *in fine* d'améliorer les courbes de survie.

3.2. Généralités sur la chimiothérapie

Avec la chirurgie et la radiothérapie, la chimiothérapie reste l'une des armes thérapeutiques prépondérantes contre le cancer.

Tant que le cancer reste une maladie localisée, la chirurgie, souvent associée à la radiothérapie, reste la principale arme anti-cancéreuse capable de conduire à la guérison du patient. La chimiothérapie trouve sa place lors de la dissémination de la maladie cancéreuse ou pour la prévenir. En effet, en termes de durée et de qualité de vie, la chimiothérapie peut apporter des résultats non négligeables. Dans ce contexte, on distingue (Roberr et Hoerni, 2001) : i) les cancers chimiocurables c'est-à-dire guérissables par chimiothérapie seule sont peu nombreux et comptent les leucémies aigües, certains lymphomes et les cancers embryonnaires de l'enfant et de l'adulte ; ii) les cancers chimiosensibles pour lesquels la chimiothérapie permet une rémission partielle voire complète notamment dans le cas de cancers du sein, de l'ovaire, du côlon et récemment du poumon ; iii) les cancers chimiorésistants c'est-à-dire très peu sensibles à la chimiothérapie tels que les cancers du rein et du pancréas ainsi que les mélanomes malins. La chimiothérapie a une place prépondérante dans des cas métastatiques où elle sera palliative car incapable de guérir. Néanmoins, les progrès réalisés au cours de ces dernières années permettent l'utilisation de la chimiothérapie en situation adjuvante pour

éradiquer, de façon « aveugle », la présence de cellules métastatiques indétectables au moment du traitement locorégional à visée curative dans le cas de cancers du sein, de côlon ou du poumon. En condition néo-adjuvante, c'est-à-dire précédant l'acte médical, la chimiothérapie peut faciliter l'efficacité de la chirurgie dans certains cas de cancers du sein inflammatoires, des voies aérodigestives supérieures, du rectum (Robert, 2006).

La première activité anticancéreuse d'une molécule chimique a été mise en évidence au cours de la seconde guerre mondiale. L'exposition à du gaz moutarde (sulfure de bis 2-chloroéthyle), agent alkylant, a entraîné des syndromes aplasiques. Le premier cas de courte rémission après traitement par un agent anticancéreux a été obtenu chez un patient atteint de lymphome (Gilman, 1963). Depuis de nouvelles molécules dotées d'un pouvoir antitumoral ont été découvertes de manière fortuite, telles que le cisplatine dans les années 1970 ou à l'issue d'un criblage systématique (*in vitro* et *in vivo*) de substances naturelles ou synthétiques telles que la staurosporine. Une substance antitumorale, anticancéreuse ou antinéoplasique se définit comme une substance cytotoxique qui détruit de façon sélective les cellules transformées. Certains de ces agents anticancéreux se trouvent sous forme d'une proforme qui, une fois métabolisée dans la cellule, va conduire à la formation d'intermédiaires capables d'interagir avec leur cible. La classification des différents agents anticancéreux est basée sur leur mécanisme d'action. Les agents anticancéreux peuvent être considérés comme des agents antimitotiques dans la mesure où quelque soit leur cible, ils conduisent dans la majorité des cas à un blocage de la division cellulaire.

3.3. Les chimiothérapeutiques classiques

A l'heure actuelle, une cinquantaine de médicaments sont utilisés dans le cadre de la chimiothérapie classique à visée antiproliférative globale. Ces médicaments agissent en dernier ressort sur la multiplication cellulaire et sont classés en 4 classes mécanistiques (Robert, 2005) :

3.3.1 Les agents formants des adduits covalents avec l'ADN

L'ADN est la cible privilégiée des **agents alkylants classiques**, famille d'agents anticancéreux possédant deux groupements chloroéthyle et qui forment des intermédiaires réactionnels déficients en électrons. Ces intermédiaires établissent des liaisons covalentes fortes avec des groupements riches en électrons, les groupes nucléophiles (groupe hydroxyles, sulfoxydes, amines ou phosphates) contenus dans l'ADN ou les protéines. Cette liaison avec un composé électrophile inhibe la transcription et la réplication de l'ADN, les lésions cellulaires sont donc létales. Ces agents libèrent aussi des radicaux libres entraînant des cassures de la chaîne d'ADN et ont un pouvoir leucémogène. Parmi ces agents on distingue le cyclophosphamide, le chlormétine, l'ifosfamide, et le melphalan. Certains comme le cyclophosphamide ne sont pas actifs eux-mêmes, mais par le produit de leur oxydation microsomiale dans le foie sous forme de 4-hydroxy-cyclophosphamide en déséquilibre avec son tautomère sans anneau, l'aldophosphamide. Le 4-hydroxy-cyclophosphamide est peu polaire et pénètre facilement dans la cellule, à la différence de l'aldophosphamide, dégradé et excrété par les urines. L'ensemble de ces agents est regroupé sous le terme de moutardes azotées.

Les **nitrosourées** (carmustine®, lomustine®) nécessitent quant à elles d'être catabolisées pour être actives et leurs catabolites se comportent comme des agents alkylants. Ces agents passent la barrière hémato-méningée. Les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN qu'ils induisent font intervenir l'enzyme de réparation, O6-alkylguanine-DNA transférase. Leur toxicité est hématologique retardée et cumulative.

Les agents alkylants sans groupement chloroéthyle sont aussi appelés les **tétrazines**. La dacarbazine, dont la toxicité est digestive et hépatique, est utilisée pour traiter la maladie de Hodgkin, les sarcomes des tissus mous et le mélanome. La procarbazine (natulan®) inhibe la polymérisation de l'ADN et est aussi utilisée dans la maladie de Hodgkin, malgré sa toxicité digestive et hématologique.

Les **sels de platine** ont été découverts en 1965 grâce à leur capacité d'inhiber la croissance des bactéries d'*Escherichia coli* au contact d'électrodes de platine, sous forme de complexes comprenant des ions ammonium et chlore (Rosenberg *et al.*, 1965). Le cisplatine (CIS : dichlorodiamino platinum), responsable de cette inhibition de croissance, s'est avéré avoir aussi une activité anti-tumorale à l'encontre de différentes tumeurs chez la souris (Rosenberg *et al.*, 1969). Le cisplatine fut testé en clinique dès 1970. Son importante activité antitumorale et la possibilité de prévenir sa toxicité rénale en ont fait un des agents anticancéreux les plus utilisés en thérapie des cancers. Il est actif contre les cancers du testicule et de l'ovaire, de la vessie, du col de l'utérus, du cou, de la tête et des poumons (Hill et Speer, 1982).

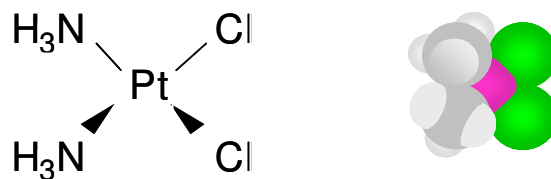


Figure 29 : Le cisplatine

Molécule plane ($\text{cis}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$) (Figure 29) composée d'un atome de platine, de deux atomes de chlore en position *cis* et de deux amines, le cisplatine est un agent alkylant bifonctionnel, capable de s'hydrolyser dans la cellule et de former des complexes actifs. Après diffusion passive dans les cellules, où la concentration en chlore est faible (4mM), les atomes de chlore sont remplacés par des groupes hydroxyles, l'équilibre se déplaçant alors vers les dérivés aqueux, plus réactifs que le cisplatine natif (Figure 30) (Zheng *et al.*, 1997).

Ces complexes très réactifs chargés positivement vont former des liaisons covalentes avec les groupements nucléophiles des macromolécules (ADN, ARN, groupements thiols des protéines) : ce sont des adduits (Rosenberg *et al.*, 1967). Dans un premier temps, des adduits monofonctionnels entre le platine et les guanines/adénines de l'ADN se forment. Dans un second temps apparaissent des ponts intrabins (ponts entre des bases d'un même brin de l'hélice) et des ponts interbins (ponts entre des bases de deux brins de l'hélice) (Fichtinger-Schepman *et al.*, 1985 ; Eastman, 1986).

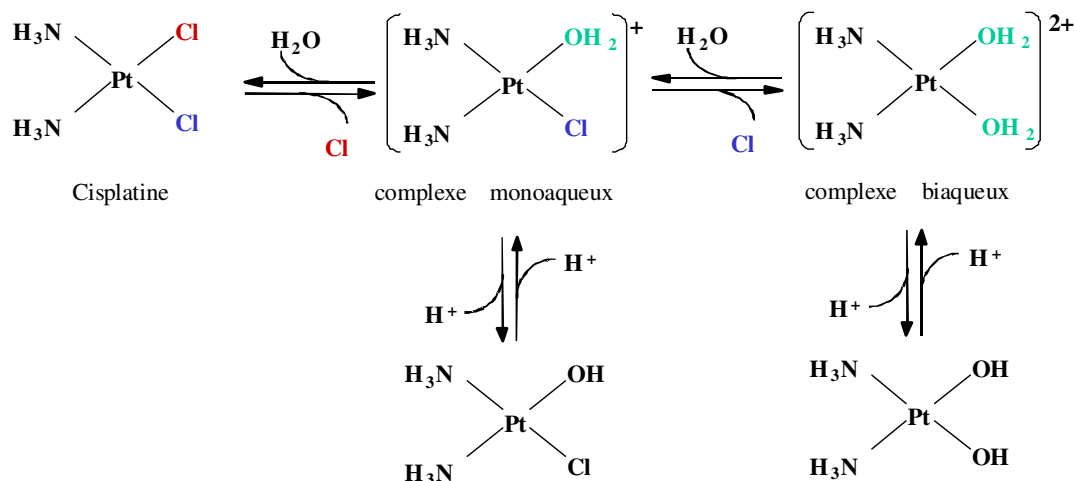


Figure 30 : Activation du cisplatine en milieu aqueux

Le cisplatine peut aussi se lier à l'ADN mitochondrial, interagir avec les phospholipides et phosphatidylsérines de la membrane plasmique, perturber le cytosquelette et la polymérisation de l'actine (Jamieson et Lippard, 1999). De même, le cisplatine se lie rapidement aux protéines plasmatiques telles que l'albumine, la transferrine et la gamma-globuline (Gullo *et al.*, 1980). Toutefois, l'implication des adduits cisplatine/protéine dans la cytotoxicité du cisplatine n'a pas été démontrée.

Ainsi, l'activité anti-tumorale du cisplatine est principalement due à sa liaison à l'ADN (Gonzalez *et al.*, 2001). Celle-ci n'est pas toujours suffisante pour induire la mort de la cellule cible (Salles *et al.*, 1983). La cytotoxicité du cisplatine est accrue (10 fois) lorsque les cellules sont traitées en fin de phase G_1 , juste avant l'étape de répllication (Fraval et Roberts, 1979 ; Dornish *et al.*, 1987).

D'autres dérivés de sel de platine sont utilisés tels que le carboplatine (paraplatine®) dans le cas de cancers de l'ovaire mais il est myélotoxique et faiblement neuro- et néphro-toxique et l'oxiplatine (eloxatine®) dans le cancer du colon qui est faiblement émétisant et hématotoxique mais très neurotoxique.

3.3.2 Les antimétabolites

Les antimétabolites sont des pièges enzymatiques : ils bloquent l'activité enzymatique et donc inhibent la synthèse des constituants de l'ADN. Ces agents sont des analogues structuraux ou des faux substrats qui présentent de fortes analogies de structure avec des métabolites naturels de la cellule (analogues des purines tel que la fludarabine, des pyrimidines tel que le 5-fluorouracile ou de l'acide folique tel que le methotrexate). Une compétition inhibitrice entre métabolites naturels et antimétabolites bloque la multiplication cellulaire.

Entre les années 1950 et 1970, le 5-fluorouracile (5-FU) a été la seule drogue a montré une efficacité relative dans les cancers du côlon et du rectum, efficacité fonction de la dose et du mode d'administration (Bruckner et Motwani, 1991). C'est un analogue de structure des pyrimidines où un radical fluoré est inséré à la place d'un radical hydrogène en position 5. Le 5-FU est activé par

différentes enzymes de la voie métabolique. Après sa pénétration dans la cellule, il se lie aux sucres ribose ou déoxyribose pour former un pseudo nucléotide phosphorylé, sous forme de 5-FdUMP ou 5-FUTP. La forme 5-FdUMP est essentielle à l'activité du 5-FU car elle entre en compétition avec le dUMP, substrat naturel de la thymidine synthétase (voie de synthèse de la thymidine). En présence de méthylène tétrahydrofolate (mTHF), un complexe tertiaire se forme par liaisons covalentes ce qui inhibe totalement la thymidilate synthétase et donc la synthèse de thymidine monophosphate. Il y a alors une déplétion complète de thymidine monophosphate indispensable à la synthèse de l'ADN. Le 5-FU est donc principalement actif au cours de la phase S du cycle cellulaire. Les autres modes d'action du 5-FU, plus accessoires, sont l'incorporation dans l'ARNm *via* le 5-FdUTP et une inhibition fonctionnelle des glycosyltransférases qui reconnaissent les nucléotides formés à partir du 5-FU (Pinedo et Peters, 1988). Utilisé en monothérapie, le 5-FU a été considéré comme un traitement de référence des cancers colorectaux, mais actuellement, il est souvent associé à d'autres agents anticancéreux tels que l'irinotécan, l'oxaliplatine et le raxelitrexed afin d'accroître son efficacité thérapeutique. Il est aussi associé à l'acide folinique afin de stabiliser le complexe ternaire formé par le FdUMP, la thymidilate synthétase et le méthylène tétrahydrofolate (Bleiberg et Hendlisz, 2002).

3.3.3 Les poisons du fuseau mitotique

Ce terme regroupe les agents anticancéreux extraits de plantes qui en se fixant à la tubuline vont bloquer la cellule en mitose (blocage du fuseau chromatique assurant la séparation des chromosomes) et perturber le maintien du cytosquelette. Les **alcaloïdes de la Pervenche** (alcaloïdes purs tels que vincristine et vinblastine ou semi-synthétiques tels que vindesine et vinorelbine) sont considérés comme des agents antimitotiques vrais inhibant la polymérisation des dimères de tubuline indispensable à la formation et à la croissance des microtubules. Malgré leur toxicité hématologique (vinorelbine), muqueuse et surtout neurologique, ces agents sont utilisés dans le traitement de tumeurs hématologiques lymphoïdes, les tumeurs pédiatriques ainsi que les cancers du sein et broncho-pulmonaire. Les **taxanes** (dérivés de l'if) ont une action inverse dans la mesure où ils bloquent la dépolymérisation des microtubules nécessaire lors de l'anaphase, les cellules sont alors bloquées en métaphase. Parmi les taxanes, le paclitaxel (taxol®) est utilisé dans le traitement des tumeurs de l'ovaire, du poumon et du sein et le doxetaxel (taxotère®) est préconisé dans les cas de tumeurs mammaires, pulmonaires, de la sphère ORL et de la prostate.

3.3.4 Les inhibiteurs des topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes assurant la spiralisation/déspiralisation de l'ADN indispensable lors de la réplication en créant des coupures transitoires de l'un (topoisomérase I) ou des deux (topoisomérase II) brins.

Les inhibiteurs des topoisomérases II empêchent la séparation de la topoisomérase II et de l'ADN et créent des complexes de clivage caractéristiques. Le cycle cellulaire est arrêté en phase G₂. Les cellules en G₀ possèdent très peu de topoisomérase II, elles sont donc peu sensibles à ces agents. Les deux principaux agents hémisynthétiques de cette famille dérivent de la podophylotoxine et sont l'étoposide (VP-16) utilisé en traitement des lymphomes, des tumeurs germinales, bronchiques et le ténoposide (VM-26) utilisé pour traiter des lymphomes.

Les inhibiteurs des topoisomérases I provoquent aussi une coupure définitive de l'ADN mais un seul brin est affecté. Le cycle cellulaire est aussi arrêté en phase G₂. Les cellules tumorales possèdent davantage de topoisomérases I que les cellules saines. Parmi ces agents, le topotecan est myélotoxique mais est utilisé dans le traitement du cancer de l'ovaire alors que l'irinotecan est administré dans le cas de cancers digestifs, malgré une toxicité digestive immédiate ou différée et une toxicité hématologique modérée.

3.4. Les nouvelles chimiothérapies : thérapeutiques ciblées

Le manque de spécificité et l'efficacité parfois limitée de la chimiothérapie classique ont amené au développement de nouvelles stratégies plus prometteuses : les thérapeutiques ciblées, c'est-à-dire dirigées contre les anomalies moléculaires présentes et supposées jouer un rôle dans la transformation néoplasique et le maintien du phénotype transformé. Ainsi, ces nouvelles thérapeutiques ciblent les protéines impliquées dans le contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire et non celles impliquées dans l'exécution de ces programmes. C'est donc la cause de l'anomalie à l'origine du cancer et non plus l'effet qui en résulte qui est traitée. Les thérapeutiques ciblées sont particulièrement efficaces lorsque l'anomalie ciblée est déterminante pour l'oncogenèse telle que la translocation bcr/abl dans la leucémie myéloïde chronique (LMC). A l'inverse dans les cancers épithéliaux où les anomalies moléculaires s'accumulent, les thérapeutiques ciblant une seule anomalie pourront n'avoir qu'un effet transitoire, souvent très utile mais non décisif, telle que le **trastuzumab** dans le traitement des cancers du sein (Médicament, 2008).

L'efficacité des thérapeutiques ciblées est directement liée à la présence de la cible active dans la tumeur à traiter. Dans ce contexte, une sélection des patients doit être effectuée et ce, sur des critères non plus histologiques comme pour les thérapeutiques classiques mais sur des critères moléculaires.

3.4.1 Les voies de signalisation liées aux facteurs de croissance

La compréhension de la biologie des cancers a permis de caractériser les mécanismes fondamentaux impliqués dans l'oncogenèse (Hanahan et Weinberg, 2000) dont les principaux sont : i) les voies de signalisation liées aux facteurs de croissance, ii) la perte du contrôle du cycle cellulaire et iii) la dérégulation de l'apoptose. De plus, l'altération des capacités de réparation de l'ADN est responsable de l'instabilité génétique. Dans tous les cas, des altérations génétiques de type « gain de fonction » (oncogènes) ou « perte de fonction » (gènes suppresseurs de tumeurs) peuvent être observées.

3.4.1.1. *Présentation des voies*

Les facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor) sont impliqués dans le développement et le fonctionnement de nombreux tissus, tels que la peau, la glande mammaire et le système nerveux. Ces facteurs se fixent sur des récepteurs membranaires ubiquitaires spécifiques à activité tyrosine kinase appelés ErbB (d'après leur analogie avec un oncogène du virus de l'érythroblastose aviaire) ou HER (Human EGF Receptor related). Suite à la fixation du ligand, le récepteur ne se dimérise plus, puis s'autophosphoryle sur des résidus tyrosine. Cette

autophosphorylation est nécessaire au recrutement et à l'activation d'une grande variété de protéines de signalisation impliquées dans des voies de transduction du signal telles que la voie des MAP kinases et celle de la PI3K.

Les **MAP kinases** sont des protéines kinases activées en cascade. Une fois le ligand fixé, les résidus tyrosine du récepteur sont phosphorylés, ce qui permet l'ancrage de la protéine Grb2. Cette dernière recrute alors la protéine Sos, facteur d'échange qui favorise le passage de la forme Ras-GDP inactive à la forme Ras-GTP active. La protéine Ras (Rat sarcoma), membre de la famille des petites protéines G, permet l'activation de la sérine thréonine kinase Raf, laquelle phosphoryle et active MEK/MAPKK, qui phosphoryle et active ERK/MAPK. Cette dernière phosphoryle et active à son tour des facteurs de transcription notamment c-jun et c-fos, impliqués dans la mitose et c-Myc, impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire.

Une fois recrutée et activée, la protéine **PI3K** phosphoryle quant à elle en position 3 le PIP2, phosphatidylinositol biphosphate membranaire, en PIP3, ce qui favorise la translocation à la membrane plasmique des protéines PDK, notamment PDK-1. Cette dernière active alors par phosphorylation PKB/Akt. PKB/Akt phosphoryle en retour ainsi de nombreux substrats parmi lesquels la protéine pro-apoptotique Bad. Bad est alors séquestré dans le cytoplasme par la molécule chaperonne 14-3-3 σ , ce qui l'empêche d'exercer son activité pro-apoptotique. La protéine PKB/Akt phosphoryle aussi i) des protéines qui activent les complexes CDK/cyclines et ii) la protéine mTOR impliquée dans le métabolisme cellulaire, l'induction de l'apoptose et la traduction des ARN messagers.

Ces deux voies de signalisation induisent l'activation de nombreux facteurs de transcription et la transcription de protéines impliquées dans la prolifération, la différenciation, la migration, la survie cellulaire et l'angiogénèse.

3.4.1.2. Ciblage des facteurs de croissance

L'angiogénèse est un processus capital pour la croissance tumorale au-delà de quelques mm³ car il permet la diffusion des nutriments et de l'oxygène aux cellules. La cellule endothéliale génératrice de néovaisseaux doit être stimulée pour proliférer. Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est un facteur de croissance produit par les cellules tumorales et/ou stromales en hypoxie et il induit la prolifération et l'organisation des cellules endothéliales. Les approches anti-angiogéniques font l'objet d'une grande attention dans plusieurs cancers (Bikfalvi, 2007). Le ciblage direct du VEGF peut se faire par des anticorps (bevacizumab) ou des facteurs solubles capables de le piéger (VEGF-trap). Le principal composé anti-angiogénique actuellement utilisé en clinique dans le traitement du cancer métastatique du colon et du rectum est le bevacizumab (avastin®), anticorps monoclonal humanisé qui cible le VEGF et qui reconnaît toutes ses isoformes. Lorsque le bevacizumab se lie au VEGF, ce dernier ne peut plus se fixer à ses récepteurs, empêchant ainsi la prolifération des cellules endothéliales et donc la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au profit de la tumeur (Duda *et al.*, 2007b). N'étant pas suffisamment vascularisée, la tumeur arrête de se développer et peut être éliminée par le système immunitaire. Le bevacizumab n'a donc aucun effet sur les cellules cancéreuses elles-mêmes mais sur la prolifération des cellulaires vasculaires endothéliales.

3.4.1.3. Ciblage des récepteurs

Les récepteurs des signaux de prolifération constituent la première cible thérapeutique pertinente identifiée. En effet, les récepteurs HER sont activés lors de divers processus tels que la division cellulaire, la survie, l'angiogenèse, la motilité et l'adhérence cellulaires (Holbro *et al.*, 2003). Une altération du signal au niveau de ces récepteurs peut contribuer à la transformation maligne (Yarden et Sliwkowski, 2001). Ainsi, les récepteurs HER sont impliqués dans l'oncogenèse de nombreux cancers (Hubert, 2007) : ils sont surexprimés dans de nombreuses tumeurs solides humaines (Zhang *et al.*, 2007) et cette surexpression est souvent de mauvais pronostic. Le ciblage de ces récepteurs peut se faire par des anticorps ou par des petites molécules inhibitrices de l'activité catalytique des récepteurs (Fergelot *et al.*, 2005 ; Duda *et al.*, 2007a).

Principal récepteur de la famille HER, l'EGFR peut être inhibé par l'anticorps chimérique Cetuximab (Erbixim®). Quant au récepteur ErbB2, surexprimé dans près de 25% des cancer du sein (Demonty *et al.*, 2007). Cette surexpression est liée à une amplification génique d'*erbB2*. L'anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le domaine extracellulaire d'ErbB2, le trastuzumab (Herceptin®), a été le premier traitement anticancéreux ciblant un oncogène approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en 1998 pour le traitement de cancers du sein métastasés et ErbB2-positifs (marquage membranaire fort dans plus de 10% à 30% des cellules tumorales par technique immunohistochimique ou surexpression liée à l'amplification du gène *HER2*) (Carlson *et al.*, 2006 ; Wolff *et al.*, 2007). Ce traitement est inefficace chez les patientes atteintes de cancers du sein ErbB2-négatifs et peut aussi l'être chez certaines patientes avec des tumeurs ErbB2-positives. Le pertuzumab est un autre anticorps qui se lie à la partie extra-cellulaire de ErbB2 au niveau d'un épitope différent du trastuzumab, même en l'absence de surexpression massive de ce dernier, ce qui empêche sa dimérisation et bloque la signalisation subséquente (Franklin *et al.*, 2004). Il pourrait être plus actif que le trastuzumab chez les patientes où l'expression de ErbB2 est faible.

Une autre stratégie thérapeutique consiste à bloquer l'activité tyrosine kinase de ces récepteurs. En effet, lorsque ces récepteurs sont surexprimés ou mutés, les cascades de phosphorylation favorisent l'amplification du signal. Dans ce contexte, des molécules inhibitrices des tyrosines kinases ont été développées. La première molécule identifiée est l'imitanib (Gleevec® ou Glivec®), inhibiteur de la protéine constitutive BCR-ABL (Mauro *et al.*, 2002). Cette protéine est liée à une translocation réciproque des chromosomes 9 et 22. Les fragments échangés permettent la réunion de 2 segments des gènes *bcr* et *abl*. Les gènes traduits ensemble sont à l'origine d'une protéine de fusion chimère qui phosphoryle des protéines membranaires telles que les PLC, ce qui stimule la prolifération des cellules souches, terrain favorable au développement d'une LMC. L'imitanib inhibe aussi c-Kit (récepteur au facteur de croissance des cellules souches), tyrosine kinase impliquée dans les tumeurs stromales, gastro-intestinales et les leucémies myélomonocytaires chroniques. L'activité catalytique d'EGFR est quant à elle inhibée de façon réversible par le gefitinib (Iressa®) (Baselga et Hammond, 2002). Il a été utilisé avec un certain succès dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules avant de perdre l'autorisation temporaire d'utilisation en raison d'hémorragies digestives, de troubles pulmonaires et d'une efficacité a priori limitée. Il a été remplacé par l'erlotinib (Tarceva®), un autre inhibiteur de l'activité catalytique d'EGFR plus efficace. Cette molécule induit l'arrêt du cycle cellulaire en G1 en accumulant la protéine p27, inhibitrice de cycline, et favorise l'entrée des cellules tumorales en apoptose (Ciardiello et Tortora, 2001). Il est à noter que les inhibiteurs de l'activité catalytique d'EGFR sont efficaces sur des tumeurs pulmonaires présentant une mutation oncogénique au niveau du site catalytique du récepteur, mutation apparaissant sur un fond

génétiq ue particulier (Italiano *et al.*, 2007). Le lapitinib (Tyverb®) inhibe de façon réversible l'activité tyrosine kinase de ErbB1 et ErbB2. En agissant sur les 2 récepteurs, il serait potentiellement plus efficace qu'une molécule agissant au niveau d'un seul récepteur. Il est actuellement utilisé dans le traitement des patientes atteintes de cancer du sein ErbB2-positifs.

3.4.2 La perte du contrôle du cycle cellulaire

L'évolution du cycle cellulaire est contrôlée par divers complexes cycline/CDK propres à chaque phase du cycle. Ces complexes sont inhibés par les protéines p16 et p21. Les CDK sont elles-mêmes régulées par phosphorylation/déphosphorylation, notamment *via* les phosphatases activatrices CDC25.

Dans les cellules cancéreuses, de nombreuses altérations du système de contrôle du cycle cellulaire ont été observées, notamment la surexpression ou l'amplification des cyclines, CDK ou CDC25, ainsi que des mutations invalidantes ou des délétions de p16 et p21 (Meijer, 2006). Les nouvelles thérapies tentent de cibler pharmacologiquement ces altérations. Par exemple, suite à des dommages de l'ADN, les protéines senseurs ATR et ATM activent respectivement les kinases Chk1 et Chk2, qui à leur tour inhibent CDC25, ce qui résulte en l'arrêt du cycle cellulaire afin de réparer l'ADN lésé. Dans ce contexte, le ciblage de Chk1 et Chk2 peut être envisagé pour sensibiliser à la chimiothérapie les cellules cancéreuses quiescentes en les forçant à entrer en cycle (Blasina *et al.*, 2008). La staurosporine et son analogue UCN-01 sont elles aussi des inhibiteurs potentiels de Chk1 (Jackson *et al.*, 2000).

3.4.3 La dérégulation de l'apoptose

Dans les cellules cancéreuses, les altérations des mécanismes de l'apoptose sont nombreuses. La surexpression de Bcl-2 est certainement l'altération la plus connue. L'utilisation d'anti-sens anti-Bcl-2 ou d'antagonistes anti-Bcl-2 tels que ABT-737 (Kutuk et Letai, 2008 ; Labi *et al.*, 2008) constitue des approches intéressantes pour restaurer l'apoptose. Dans certains cas, une diminution de l'expression des récepteurs Fas, des protéines de la famille Bcl-2, d'Apaf-1 ou des caspases peut aussi être observée dans des cellules tumorales (Robert, 2007). Ces altérations diverses et variées font du ciblage de l'apoptose une voie importante de recherche pharmacologique. Dans ce contexte, l'inhibition des IAPs telles que la survivine est un axe de développement de thérapie ciblée très important (Robert, 2007).

3.4.4 Cas particulier : p53

De part ses rôles transcriptionnel et apoptotique, la protéine p53 est un acteur clé des processus de sauvegarde des cellules. De plus, p53 joue aussi un rôle crucial dans l'oncogenèse. En effet, p53 est mutée dans plus de 60% des cancers (Olivier *et al.*, 2002) ([http://www.p53.iarc/fr](http://www.p53.iarc.fr)). Le gène *TP53* et la protéine p53 apparaissent donc comme des cibles privilégiées pour des approches de thérapie génique (transfert du gène TP53 sauvage par l'utilisation d'adénovirus, approche non détaillée dans

ce travail) ou pour une intervention pharmacologique à visée thérapeutique (Bouchet *et al.*, 2006). Cette dernière est fonction du statut de p53, à savoir sauvage ou mutée.

3.4.4.1. p53 sauvage

Dans les cellules normales, l'expression de p53 est maintenue à un taux faible *via* un renouvellement rapide médié par l'ubiquitine ligase MDM2, principal régulateur négatif de p53 (Yang *et al.*, 2004). En effet, transcriptionnellement activée par p53, la protéine MDM2 est une E3-ligase capable de se fixer à p53. Il s'en suit l'ubiquitinylation de p53 au niveau de son extrémité carboxy-terminale (Haupt *et al.*, 1997) puis sa dégradation *via* le protéasome. De plus, MDM2 lie le domaine amino-terminal de p53 et inhibe son activité transcriptionnelle. Par ailleurs, MDM2 contient un domaine de localisation nucléaire ainsi qu'un domaine d'exportation nucléaire, favorisant la translocation de p53 du noyau vers le cytoplasme et par conséquent sa dégradation (Alarcon-Vargas et Ronai, 2002) par le protéasome.

La miniprotéine synthétique superTIP (thioredoxin insert protein) lie MDM2 au niveau de son site de liaison à p53 (Bottger *et al.*, 1997). La protéine p53 s'accumule alors dans le noyau, ce qui active la transcription des protéines cibles de p53 et induit l'arrêt du cycle cellulaire.

Les nutlines sont des composés synthétiques qui excluent la protéine p53 de sa poche de liaison à MDM2 (Vassilev *et al.*, 2004). La protéine p53 est alors libre, elle peut donc arrêter le cycle cellulaire et induire l'apoptose des cellules tumorales exprimant une protéine p53 sauvage. Les nutlines sont inactives dans les tumeurs abritant une protéine p53 mutée où elles induisent uniquement un arrêt réversible de la croissance cellulaire.

La molécule RITA (reactivation of p53 and induction of tumour cell apoptosis) inhibe l'interaction entre p53 et MDM2 en se fixant à p53 (Issaeva *et al.*, 2004 ; Espinoza-Fonseca, 2005). Il en résulte une augmentation de la transcription des gènes cibles de p53 puis de l'apoptose des cellules HCT-116 exprimant une protéine p53 sauvage (Issaeva *et al.*, 2004). Ciblant uniquement les cellules transformées, RITA est une thérapeutique ciblée intéressante car les cellules saines avoisinantes peuvent continuer à proliférer.

A l'inverse, pifithrine- α (p fifty-three inhibitor : PFT- α) est un inhibiteur chimique qui bloque l'expression de p53 au niveau transcriptionnel (Komarov *et al.*, 1999 ; Charlot *et al.*, 2006). Elle protège i) *in vitro* les cellules saines exprimant une protéine p53 sauvage contre l'apoptose induite par irradiation ou par traitement par la doxorubicine, l'étoposide, le paclitaxel et ii) *in vivo* les souris contre les stress génotoxiques associés aux traitements anti-cancéreux (Komarova et Gudkov, 2000 ; 2001). La pifithrine- α pourrait donc être utilisée pour réduire les effets secondaires de la radio- ou de la chimio-thérapie sur les cellules saines avoisinant les cellules tumorales. Néanmoins, certains points restent à élucider car des travaux ont montré que la pifithrine- α pouvait aussi promouvoir l'apoptose induite par la doxorubicine ou les UVB des cellules murines épidermiques JB6 (Kaji *et al.*, 2003).

3.4.4.2. p53 mutée

La principale propriété biochimique altérée de la protéine p53 mutée est sa liaison à l'ADN. Des molécules ont donc été développées pour stabiliser la structure du domaine de liaison de p53 à l'ADN. Cette stabilisation limite les conséquences fonctionnelles les plus fréquentes des mutations de p53. Ces composés i) protègent les protéines p53 sauvages de la dénaturation thermique,

ii) restaurent partiellement la capacité de certains mutants à réagir avec des anticorps spécifiques de p53 sauvage et iii) stimulent la transcription dépendante de p53 d'un gène rapporteur dans des cellules exprimant une protéine p53 mutée. Par exemple, CP31398 inhibe la croissance de tumeurs humaines xénogreffées sans aucun effet secondaire (Wang *et al.*, 2006).

D'autres composés synthétiques ont été développés pour leur capacité à induire l'expression de gènes cibles de p53 dans des cellules exprimant une protéine p53 mutée mais non dans des cellules dépourvues de p53. Parmi ces composés, la 9-hydroxyellipticine (9-HE) peut induire l'apoptose des lignées tumorales abritant une protéine p53 mutée (Ohashi *et al.*, 1995). PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) permet aussi de restaurer les propriétés de liaison à l'ADN pour un grand nombre de mutants *in vitro* et entraîne l'activation de la transcription des gènes cibles de p53 (Bykov *et al.*, 2002a, 2002b, 2003 ; Bykov et Wiman, 2003 ; Charlot *et al.*, 2006). L'activité de PRIMA-1 ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo*. En effet PRIMA-1 modifie la conformation spatiale et restaure le domaine de liaison à l'ADN des protéines p53 mutées déjà présentes dans la cellule. Des études *in vivo* ont montré que l'activité anti-tumorale de PRIMA-1 est dépendante de la mutation de p53 et est sans effet toxique notoire (Bykov *et al.*, 2002b).

3.5. Chimiothérapie et cancer du col de l'utérus

A un stade localisé, la chimiothérapie n'a pas de place lors du traitement initial du cancer du col de l'utérus. En cas de tumeurs plus évoluées (Benedet *et al.*, 2000), une chimiothérapie est associée concomitamment à la radiothérapie et à la curiethérapie (Resbeut *et al.*, 2003). De plus, la chimiothérapie tient une place prépondérante dans le cas d'une tumeur métastatique d'emblée ou en cas de récurrence ne pouvant bénéficier ni d'une chirurgie, ni d'une radiothérapie. Dans la majorité des cas de tumeurs métastatiques, la chimiothérapie a surtout un rôle palliatif. En effet, peu de réponses complètes existent et les durées de réponse et de survie sont courtes. Par exemple, les durées de réponse sont de 4 à 6 mois et les durées de médiane de survie sont inférieures à un an dans le cas de traitement par le cisplatine. A l'heure actuelle, de part sa forte activité et sa toxicité acceptable, le cisplatine est la drogue de référence mais en monothérapie, à raison de 50-100mg/m² toutes les trois semaines, les taux de réponse sont relativement modestes (de la Motte Rouge *et al.*, 2006). Le cisplatine offre un double intérêt car il est le cytotoxique le plus efficace dans les carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus et il a un effet radiosensibilisant clairement démontré dans des études précliniques (Fu, 1985). Aucun effet-dose n'est observé et l'augmentation des posologies augmente la toxicité mais les réponses sont rarement complètes et sont le plus souvent de courte durée. Le mauvais pronostic à court terme conduit à poursuivre et à intensifier la recherche de traitements plus efficaces. Aucune étude clinique de phase III n'a comparé le meilleur protocole de chimiothérapie aux meilleurs soins palliatifs dans cette indication. Par ailleurs, aucun protocole standard de polychimiothérapie pour traiter les cancers du col de l'utérus évolués ou lors de récurrence n'existe. Dans ce contexte, de nouvelles approches thérapeutiques ainsi que de nouvelles chimiothérapies doivent être mises au point.

Les HPV étant responsables de lésions bénignes et malignes en particulier au niveau du col de l'utérus, des stratégies thérapeutiques ou de prévention fondées sur la vaccination contre l'agent responsable de ces pathologies sont en cours d'évaluation (Pretet *et al.*, 2006). Deux approches

vaccinales ont été envisagées : la vaccination prophylactique ciblant les protéines de la capsid et la vaccination thérapeutique ciblant les oncoprotéines E6 et E7.

Les **vaccins prophylactiques** contre les infections par HPV sont actuellement disponibles dans de nombreux pays (Bayas *et al.*, 2008). Ils ont été développés pour lutter contre l'entrée des HPV dans les cellules cibles. Ces vaccins induisent une immunité humorale qui se traduit par la production d'anticorps neutralisant sériques, qui après transsudation dans les muqueuses vont bloquer l'infection au niveau de la lumière cervico-vaginale. Développé et commercialisé depuis septembre 2006 par MSD Sanofi Pasteur, le Gardasil® est un vaccin tétravalent dirigés contre les génotypes 16 et 18, types les plus fréquemment impliqués dans le cancer du col de l'utérus et les lésions précancéreuses (Pretet *et al.*, 2008a ; Pretet *et al.*, 2008b) et contre les génotypes 6 et 11 à faible risque oncogène mais responsables des condylomes anogénitaux (Aubin *et al.*, 2008). Le vaccin bivalent Cervarix® développé par GSK protège contre les infections par HPV16 et 18 et est commercialisé depuis septembre 2007. Ces deux vaccins sont basés sur la production de pseudo-particules virales L1 ou VLP. Ils ne contiennent pas d'ADN viral donc ne sont pas infectieux. Les protéines L1 des différents génotypes s'assemblent en capsomères (5 protéines L1) et 72 capsomères forment une VLP. Les VLPs ont une structure tridimensionnelle analogue à celle de la capsid virale et portent les épitopes conformationnels responsables de la production d'anticorps neutralisants. Administrés par voie intramusculaire (au niveau du deltoïde), ces VLPs induisent la production d'anticorps qui transsudent dans la muqueuse et la lumière vaginale. Ces anticorps vont alors neutraliser les particules virales afin de i) prévenir les infections incidentes et persistantes, ii) prévenir le développement de dysplasies modérées et sévères cervicales (CIN2 : cervical intra-epithelial neoplasia), vaginales (VaIN2 : vaginal intra-epithelial neoplasia) ou vulvaires (VIN2 : vulvar intra-epithelial neoplasia) associées aux HPV16 et 18, iii) prévenir les condylomes anogénitaux causés par les HPV6 et 11 pour le Gardasil® et iv) à long terme prévenir le cancer du col de l'utérus. Pour les deux vaccins, les VLPs sont produites dans des cellules eucaryotes et le calendrier vaccinal est peu différent. Des études comportant environ 18 000 femmes âgées de 15 à 25 ans ont montré que le Cervarix® est efficace à 100% contre les infections persistantes à HPV16 et 18 et à plus de 90% contre les CIN2+ qui leur sont associées (Paavonen *et al.*, 2007). Des études randomisées incluant plus de 20 000 femmes âgées de 16 à 26 ans ont montré que le Gardasil® induit une protection proche de 100% contre les CIN2+ associées aux HPV16 et 18 (FUTUREII, 2007 ; Garland *et al.*, 2007). L'efficacité des vaccins VLPs est essentiellement jugée sur la présence d'anticorps neutralisants circulants et le niveau de protection conféré semble corrélé au titre des anticorps sériques dans le sérum. Ces deux vaccins induisent des taux d'anticorps de 10 à 100 fois supérieurs à ceux observés après une infection naturelle. Ces anticorps anti-HPV persistent à des taux très élevés jusqu'à 5 ans post-vaccination (Olsson *et al.*, 2007) et cette réponse immunitaire est d'autant plus élevée que le sujet vacciné est jeune. De plus, la vaccination contre les HPV16 et 18 montre une protection croisée vis-à-vis d'autres HPV haut risque alpha type 31 et 45 proches sur le plan phylogénétique des HPV16 et 18 respectivement (Paavonen *et al.*, 2007). Les adjuvants de nouvelle génération utilisés peuvent renforcer la mémoire immunitaire. Ainsi l'adjuvant ASO₄ dans le vaccin Cervarix® génère une réponse humorale plus importante et plus persistante que l'hydroxyde d'aluminium (ASO₄) seul. En effet ASO₄ cible les TLR₄ qui activent les cellules dendritiques, lesquelles activent les cellules CD₄ type Th₁ et la production d'anticorps. Les cellules mémoires sont aussi plus nombreuses avec ASO₄ (Giannini *et al.*, 2006). Par ailleurs, la vaccination peut aussi entraîner une réponse humorale au niveau des sécrétions cervicales. La majorité des IgG présentes au niveau de la muqueuse génitale provient du plasma par transsudation, les titres d'anticorps sériques doivent donc être élevés pour

assurer la protection de la muqueuse génitale (Hantz *et al.*, 2006 ; Meurice, 2007). Toutefois les anticorps ne modifient pas la clairance virale chez les femmes infectées au moment de la vaccination (Hildesheim *et al.*, 2007). Les différentes études montrent que ces deux vaccins sont bien tolérés. Des réactions locales de type douleurs et érythème transitoire ont été observées mais pas plus fréquemment que chez les sujets ayant reçu le placebo. Des céphalés, des réactions fébriles et des nausées ont aussi été notés.

Les **vaccins thérapeutiques** visent à stimuler la production de lymphocytes T cytotoxiques. L'immunité à médiation cellulaire tend à éliminer les cellules infectées par HPV et/ou les cellules tumorales. Ce sont des vaccins produits à partir des protéines E6 et E7 tronquées dépourvues de leur activité oncogénique. Les premiers essais cliniques sont peu convaincants. Au stade métastatique, l'injection de cellules dendritiques préparées au préalable avec l'oncoprotéine E7 d'HPV18 a permis de recruter des cellules T naïves et de réorienter la réponse immunitaire stimulée par l'injection concomitante d'Il-2 à faible dose. Une réponse clinique a été observée chez une femme traitée pour un adénocarcinome du col de l'utérus avec des métastases pulmonaires et des épanchements pluraux bilatéraux (Santin *et al.*, 2002). Actuellement un essai clinique multicentrique de phase II est en cours à l'Institut Curie (Paris) et concerne le traitement de patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus en rechute précoce à l'aide de peptides longs immunogènes dérivés des protéines E6 et E7 d'HPV16. Dans ce contexte l'immunothérapie contre les HPV est une voie de recherche thérapeutique prometteuse dans le traitement du cancer du col de l'utérus.

En plus des vaccins thérapeutiques, d'autres thérapies dites **TNA** (therapeutic nucleic acids) (Alvarez-Salas et DiPaolo, 2007) sont en cours d'évaluation. Ces thérapies concernent i) les oligonucléotides antisens anti-E6/E7 d'HPV16, qui diminuent le taux des transcripts E6/E7 ainsi que le niveau d'expression de la protéine E7 dans des cellules SiHa HPV16⁺ (Venturini *et al.*, 1999), ii) le ribozyme R434 anti-E6 qui abolit l'immortalisation induite par les gènes E6/E7 d'HPV16 (Alvarez-Salas *et al.*, 1998) et iii) les siRNA anti-E6/E7 d'HPV16 qui inhibent la croissance tumorale *in vitro* (Yamato *et al.*, 2008) et *in vivo* (Jonson *et al.*, 2008). Un nouvel axe de thérapie se profile et concerne l'étude des miRNAs, petits ARN de 18 à 22 nucléotides régulateurs négatifs de l'expression de nombreux gènes impliqués dans divers processus physiologiques mais aussi dans l'initiation et la progression du processus tumoral (Schickel *et al.*, 2008). On parle alors d'oncomirs dont certains sont des activateurs ou des répresseurs du développement tumoral (Esquela-Kerscher et Slack, 2006). Dans les cellules de carcinome cervical, de nombreux oncomirs sont altérés (Esquela-Kerscher et Slack, 2006). Les miRNA de la famille *let-7* sont des répresseurs des oncogènes *ras* et *HMGA2* dans des tumeurs de poumon et des cellules HeLa (Johnson *et al.*, 2005 ; Lee et Dutta, 2007), ils pourraient donc jouer un rôle dans la carcinogenèse cervicale. Il a été montré que les oncomirs miR-100 et miR-125b-1 sont regroupés avec *ket-7a-2* au niveau du site fragile 11q23.3 dans des tumeurs cervicales et d'autres oncomirs tels que miR-194, miR-215 sont trouvés près des sites d'intégration d'HPV16 (Calin *et al.*, 2004). Cependant d'autres études ont montré que les miRNAs viraux ne semblent pas intervenir dans la transformation des cellules par HPV-31 (Cai *et al.*, 2006) et qu'ils seraient absents dans le génome de l'HPV18 (Pfeffer *et al.*, 2005). Les apoptomirs sont des miRNAs impliqués dans la régulation de l'apoptose : la base de données TargetScan (<http://www.targetscan.org>) a mis en évidence le peu de miRNAs régulant les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 alors que de nombreux miRNAs régulent l'expression des membres anti-apoptotiques de cette famille (Schickel *et al.*, 2008). Par ailleurs la famille de miRNA

miR-34 reflète le statut de la protéine p53 (He *et al.*, 2007) et les gènes réprimés participent directement à la régulation du cycle cellulaire (cycline E2, CDK4, récepteur du facteur de croissance hépatocytaire...). Des taux relativement faibles de miR-34 sont observés dans les tumeurs humaines, ce qui s'accorde avec la disparition d'une protéine p53 fonctionnelle. Bien qu'aucun rôle n'ait été clairement défini dans la carcinogenèse notamment dans le cas du cancer du col de l'utérus, les miRNAs sont des cibles attractives pour de futures thérapies basées sur les TNAs.

3.6. Cas de la staurosporine

Les protéines PKC sont des enzymes cytoplasmiques à activité sérine-thréonine kinase impliquées dans la prolifération, la différenciation et la transformation tumorale. En effet, l'expression des PKC est altérée dans les tumeurs ce qui favorise l'absence de contrôle de la prolifération. Ce sont donc des cibles thérapeutiques importantes. Un screening d'extraits bactériens (*streptomyces*) permettant l'identification d'alkaloïdes ayant une activité inhibitrice des PKC a permis de caractériser la staurosporine (STS) ou indolo[2,3- α]carbazole (Figure 31). Molécule inhibitrice de nombreuses protéines kinases dépendantes du calcium (Omura *et al.*, 1977), la STS est devenue par la suite le leader de cette famille et ce, malgré une activité non spécifique et un grand nombre de protéines kinases inhibées (Figure 32). Chez les animaux, la STS a un faible index thérapeutique (Tamaoki, 1991). C'est pourquoi des analogues ont donc été développés tels que UCN-01 (7-hydroxy-staurosporine), second modulateur après le flavopiridol des CDK utilisé dans des essais cliniques de part ses propriétés uniques, ou CGP 41 251/PKC412 (N-benzoyl-staurosporine) (Caravatti *et al.*, 1994). L'effet anti-prolifératif et anti-tumoral de la STS et de ses dérivés a été montré dans de nombreuses lignées cellulaires et ce, malgré des mécanismes cellulaires très complexes impliquant de nombreuses voies de signalisation (Figure 32). Par exemple, à faibles concentrations (< 0.3 μ M), UCN-01 a seulement une activité anti-proliférative alors qu'à fortes concentrations (>0.5 μ M), il abolit les points de contrôle du cycle cellulaire et induit l'apoptose (Senderowicz, 2000).

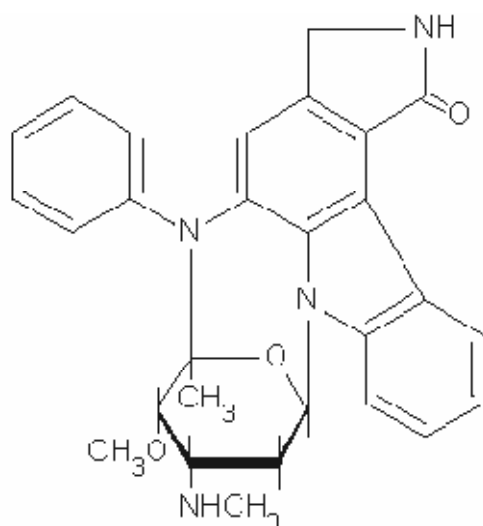


Figure 31: Structure chimique de la staurosporine

La STS et ses analogues inhibent *in vitro* et dans des essais cliniques de phase I la kinase PDK1 impliquée dans la voie PI3K/Akt (Dasmahapatra *et al.*, 2004 ; Jimeno *et al.*, 2008). En inhibant la protéine PKB/Akt, la STS bloque aussi la phosphorylation de Bad suite au traitement par la nicotine de cellules dérivées de cancer pulmonaire. Bad peut alors être transloqué à la mitochondrie où il participe à l'induction de l'apoptose (Jin *et al.*, 2004). UCN-01 inhibe aussi la protéine PKB/Akt conduisant à sa déphosphorylation et à son inactivation (Testa et Bellacosa, 2001 ; Sato *et al.*, 2002) ainsi que deux de ses cibles, GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) et FKHR (ForKHead transcription factor) dans des lignées dérivées de neuroblastomes (Shankar *et al.*, 2004), tout ceci aboutissant à la mort de la cellule. L'apoptose synergique induite par UCN-01 et la rapamycine de cellules promonocytaires U937 est médiée par la diminution de la phosphorylation de Raf-1, MEK et ERK, la diminution de l'activité de Akt ainsi que l'augmentation de la phosphorylation de JNK (Hahn *et al.*, 2005).

Le cycle cellulaire est une série d'évènements séquentiels, coordonnés, régulés par les complexes CDK/cycline, l'activité des CDK étant aussi modulée par d'autres kinases ou phosphatases ou par liaison avec les CKIs. Suite à des dommages à l'ADN, un arrêt du cycle cellulaire permet les réparations de l'ADN. UCN-01 peut induire un arrêt en phase G₁ dans des cellules de sein saines selon la fonctionnalité de la protéine pRb, attribuée à une baisse de l'activité de Cdk2 de part son interaction avec p27 (Chen *et al.*, 1999). Des cellules de carcinomes épidermoïdes A431 abritant une protéine p53 mutée et des cellules de carcinomes de la tête et du cou HN12 sont arrêtées en phase G₁ suite à leur incubation avec UCN-01. Cet arrêt est associé à une hyperphosphorylation de Rb ainsi qu'à l'accumulation des protéines p21 et p27 (Akiyama *et al.*, 1997 ; Patel *et al.*, 2002). Le rôle exact de pRb lors de l'arrêt en G₁ initié par UCN-01 est controversé (Shimizu *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1999). De plus, suite à des dommages de l'ADN, UCN-01 peut aussi abolir la progression dans la phase S (Bunch et Eastman, 1997 ; Shao *et al.*, 1997). A ce niveau, UCN-01 inhibe la phosphorylation induite par la kinase DNA-PK de la protéine de réplication et de réparation RPA2 (replication protein A 2) dans des cellules de carcinomes pulmonaires humains HT29 traitées par la camptothécine (Shao *et al.*, 1999). Dans des cellules abritant une protéine p53 inactive, les cellules s'accumulent alors en phase G₂ car le point de contrôle de la phase G₁ est inactif. De plus la STS et UCN-01 ont un effet direct sur Chk1, protéine régulant le point de contrôle en G₂ (Busby *et al.*, 2000 ; Jackson *et al.*, 2000 ; Tse *et al.*, 2007). En inhibant Chk1, UCN-01 entraîne la phosphorylation et donc l'activation de la protéine p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), résultant en la phosphorylation de p53 au niveau des sérines 15 et 46 (Vitale *et al.*, 2008). Ces phosphorylations augmentent la stabilité, la fixation à l'ADN et l'activité de p53. A l'inverse des cellules CA46 irradiées puis traitées par UCN-01 présentent une activité inappropriée de CDK1/cyclineB et une entrée précoce en mitose suivie de la mort par apoptose des cellules (Wang *et al.*, 1996b). Cet effet peut être expliqué par l'inactivation de la protéine Wee1, kinase régulant négativement la transition G₂→M (Yu *et al.*, 1998). Ces différents effets constituent un nouvel axe de recherche de traitement thérapeutique en combinant UCN-01 à des agents entraînant des dommages à l'ADN (Senderowicz, 2003).

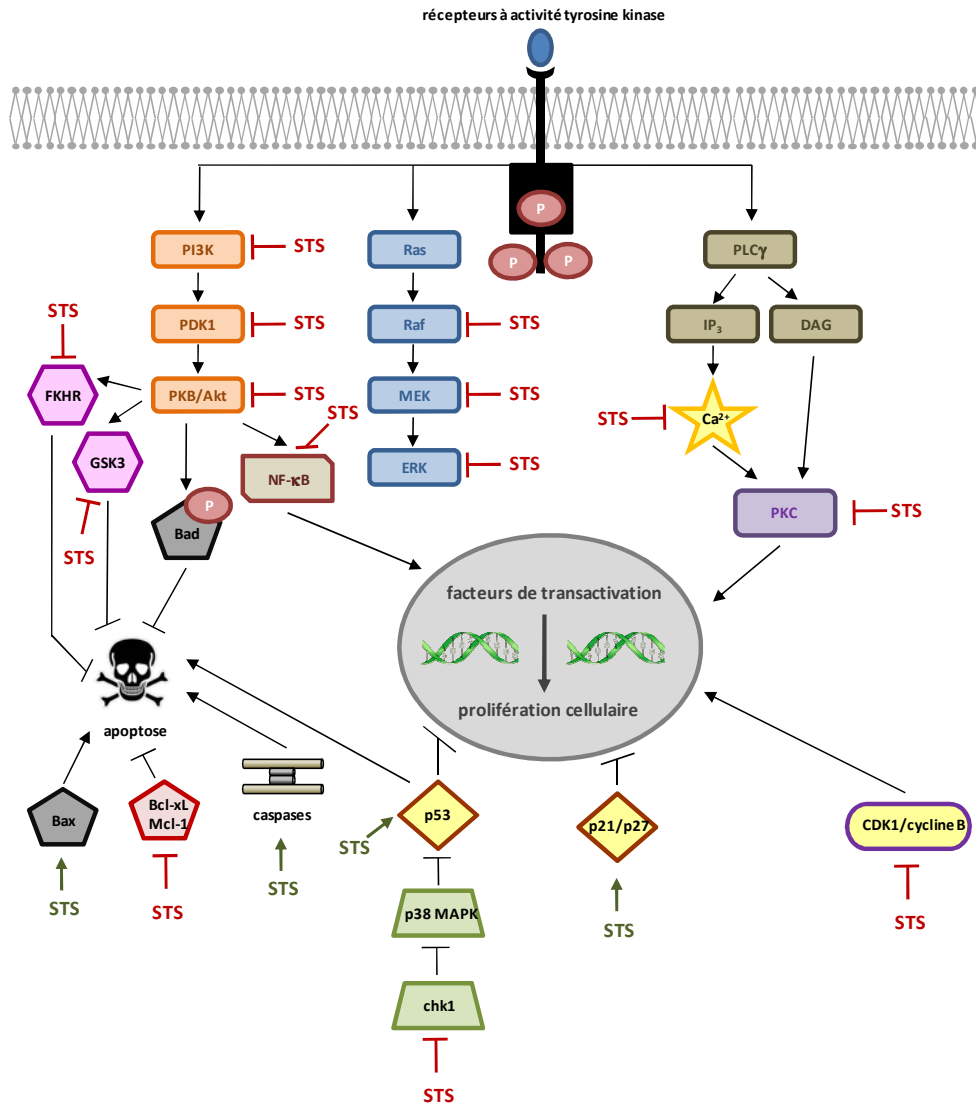


Figure 32 : Représentation schématique de l'effet de la STS sur la prolifération cellulaire et l'apoptose

La STS est un puissant inducteur d'apoptose dans différentes lignées cellulaires mais le mécanisme mis en jeu n'est pas clairement défini et semble être spécifique des tissus (Zhang *et al.*, 2004). Dans la plupart des cas, la voie mitochondriale semble jouer un rôle prépondérant. Dans des cellules de gliome déficientes en p53, UCN-01 semble favoriser l'activation de Bax (Jane *et al.*, 2007). UCN-01 active la voie apoptotique mitochondriale (Dai *et al.*, 2003) *via* i) la suppression de la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL dans des carcinomes de colon (cellules LS513 et SW48) (Bhonde *et al.*, 2005) et ii) la diminution du taux d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 dans des cellules promonocytaires U937 en association avec la rapacynine, (Hahn *et al.*, 2005). La diminution de l'expression de Bcl-xL est aussi associée à l'augmentation de la protéine p38 MAPK lors de l'apoptose induite par UCN-01 dans des cellules dérivées de cancer colique (Chan *et al.*, 2003b). Pour activer l'apoptose, UCN-01 inhibe aussi NF-κB dans des cellules de myélome multiple (cellules U266) (Dai *et al.*, 2004). PKC412 peut aussi induire l'apoptose en activant des caspases ainsi que la

libération de molécules apoptogènes de la mitochondrie dans des cellules dérivées de cancer de poumon non à petites cellules (cellules NSCLC) (Hemstrom *et al.*, 2005).

Le développement clinique du PKC412 (midostaurin®) est dû à son ciblage de FLT-3, tyrosine kinase dont les mutations, activatrices, sont fréquemment identifiées dans les pathologies myéloprolifératives (Stone *et al.*, 2005 ; Illmer et Ehninger, 2007). De plus, PKC412 pourrait aussi être utilisé i) dans le traitement des patients atteints de cancer du pancréas (El Fitori *et al.*, 2007) et ii) dans le traitement des patients atteints de diabète car il cible le récepteur du VEGF, impliqué dans l'angiogenèse (Wang *et al.*, 2008).

UCN-01 est en cours d'évaluation clinique mais les études de phase I ont révélé les limitations pharmacocinétiques car, à la différence des études *in vivo* chez les animaux, UCN-01 se lie fortement à la glycoprotéine acide α -1 et son élimination, d'environ 30 jours, est très lente (Senderowicz, 2000). Des effets synergiques ont été observés en combinant UCN-01 à d'autres agents chimiothérapeutiques tels que camptothécine, mitomycine C, 5-FU, et cisplatine (Husain *et al.*, 1997 ; Hsueh *et al.*, 1998 ; Jones *et al.*, 2000 ; Sugiyama *et al.*, 2000). Ainsi UCN-01 a été combiné à l'irinotecan, dérivé de la camptothécine, pour traiter des patients présentant des tumeurs solides (Jimeno *et al.*, 2008) ou au topotecan dans le traitement de patientes atteintes de cancer ovarien récurrent avancé mais l'effet anti-tumoral observé dans ce dernier cas n'est pas considéré comme significatif (Welch *et al.*, 2007). Une autre combinaison thérapeutique peut être l'association entre UCN-01 et les inhibiteurs des HDACs (histone deacétylase), les HDIs (histone deacetylase inhibitors). En effet la mise en évidence de l'effet anti-tumoral de la trichostatine A (Yoshida *et al.*, 1990) a conduit à l'identification d'autres inhibiteurs tels que le butyrate de sodium ou l'acide valproïque. Dans la plupart des cas, les HDIs induisent l'apoptose des cellules tumorales. Dans des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus et HPV⁺ (cellules HeLa), cet effet anti-tumoral est médié par E2F et induit l'expression de l'isoforme pro-apoptotique p73, ce qui entraîne la transcription accrue de ses gènes cibles Bax et PUMA (Finzer *et al.*, 2001 ; Finzer *et al.*, 2004). L'effet anticancéreux de l'acide valproïque est potentialisé par UCN-01 dans diverses cellules cancéreuses, notamment les cellules dérivées de cancer de poumons non à petites cellules ou dérivées de cancer de l'œsophage (Yeow *et al.*, 2006). Notre équipe travaille actuellement sur cette bithérapie STS/UCN-01 vs trichostatine A et STS/UCN-01 vs sodium butyrate dans le traitement de cellules dérivées de cancer du col de l'utérus *in vitro* et *in vivo* en collaboration avec l'équipe de J.Rommelaere du DKFZ (Heidelberg, Allemagne).

Ainsi la STS et ses analogues peuvent avoir un avenir prometteur en tant que nouveau composé chimiothérapeutique dans le traitement du cancer du col de l'utérus. Dans ce contexte la caractérisation du réseau apoptotique mis en place par la STS et ses dérivés est primordiale.

Partie 2

Matériel et Méthodes

1. Lignées cellulaires

Cinq lignées cellulaires humaines ont été utilisées pour ce travail. Quatre d'entre elles proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection) (Manassas, VA, USA).

Les lignées cellulaires HeLa et CaSki possèdent une protéine p53 sauvage (p53^{wt}). La lignée **HeLa** dérive d'un adénocarcinome du col de l'utérus abritant l'HPV18 chez une femme noire de 31 ans. Cette lignée est cultivée en milieu EMEM (Lonza, Basel, Suisse) supplémenté de 5% de sérum de veau foetal (SVF) (Lonza), de 2 mM de L-Glutamine (Lonza) et de 5% de pénicilline-streptomycine (Lonza). La lignée **CaSki** dérive quant à elle d'un adénocarcinome du col de l'utérus abritant l'HPV16 ainsi que quelques séquences d'HPV18, métastase d'un cancer primitif du mésentère chez une femme caucasienne de 40 ans. Les cellules CaSki sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Lonza) additionné de 5% de SVF, de 2 mM de L-Glutamine et de 5% de pénicilline-streptomycine.

La lignée **C-33A**, dérivant d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus d'une femme caucasienne de 66 ans, ne contient pas d'HPV et surexprime la protéine p53 mutée (p53^{mt}) au niveau de l'AA 273 (R273C) du domaine de liaison à l'ADN. Cette mutation rend la protéine p53 inactive au niveau transcriptionnel (Scheffner *et al.*, 1991 ; Yee, C. *et al.*, 1985). Les cellules C-33A sont cultivées dans le même milieu que la lignée HeLa supplémenté par 5% de pyruvate de sodium (Lonza).

La lignée **SaOs-2**, dérivant d'un ostéosarcome d'une enfant caucasienne de 11 ans, est dépourvue de p53 et exprime une protéine pRB non fonctionnelle. Cette lignée est cultivée en milieu DMEM (Lonza) supplémenté de 10% de SVF, 4 mM de L-Glutamine et de 5% de pénicilline-streptomycine

La lignée **HaCat**, kératinocytes immortalisés gracieusement fournis par Dr Laurence Nicod (Laboratoire de Biologie Cellulaire EA 4267-IFR 133, UFR SMP Saint-Jacques, Besançon), est caractérisée par une protéine p53 mutée dans les points chauds aux UV (codon 179 de l'exon 5 et codons 281 et 282 de l'exon 8) (Lehman *et al.*, 1993) et est cultivée dans le même milieu que la lignée SaOs-2.

L'ensemble des lignées cellulaires est cultivé à 37°C sous atmosphère humide à 5% CO₂. Les différentes lignées cellulaires sont ensemencées à 30-40% de confluence 24h avant le début des traitements. A la fin des traitements, les cellules sont récoltées par 3 mL de trypsine-EDTA (0.15%-0.015%) (Lonza) à 37°C pendant 3 min ainsi que leurs surnageants.

2. Traitements des cellules

2.1. Induction de l'apoptose

Pour induire l'apoptose, les cellules sont traitées avec 300 nM de **staurosporine (STS)** (Sigma, St Quentin Fallavier, France) dissoute dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Bernard *et al.*, 2001).

2.2. Restauration du domaine de liaison à l'ADN de p53

Afin de restaurer l'activité transcriptionnelle de p53 mutée (Figure 33), les cellules sont traitées pendant 24 h avec 125 μ M de **PRIMA-1** (TebuBio, Le Perray en Yvelines, France) dissout dans de l'eau (Bykov *et al.*, 2002b) additionné ou non de STS ou STS plus pifithrine- α .

2.3. Blocage réversible de l'activité transcriptionnelle de p53

Afin de bloquer l'activité transcriptionnelle de p53 (Figure 33), les cellules sont prétraitées avec 20 μ M de **pifithrine- α** (PFT- α) (TebuBio) dissoute dans du DMSO (Komarov *et al.*, 1999) pendant 12 h puis co-traitées avec de la STS ou STS plus PRIMA-1 pendant 24 h.

Remarque : les cellules ont d'abord été cotraitées avec PFT- α plus STS mais il s'est avéré qu'un prétraitement à la PFT- α était nécessaire.

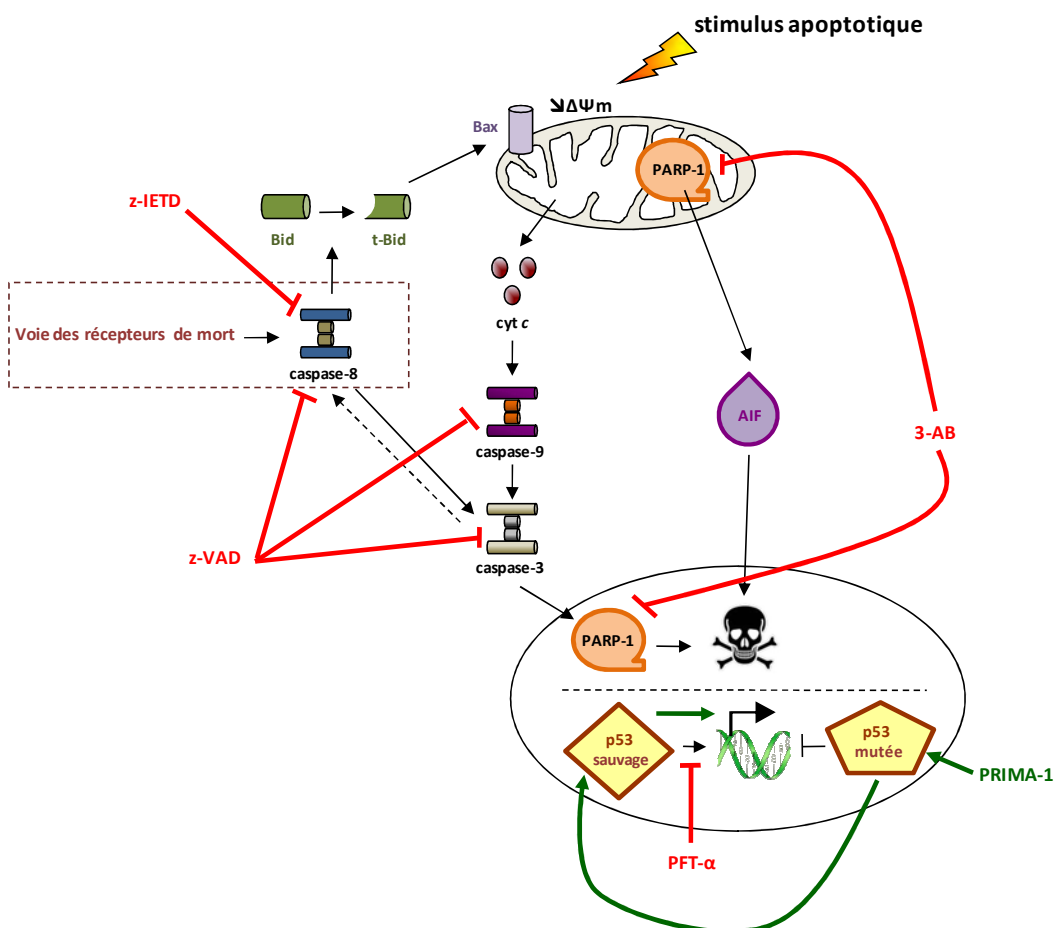


Figure 33 : Représentation schématique des différentes protéines ciblées au cours de ce travail

2.4. Blocage de l'activité des caspases

Le **z-VAD-fmk** (z-VAD) est un peptide synthétique qui bloque l'activité protéasique par compétition de l'ensemble des caspases (Figure 33). C'est un inhibeur irréversible dit à large spectre. Afin de bloquer l'activité de l'ensemble des caspases, les cellules sont prétraitées avec 100 µM de z-VAD (Sigma) dissout dans du DMSO pendant 1 h puis co-traitées avec de la STS.

Remarque : des études préliminaires ont permis de déterminer la dose et le temps de traitement nécessaires pour observer l'inhibition de l'activité des caspases dans nos modèles. Il s'est avéré qu'un prétraitement d'une heure avec 100 µM de z-VAD était nécessaire.

Le **z-IETD-fmk** (z-IETD) est un inhibeur irréversible qui bloque l'activité protéasique de la caspase-8 (Figure 33). Pour observer un effet dans notre modèle, les cellules sont prétraitées avec 100 µM de z-IETD dissout dans du DMSO (Bachem, Weil am Rhein, Germany) pendant 1 heure puis co-traitées avec de la STS pendant 24 h.

2.5. Inhibition de l'activité de PARP-1

Afin de bloquer l'activité protéolytique de PARP-1, les cellules sont traitées par 10 mM de **3-aminobenzamide** (3-AB) (Sigma), un inhibiteur compétitif de PARP-1 (Figure 33), dissout dans de l'éthanol associé ou non à la STS.

Remarque : des études préliminaires ont permis de déterminer la dose et le temps de traitement nécessaires pour observer l'inhibition de la PARP-1. Il s'est avéré qu'un prétraitement n'était pas nécessaire.

3. Cytométrie de flux

Les différentes lignées cellulaires sont ensemencées dans des plaques 6 puits.

3.1. Dépolarisation membranaire mitochondriale

Le MitoTracker Red CMXRos (MT) (Molecular Probes Europe, Leiden, Pays-Bas) est un fluorochrome (λ excitation : 579 nm ; λ émission : 599 nm) capable de former des ponts disulfures avec les groupements –SH présents dans la matrice mitochondriale. En effet, lorsque le MT pénètre dans la membrane mitochondriale polarisée, il est oxydé puis séquestré. Ainsi, sa fixation est directement en adéquation avec l'état de polarisation de la membrane mitochondriale.

Une fois traitées, les cellules sont incubées pendant 30 min à 37°C avec 200 nM de MT dilué dans le milieu de culture approprié. Les cellules sont ensuite lavées dans 1 mL de PBS 1X afin d'éliminer le fluorochrome en excès, centrifugées (700 g, 10 min, +4°C) et resuspendues dans 400 µL de PBS 1X

avant d'être analysées par cytométrie de flux (FACScan Epics® Altra flow cytometer, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant une membrane mitochondriale dépolarisée grâce au logiciel Winmdi.

3.2. Quantification des cellules en Sub-G1

La détermination de la quantité d'ADN d'une cellule avec l'iodure de propidium (IP) (Sigma), agent intercalant de l'ADN et fluorescent (λ excitation : 488 nm, λ émission : 610 nm), permet d'analyser les différentes phases du cycle cellulaire : G₁ (quantité d'ADN : n), G₂M (quantité d'ADN : 2n), Sub-G₁ (cellules mourantes : quantité d'ADN inférieure à n).

Une fois récoltées, les cellules sont lavées au PBS 1X et centrifugées (700 g, 5 min, +4°C). Afin de fixer et de perméabiliser les cellules, les culots cellulaires sont repris dans 500 μ L d'éthanol glacial à 70%. Après une nuit de fixation à +4°C, elles sont centrifugées (800 g, 10 min, +4°C) puis lavées au PBS 1X. Les cellules sont ensuite incubées pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité dans 100 μ L de RNase A DNase-free (Sigma) (1 mg/mL de PBS 1X), additionné de 10 μ L d'une solution d'IP (1mg/mL). L'analyse du cycle cellulaire est réalisée par le logiciel Expo32 (Beckman Coulter).

4. Analyse des protéines

Les différentes lignées cellulaires sontensemencées dans des flasques de 75 cm². L'ensemble des étapes de préparation des extraits totaux ainsi que des extraits mitochondriaux, cytosoliques et nucléaires s'effectue à +4°C.

4.1. Extraction des protéines totales

Les cellules sont incubées dans du tampon RIPA et le lysat cellulaire obtenu est solubilisé par sonication (3 fois 10 sec), puis centrifugé (1 000 g, 5 min). Après extraction, les protéines sont quantifiées à l'aide de la trousse Protein Assay® (BioRad, Hercules, CA, USA) selon les instructions du fabricant puis stockées à -80°C.

Composition du tampon RIPA : Tris-HCl 50 mM pH 7.4 ; NaCl 150 mM ; NP-40 1% ; NaDOC 0.5% ; EDTA 1 mM

4.2. Purification des mitochondries, cytosols et noyaux

Après récolte, les cellules et leurs surnageants sont lavés dans du PBS froid. Le culot cellulaire est alors repris dans 1 mL de tampon d'extraction cytosolique (trousse Mitochondria/Cytosol Fractionation, BioVision, Clinisciences, Montrouge, France). Les cellules sont homogénéisées doucement par aspiration-refoulement puis incubées 10 min dans de la glace avant d'être

transférées dans un potter et lysées par 40 allers-retours du pilon. La lyse cellulaire est vérifiée par un test au bleu Trypan (Sigma).

Le lysat cellulaire est centrifugé (700 g, 10 min) puis : (1) le culot est repris dans 100 µl de tampon d'extraction nucléaire avant centrifugation (20 000 g, 10 min) : le surnageant ainsi obtenu correspond à la fraction nucléaire ; (2) le surnageant de la première centrifugation est, quant à lui, à nouveau centrifugé (10 000 g, 30 min) afin de séparer la fraction cytosolique (surnageant) et la fraction mitochondriale (culot), laquelle est reprise dans 100 µl de tampon d'extraction mitochondrial (trousse Mitochondria/Cytosol Fractionation).

La concentration protéique des différentes fractions est quantifiée par la trousse commerciale BioRad Protein Assay® selon les instructions du fabricant puis congelées à -80 °C. La pureté de chaque fraction est déterminée par la quantification de marqueurs spécifiques, à savoir la cytochrome c oxydase (COXIV) pour la fraction mitochondriale, la β-actine pour la fraction cytosolique et l'histone désacétylase-3 (HDAC-3) pour la fraction nucléaire.

Composition du tampon d'extraction nucléaire : KCl 500mM, HEPES 25 mM pH 7.8, PMSF 1mM, DTT 100 µM et glycérol 10%

4.3. Western-blotting

Une quantité de 10 à 70 µg de protéines est dénaturée dans du tampon Laemmli 2X (BioRad) supplémenté de β-mercaptoéthanol (5%) (v/v) 5 min à +95°C.

Les échantillons sont déposés sur un gel SDS-PAGE constitué de 2 parties, gel de concentration et gel de séparation. La migration s'effectue dans le tampon d'électrophorèse sous une tension de 120V pendant 1 h. Les protéines sont alors transférées sur une membrane PVDF (Hybond™-P, GE Healthcare Lifesciences, Saclay, France) en présence de tampon de transfert sous une tension de 100V pendant 2 heures.

Les sites aspécifiques de membranes sont saturés pendant 1 h à température ambiante dans du tampon TBS/Tween-20 0.1%/lait 5%. Après 2 lavages de 5 min dans du TBS/Tween-20 0.1%, les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire approprié (Tableau 1) pendant 90 min à température ambiante. Après 6 lavages de 5 min dans du TBS/Tween-20 0.1%, les membranes sont incubées 1 h avec l'anticorps secondaire spécifique conjugué à la peroxydase de Raifort (Tableau 1). Après 6 lavages de 5 min, la présence des protéines d'intérêt est révélée par le système *enhanced chemiluminescence system plus* (ECL plus reagents system, GE Healthcare).

Composition des gels :

- *gel de concentration* : 25% Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 ; acrylamide/bis-acrylamide 29/1 à 4% ; SDS 0.1% ; APS 0.1% ; TEMED 0.08%
- *gel de séparation* : 25% Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 ; acrylamide/bis-acrylamide 29/1 à 7.5 ou 10 ou 15% ; SDS 0.1% ; APS 0.1%, TEMED 0.08%

Composition des tampons :

- *tampon d'électrophorèse* : Tris-HCl 25 mM ; glycine 0.2 M ; SDS 0.1%
- *tampon de transfert* : Tris-HCl 25 mM ; glycine 192 mM ; méthanol 100%

- tampon TBS : Tris-HCl 200 mM pH 7.4 ; NaCl 1.36 mM

anticorps	clone		animal d'origine	dilution	fournisseur
primaires					
AIF	E-1	monoclonal	souris	1/500	Santa Cruz Biotechnology
Bax	6A7	monoclonal	souris	1/500	Molecular Probes Europe
Bcl-2	4D7	monoclonal	souris	1/500	PharMingen
Bid	#2002	polyclonal	lapin	1/500	Cell Signaling
cyt c	7H8.2C12	monoclonal	souris	1/500	PharMingen
caspase 3 (proforme et fragments clivés)	AAP-113	polyclonal	lapin	1/500	Stressgen
caspase 8 (proforme et fragments clivés)	3-1-9	monoclonal	souris	1/500	PharMingen
caspase 9 (proforme et fragments clivés)	#9502	polyclonal	lapin	1/500	Cell Signaling
PARP-1	4C10.5	monoclonal	souris	1/500	PharMingen
p21 ^{WAF1}	6B6	monoclonal	souris	1/500	PharMingen
p53	D0.1	monoclonal	souris	1/500	PharMingen
β-actin	AC15	monoclonal	souris	1/10 000	Sigma
COX IV	20E8-C12	monoclonal	souris	1/1 000	Molecular Probes Europe
HDAC-3	ref #06-890	polyclonal	lapin	1/1 000	Upstate Biotechnology
secondaires					
anti-IgG de lapin HRP conjugué	ref 554021		chèvre	1/10 000	PharMingen
anti-IgG de souris HRP conjugué	ref 554002		chèvre	1/10 000	PharMingen

Tableau 1 : Anticorps utilisés en western-blotting

5. Electrophorèse en champ pulsé

Ce type d'électrophorèse a été développé en 1984 par Schwartz et Cantor afin de séparer les grandes molécules d'ADN (>50 kpb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre. Le principe de cette technique consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel. La vitesse de migration d'un fragment d'ADN dans le gel varie dans le sens inverse de sa taille. Cette technique permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 1 kb à une dizaine de mégabases.

Les différentes lignées cellulaires sontensemencées dans des flasques de 75 cm². L'ADN est extrait des cellules à l'aide de la trousse QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. Cinquante µL d'ADN sont alors mixés avec 50 µL de CleanCut Agarose 2% (Sigma) préchauffé à 50°C afin de former des blocs d'agarose. Après solidification, les blocs d'agarose sont transférés dans les puits du gel d'agarose 1%. L'électrophorèse s'effectue dans du tampon Tris-Borate-EDTA 0.5X à l'aide du système CHEF-DR III PFGE® (BioRad). A la fin de l'électrophorèse, le gel est incubé dans un bain contenant du bromure d'ethidium (BET, 0.02%), agent intercalant de l'ADN avant d'être photographié grâce au BioRad Geldoc quantity program®.

Conditions d'électrophorèse :

- temps de pulse initial : 5 sec
- temps de pulse final : 60 sec
- temps de migration : 20 heures
- Volt/cm : 6
- angle : 120°C
- température : +14°C

Composition du tampon Tris-Borate-EDTA 0.5X : Tris borate 44.5 mM ; acide borique 44.5 mM ; EDTA 1 mM

6. Immunocytochimie

Les cellules sont cultivées dans des plaques 6 puits au fond desquels des lamelles de verre ont été déposées au préalable.

6.1. Microscopie à fluorescence

Au temps indiqué, les cellules sont rincées 2 fois par du PBS puis fixées et perméabilisées par une solution de méthanol/acétone (v/v) à +4°C pendant 3 min. Les cellules sont ensuite lavées à 3 reprises dans du PBS froid puis saturées pendant 20 min à température ambiante dans une solution de PBS/BSA 1%. Les cellules fixées sont alors incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps primaire anti-p53 (clone DO-7, PharMingen, 1/200) dilué dans une solution de PBS/BSA 0.1%/Triton x-100 0.1% (v/v) dénommé PBT. Après 3 lavages dans du PBT, les cellules sont mises en présence de l'anticorps secondaire (chèvre anti-IgG de souris) couplé au TRITC (isothiocyanate de tétra-méthylrhodamine) (DakoCytomation, Glostrup, Dannemark, 1/100) dilué dans du PBT pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages dans du PBT, les cellules sont incubées pendant 30 min à température ambiante avec 200 nM de Nonyl Acridine Orange (NAO) (Molecular Probes Europe), marqueur des mitochondries en se liant aux cardiolipines, et 1 µg/ml de Hoechst, marqueur de l'ADN nucléaire (Hoechst 3342, Molecular Probes Europe) dilués dans du PBT. Après 2 lavages dans du PBT puis 2 autres dans de l'eau ultrapure, les lamelles sont fixées sur des lames grâce au fluorescent mounting medium® (Dako) assurant une meilleure stabilité de la fluorescence. Après séchage à température ambiante, les lames sont stockées à +4°C avant d'être visualisées grâce à un microscope à fluorescence Olympus BX51 muni d'une caméra Olympus DP50.

6.2. Microscopie confocale

Au temps indiqué, les cellules sont rincées 2 fois par du PBS avant d'être incubées pendant 30 min à +37°C dans du milieu de culture contenant 20 nM de MT. Après trois lavages au PBS à température ambiante, les cellules sont fixées et perméabilisées dans une solution d'acétone/méthanol (v/v) pendant 3 min à +4°C. Les cellules sont alors lavées à 3 reprises dans du PBS froid puis saturées

pendant 20 min à température ambiante dans une solution de PBS/BSA 1%. Les cellules fixées sont alors incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire adéquate (cyt c : clone 7H8, Santa Cruz, 1/100 et AIF : clone E-1, Santa Cruz, 1/100) dilué dans une solution de PBS/BSA 0.1%/Triton x-100 0.1% (v/v) dénommé PBT. Après 3 lavages dans du PBT, les cellules sont mises en présence de l'anticorps secondaire (chèvre anti-IgG de souris) couplé à Alexa 488 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France, 1/100) dilué dans du PBT pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages dans du PBT, les cellules sont incubées pendant 10 min à température ambiante avec 5 µg/ml de DAPI (Invitrogen), marqueur nucléaire. Après 2 lavages dans du PBT puis 2 autres dans de l'eau ultrapure, les lamelles sont fixées sur des lames grâce au fluorescent mounting medium® (Dako) pour une meilleure stabilité de la fluorescence. Une fois séchées, les lames sont stockées à +4°C avant d'être visualisées grâce à un microscope confocal Olympus et analysées *via* le logiciel Olympus FV10-ASW 1.4 viewer.

Partie 3

Travaux Personnels

Contexte et objectifs

Le cancer du col de l'utérus est le second cancer le plus fréquent chez la femme dans le monde. Les traitements actuels contre ce cancer sont agressifs et d'une efficacité non optimale. C'est pourquoi des vaccins prophylactiques et des stratégies thérapeutiques innovantes ont été développés. Ces nouvelles stratégies induisent l'apoptose des cellules tumorales et impliquent différentes voies de mort. Dans ce contexte, Bernard *et al.* ont précédemment étudié dans notre laboratoire l'effet de la staurosporine (STS) sur des lignées cellulaires dérivées de cancer du col de l'utérus. La STS permet de restaurer l'apoptose court-circuitée dans les cellules cancéreuses du col de l'utérus et ce, selon le type cellulaire ($p53^{wt}$ HPV⁺ vs $p53^{mt}$ HPV) et la phase du cycle cellulaire. En effet, la STS entraîne un arrêt en phase G₂/M pour les cellules HeLa ($p53^{wt}$ HPV18) et en phase G₁ pour les cellules C-33A ($p53^{mt}$ HPV) (Bernard *et al.*, 2001). Par ailleurs, la STS entraîne l'augmentation de l'expression de p53, *via* la diminution de l'expression de l'oncogène viral E6 qui favorise la dégradation de p53 par le protéasome (Bernard *et al.*, 2003). Dans les cellules HPV, la STS entraîne aussi l'augmentation de l'expression de p53. Par la suite Charlot *et al.* ont permis de confirmer l'implication de cette protéine dans l'apoptose des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus *via* la translocation à la mitochondrie de p53 et ce, quel que soit le statut HPV ou p53. Cette translocation précède la chute du $\Delta\Psi_m$ ainsi que la fragmentation de l'ADN (Charlot *et al.*, 2004) et est caractéristique d'une apoptose dépendante de p53 (Marchenko *et al.*, 2000).

Dans ce contexte, le but de notre travail fut de déterminer les voies impliquées lors de l'apoptose mitochondriale initiée par la STS. Dans un premier temps, des molécules modulant spécifiquement l'activité de p53 (PRIMA-1 et PFT- α) nous ont permis de confirmer l'implication de p53 dans l'apoptose induite par la STS et d'évaluer l'utilisation de la STS et de ces nouvelles molécules modulant sur p53 en tant que nouvelle combinaison chimiothérapeutique. Par la suite, nous avons souhaité identifier les différentes protéines impliquées mises en jeu ainsi que leur mécanisme d'action. Nous avons montré que p53 influence la libération de la mitochondrie de deux facteurs apoptogènes, le cyt *c* impliqué dans la cascade des caspases et l'AIF impliquée dans la voie de mort médiée par PARP-1 et indépendante des caspases. De plus, ces deux voies ne sont pas activées au même moment selon le statut des lignées ($p53^{wt}$ vs $p53^{mt}$). La connaissance précise des cascades de mort impliquées lors de l'apoptose induite par la STS, notamment des différents partenaires clés est un prérequis nécessaire à l'élaboration et à la mise au point d'une nouvelle stratégie thérapeutique anti-cancéreuse efficace visant à stimuler la voie mitochondriale.

1. Publication n°1

Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin- α on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells

J.F. Charlot, M. Nicolier, J.L. Prétet and C. Mougin

2006, Apoptosis, 11: 813-27

PMID : 16554962

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/16554962?ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum

Ce travail a été présenté sous forme orale à :

- ✓ **XII° Forum des Jeunes Chercheurs 2006** : 8-9 juin 2006, Besançon, France : « Modulation de l'activité transcriptionnelle de p53 : Effets sur l'apoptose de cellules tumorales ». M. Nicolier, J.F. Charlot, J.S. Guerrini, J.L. Prétet, C. Mougin.
- ✓ **Société de Biologie de Besançon** : 8 décembre 2005, Besançon, France : « Apoptose p53 dépendante de cellules dérivées de cancer du col utérin : Aspects moléculaires et morphologiques ». J.F. Charlot, M. Nicolier, J.L. Prétet, C. Mougin.

Ce travail a été présenté sous forme affichée à :

- ✓ **23^d International Papillomavirus Conference** : 1-7 septembre 2006, Prague, République Tchèque : « Apoptosis of cervical carcinoma-derived cell lines : Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin- α . M. Nicolier, J.F. Charlot, J.L. Prétet, C. Mougin.
- ✓ **Cell Signaling World 2006** : 25-28 janvier 2006, Krichberg, Luxembourg : « Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin- α : effects on staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 cells ». M. Nicolier, J.F. Charlot, J.L. Prétet, C. Mougin.
- ✓ **American Association for Cancer research (AACR) 96th annual meeting** : 16-20 avril 2005, Anaheim, CA, USA: « Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin- α on staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 cells ». J.F. Charlot, M. Nicolier, J.L. Prétet, C. Mougin.
- ✓ **XI° Forum des Jeunes Chercheurs 2005** : 16-17 juin 2005, Dijon, France : « Effets des agents chimiques PRIMA-1 et Pifithrin- α sur l'activité transcriptionnelle de la protéine p53 impliquée dans l'apoptose induite par la staurosporine ». M. Nicolier, J.F. Charlot, J.L. Prétet, C. Mougin.

Introduction à la publication n°1

Les précédents travaux réalisés au laboratoire ont permis de mettre en évidence l'implication prépondérante de la protéine p53 et des mitochondries lors de l'apoptose induite par la STS dans des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus. Afin d'approfondir le rôle transcriptionnel et le rôle apoptotique indépendant de la transcription de la protéine p53, nous nous sommes intéressés à l'effet de la modulation de l'activité transcriptionnelle de p53 sur l'apoptose induite par la STS.

Dans un but thérapeutique, différents composés modulant l'activité de p53 ont été développés, notamment PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) (Bykov *et al.*, 2002b), molécule restaurant le domaine de liaison à l'ADN de p53 mutée à ce niveau en modifiant sa conformation tridimensionnelle. La fonction transcriptionnelle est donc réactivée. A l'inverse, pifithrine- α (PFT- α : p-fifty three inhibitor), (Komarov *et al.*, 1999) a été développée pour inhiber l'activité transcriptionnelle de p53 sauvage.

Les modulations de l'activité transcriptionnelle de p53 ont été observées par une analyse en western-blotting de l'expression de p53 et de certaines de ses protéines cibles, à savoir Bcl-2, p21 et Bax. L'analyse par cytométrie de flux de la dépolarisation de la membrane mitochondriale (marquage au MitoTracker Red) et de la fragmentation de l'ADN (marquage à l'iodure de propidium) permet de déterminer l'effet de ces modulations sur le processus apoptotique. Pour compléter ce travail, par microscopie à fluorescence, nous avons évalué l'impact de ces modulations sur la translocation à la mitochondrie de p53 au cours de l'apoptose. Ces différents événements ont été étudiés sur 5 lignées cellulaires : i) trois lignées abritant une p53 transcriptionnellement active, les lignées HeLa et CaSki (dérivant d'adénocarcinomes du col utérin humain, elles abritent une p53 sauvage (p53^{wt}) et abritent l'HPV18 et HPV16) et la lignée HaCat (kératinocytes immortalisés avec une p53 mutée dans les points chauds aux UV mais transcriptionnellement active) ; ii) une lignée abritant une p53 transcriptionnellement inactive, la lignée C-33A [dérivant de carcinome épidermoïde du col utérin humain abritant une p53 mutée au niveau de l'AA 273 (Arg273Cys)] et ; iii) une lignée p53 déficiente, la lignée SaOs-2 (dérivée d'un ostéosarcome).

Les cellules SaOs-2, dépourvues de p53, ont servi de témoins tout au long de ce travail. En effet aucune variation n'a été observée dans ces cellules et ce, quelque soit le traitement combiné à la STS.

Seules, PRIMA-1 et PFT- α ne modifient pas les taux d'expression des protéines p53, Bcl-2, p21 et Bax et n'induisent pas l'apoptose des différentes cellules.

L'addition de PRIMA-1 à la STS augmente la mort des cellules abritant une p53 mutée sur son domaine de liaison à l'ADN (cellules C-33A) (Figure 34). Ce phénomène se caractérise par une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2), une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bax, p21), une augmentation de la dépolarisation membranaire mitochondriale et de la fragmentation de l'ADN. Ce cotraitement conduit à une apoptose des cellules C-33A similaire à celle observée dans les cellules abritant une p53 transcriptionnellement active (cellules HeLa, CaSki et HaCat) et traitées par STS seule. Dans les autres lignées cellulaires, PRIMA-1 n'a aucun effet significatif sur l'apoptose induite par la STS.

Dans les cellules C-33A, l'ajout de PFT- α à la STS n'a aucun effet alors qu'elle induit une diminution partielle de la mort des cellules abritant une p53 transcriptionnellement active (HeLa, CaSki et HaCat) (Figure 34) caractérisée par : i) une augmentation de l'expression des protéines de survie (Bcl-2), ii) une diminution de l'expression des protéines de mort (Bax, p21), ainsi qu'une iii) diminution de la dépolarisation membranaire mitochondriale et de la fragmentation de l'ADN. Cette diminution conduit à une apoptose de ces cellules similaire à celle observée dans les cellules C-33A traitées par la STS seule. En effet, dépourvue de son activité transcriptionnelle, la protéine p53 peut néanmoins activer la voie apoptotique mitochondriale, même si cette voie est plus faible. Cette moindre efficacité peut s'expliquer par une translocation de p53 à la mitochondrie retardée (1 h vs $\frac{1}{2}$ h) (Charlot *et al.*, 2004). De plus, privées de l'activité transcriptionnelle de p53, les cellules C-33A expriment peu de Bax, protéine cible de p53. Or la protéine Bax est impliquée dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale, prérequis nécessaire à la libération de molécules apoptogènes de la mitochondrie au profit du cytosol. Ainsi, une protéine p53 mutée associée à une faible expression de Bax convergent en faveur d'une activité mitochondriale moins importante dans les cellules C-33A, apoptose pouvant être augmentée par PRIMA-1 jusqu'à atteindre le niveau d'apoptose observée dans des cellules abritant une protéine p53 transcriptionnellement active.

Dans un troisième temps, nous avons observé que la combinaison STS plus PFT- α plus PRIMA-1 entraîne des résultats similaires à ceux obtenus lors des bithérapies. En effet, PRIMA-1 ne modifie pas l'effet de PFT- α lors de l'apoptose induite par la STS de cellules abritant une p53 transcriptionnellement active (HeLa, CaSki, HaCat). A l'inverse, l'ajout de PFT- α n'altère pas l'augmentation de l'apoptose des cellules abritant une p53 mutée (cellules C-33A) due au traitement STS + PRIMA-1.

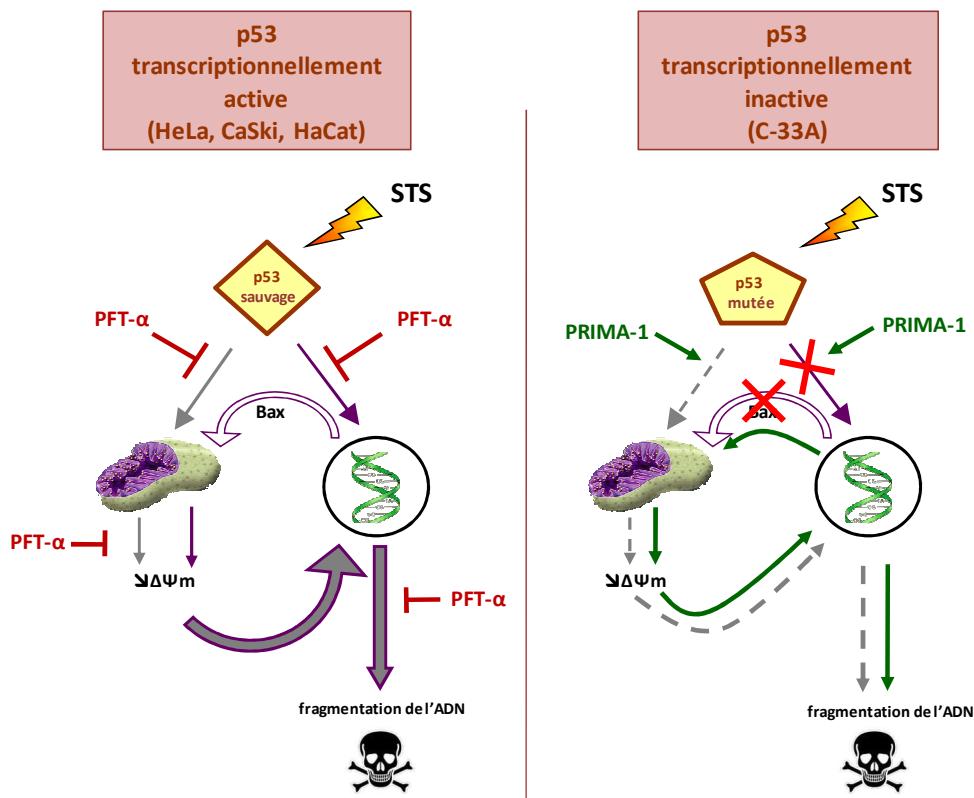


Figure 34 : Effets lors de l'apoptose induite par la STS de PFT- α sur les cellules présentant une p53 sauvage et de PRIMA-1 sur les cellules présentant une p53 mutée

Ce travail confirme l'implication de la protéine p53 lors de l'apoptose induite par la STS et ce, quelque soit son statut (transcriptionnellement active vs transcriptionnellement inactive). En effet, en modulant l'activité transcriptionnelle de p53, des répercussions ont été observées sur i) l'expression de gènes cibles impliqués dans l'apoptose (activation des gènes pro-apoptotiques, répression des gènes anti-apoptotiques), ii) la translocation de p53 à la mitochondrie, iii) la dépolarisation de la membrane mitochondriale, et enfin iv) la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN. Les deux molécules pharmacologiques utilisées, PFT- α et PRIMA-1, ont des effets spécifiques selon le statut de p53. En effet, PFT- α agit uniquement sur les protéines p53 transcriptionnellement actives. A l'inverse, PRIMA-1 affecte seulement les cellules abritant une p53 transcriptionnellement inactive. De plus, administrées ensemble, ces molécules gardent leur propriété. De part ces caractéristiques, ces molécules laissent entrevoir de nouvelles thérapies anticancéreuses prometteuses. En effet, la STS pourrait être administrée dans le traitement des tumeurs. La majorité des cancers est caractérisée par la présence d'une protéine p53 mutée, mutation affectant le plus souvent le domaine de liaison à l'ADN. Ainsi, afin de potentialiser l'effet de la STS, PRIMA-1 pourrait être administré conjointement. Cependant, ces traitements anti-cancéreux ne ciblent pas seulement les cellules tumorales mais affectent aussi les tissus sains avoisinant la tumeur. Dans ce contexte, PFT- α pourrait limiter les effets néfastes de la thérapie en limitant l'apoptose observée aussi au sein des tissus sains voisins, qui eux abritent une p53 transcriptionnellement active.



Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin- α on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells

J. F. Charlot, M. Nicolier, J. L. Pr  tet and C. Mougin

Université de Franche-Comté, UFR Médecine et Pharmacie, EA 3181, IFR 133, 19 rue Ambroise Par  , 25000 Besançon, France

Published online: 9 March 2006

We recently argued for a major role of p53 in staurosporine(ST)-induced apoptosis of immortalized epithelial cells, depending on their p53 status. Here, we studied the effects of PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) and Pifithrin- α (p fifty-three inhibitor) in combination with ST to reinforce our previous results by respectively restoring or inhibiting the p53 transcriptional activity in different cell lines.

PRIMA-1 does modify neither expression of apoptosis-related proteins nor the percentage of wild-type p53 HeLa and CaSki cells with $\Delta\Psi_m$ and DNA cleavage, whilst it increases by 45% Bax expression and apoptosis of mutated p53 C33A cells. Pifithrin- α , does modify neither Bax expression nor apoptosis level of C33A cells, but readily inhibits both $\Delta\Psi_m$ and DNA fragmentation of p53^{wt} cells with decreasing Bax expression. These data support the evidence that PRIMA-1 could be a good candidate, as an anti-cancer drug targeting mutant p53. In order to increase ST efficiency. Moreover, Pifithrin- α could be used in combination with ST and PRIMA-1 to prevent side effects of anti-tumor therapies in cells expressing mutant P53.

Keywords: apoptosis; mitochondrial depolarization; p53; pifithrin- α ; PRIMA-1.

Abbreviations: ST: staurosporine; PFT- α : pifithrin- α ; $\Delta\Psi_m$: mitochondrial membrane potential; $\Delta\Psi_m$: mitochondrial membrane depolarization; PBS: phosphate-buffered saline; wt: wild-type; mt: mutated; DBD: DNA binding domain; HPV: human papillomavirus.

Introduction

The tumor suppressor p53 is involved in response to various stress signals by triggering cell cycle arrest or initiating apoptosis to prevent tumor development and to respond to anti-cancer therapies.^{1,2} One mechanism by which p53 exerts these effects is by inducing the transcription of genes

like p21 and Bax. This transcription activity depends on the NH2-terminal transcriptional activation domain (amino-acids 1–42) and the central DNA-binding domain (amino-acids 120–290).³

Inactivation of p53 is a key event in carcinogenesis. In more than 50% of all human malignancies, p53 is mutated in the DNA-binding domain (DBD).⁴ However, some tumors can retain wild-type p53 (p53^{wt}), which is inactivated through upregulation of HDM-2 (human double minute-2).^{5,6} In addition, oncogenic viruses, such as mucosal human papillomavirus (HPV) can promote epithelial malignancies through HPV E6 expression which binds p53 and promotes its destruction by the ubiquitin-proteasome pathway.⁷

Based on the recognition of p53 dysfunction in the pathogenesis of human tumors, searches for compounds have been conducted to rescue p53 function with cell sensitivity to apoptosis. Thus, Bykov *et al.* recently identified a compound able to induce apoptosis of human SW480 colon carcinoma cells carrying endogenous His-273/Ser-309 mutant p53.⁸ This molecule, named PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis), restores the sequence-specific DNA binding and induce a conformational change of mutant p53 leading to transactivation of p53 target genes and apoptosis.^{8,9} However, PRIMA-1 has no effect on HCT-116 colon carcinoma cells carrying wild-type p53.⁸

Moreover, cancer therapies are not free of ill-fated secondary effects. Indeed, the role of p53 in cancer treatment is not limited to its involvement in killing tumour cells. This protein is highly expressed in several normal tissues damaged by anti-cancer therapy.^{10,11} That is why attempts to target human tumors without damaging the surrounding healthy cells have been explored. Thus, Komarov *et al.* identified a chemical inhibitor of p53 named Pifithrin- α (PFT- α) (p fifty-three inhibitor).¹² Such compound was successfully used in *in vitro* models to protect normal cells from otherwise lethal doses of chemo and radiotherapy.¹³ PFT- α was also shown to protect mice from lethal genotoxic stress associated with anticancer treatment without promoting tumor formation.¹² So, Komarova *et al.* have proposed that this compound could be used in

Correspondence to: C. Mougin, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CHU Jean Minjoz, 2 Boulevard, Fleming, Besançon Cedex 25030, France. Tel.: 333-8166-9111; Fax: 333-8166-8342; e-mail: christiane.mougin@ufo-chu.univ-fcomte.fr

tumours that lack functional p53, to avoid damages of the healthy neighbourhoods' tissues.¹³⁻¹⁵

In a recent publication, we have demonstrated a transient mitochondrial localization of p53 whatever its status is and a dispensable p53 transcriptional activity in the apoptotic process of immortal cells exposed to ST.¹⁶ However in C33A cells harbouring a p53 mutated on its DBD, $\Delta\Psi_m$ collapse and Sub-G1 DNA content were reduced compared to p53^{wt} HeLa and CaSki cells, whereas no significant difference was observed in HaCat cells with a p53 mutated on UV-hot spots. Furthermore p53 deficient SaOs-2 cells were the most resistant to ST-induced $\Delta\Psi_m$ dissipation.¹⁶ We focused here on the modulation of p53 transcriptional activity by testing PRIMA-1 that can reactivate the tumor suppressor function of mutated p53 and PFT- α that inhibits p53 DNA-binding activity. The effects of both compounds were measured in ST-treated immortalized cells by assessing expression of p53, p21, Bax and Bcl-2, mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation. PRIMA-1 was more effective in increasing death of mutated p53-carrying cell lines as compared with p53^{wt} carrying cell lines, while PFT- α protected p53^{wt} cells from ST-induced apoptosis.

Materials and methods

Cell lines

Five human cell lines, were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). HeLa and CaSki cells, derived from human cervical carcinomas, are HPV positive cells and their p53 status is of wild type (p53^{wt}). C33A cells, also derived from human cervical carcinoma, but are HPV negative and their p53 is not competent for transcription because of mutation on DBD (amino acid 273). Epidermal immortalized HaCat cells present a p53 mutated on UV hot spots, which is still able to regulate the transcription of its target genes.¹⁷ SaOs-2 cells, derived from osteosarcoma, are deficient in p53 and served as control. HeLa and CaSki cells were respectively cultured in EMEM (Bio Whittaker Europe, Verviers, France) and RPMI (Bio Whittaker) supplemented with 5% fetal bovine serum (Bio Whittaker) and 2 mM L-glutamine (Bio Whittaker). C33A cells were cultured in the same medium as HeLa cells supplemented with 5% sodium pyruvate (Sigma, St Louis, MO, USA). HaCat and SaOs-2 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 4 mM L-glutamine. All cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Cell treatments

Apoptosis induction: Staurosporine (ST) was obtained from Sigma and prepared as a 200 μ M stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO). Cells were seeded the day prior incubation with 300 nM ST during 24 h.

Modulation of apoptosis by PRIMA-1: PRIMA-1 (Tebu Bio, Le Perray en Yvelines, France) diluted in water was used at a 125 μ M final concentration.⁸ The five cell lines were cultured with PRIMA-1 for 24 h in presence or in absence of ST (Figure 1A).

Modulation of apoptosis by Pifithrin- α : PFT- α (Tebu Bio) diluted in DMSO was used at a 20 μ M final concentration as previously described.¹² The five cell lines were pre-treated with 20 μ M PFT- α for 12 h. Then a subset of culture was treated with PFT- α plus ST for 24 h. Cultures treated with PFT- α alone were run in parallel (Figure 1B).

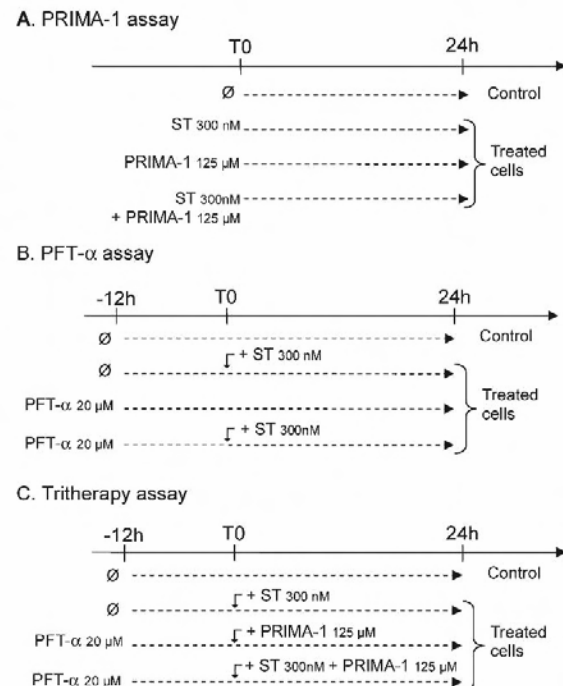
Tritherapy experiments: The five cell lines were pre-treated for 12 h with 20 μ M PFT- α prior incubation for 24 h with PFT- α plus PRIMA-1 in presence or in absence of ST (Figure 1C).

At the end of the experiments, cells were harvested by trypsinization and processed for analysis of mitochondrial depolarization and sub-G1 DNA by flow cytometry. Analysis of protein expression was performed by western-blotting. The experimental conditions were repeated at least 3 times.

Flow cytometry

At the indicated periods, cells were washed twice with PBS, harvested by trypsinization (Bio Whittaker), washed again twice with PBS and centrifuged at 700 g for 10 min.

Figure 1. Treatment procedures.



For measurement of mitochondrial $\Delta\psi_m$, a batch of cells was resuspended in 200 nM MitoTrackerRed CMXRos (Molecular Probes Europe) diluted in the appropriate culture medium according to the cell type and incubated at 37°C for 30 min. Then, cells were washed with PBS, centrifuged and resuspended in 400 μ l of PBS for flow cytometry analysis. The percentage of cells with depolarized mitochondria was then calculated.

For Sub-G1 DNA content analysis, another batch of cells was resuspended and fixed overnight with 70% (v/v) cold ethanol. Fixed cells were washed 3 times with cold PBS before the addition of 1 mg/ml RNaseA DNase-free (Sigma) for 10 min and 10 μ g/ml propidium iodide (Sigma) for 30 min. The percentage of cells with Sub-G1 DNA was calculated.

Cells were analyzed on a FACScan Epics® Altra flow cytometer (FACScalibur Becton Dickinson, Beckman Coulter, Miami, FL, USA). A minimum of 10 000 events was collected for each sample. The analyses performed on a gated cell population in order to discard cellular debris, were conducted using the expo-32 software (Beckman Coulter).

Western-blotting

Proteins were extracted from treated and untreated whole cells by sonication for 3 \times 10 s on ice. Twenty-five microliters of lysate were used to quantify the total protein by BCA Protein Assay® (Pierce, Rockford, USA) according to the manufacturer's instructions. Ten micrograms of total cell lysates were boiled in 25 μ l of protein loading buffer (60 μ M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.002% bromophenol) for 10 min. Then, lysates were run on SDS-PAGE gel. The proteins were transferred onto Hybond™-P membranes (Amersham, Saclay, France) and immunoblotted with primary antibodies against p53 (clone DO-1; PharMingen, San Diego, CA), p21^{WAF1} (clone 6B6; PharMingen), Bax (clone 6A7; Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands), Bcl-2 (clone 4D7; PharMingen) and actin (clone Ac15; Sigma). Blots were then rinsed and incubated with anti-mouse immunoglobulin conjugated with horseradish peroxidase (PharMingen). Immune complexes were highlighted using the ECL plus reagents (Amersham) and finally quantified using a Gel Doc 1000® and a multianalyst software.

Immunocytochemistry studies

Immunocytochemistry was performed as we previously described in detail.¹⁶ Briefly, cells were fixed and permeabilized with cold acetone/methanol (1:1) for 3 min. They were then incubated for 1h either with anti-p53 (1:200; clone DO-7, PharMingen, San Diego, CA) or anti-Bax (1:200; clone 3, PharMingen) and washed 3 times before the addition of a secondary TRITC-conjugated goat anti-mouse an-

tibody (1:100; DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Cells were finally incubated for 30 min with 1 μ M Nonyl Acridine Orange (NAO) (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) and 1 μ g/ml Hoechst's stain (Hoechst 33342; Molecular Probes Europe) for mitochondria and DNA labelling respectively. They were observed under an Olympus BX51 fluorescence microscope. Pictures were captured using the Olympus DP50 numeric camera and processed with the Analysis software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Results

PRIMA-1 restores the transcriptional activity of p53^{mt} C33A cells under ST treatment

Our first set of experiments was designed to measure levels of p53 and p53 responsive gene products in the five cell lines following ST exposure. Next we addressed the question whether PRIMA-1 was able to restore the transcriptional activity of mutated p53. Cells were exposed to PRIMA-1 alone, ST alone or both compounds.

As shown in Figure 2 western blot analysis showed that p53 and both target gene products, p21 and Bax were found at higher levels in HeLa, CaSki and HaCar cells under ST exposure compared with untreated cells. As expected, expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 was reduced after ST treatment, confirming our previous data.¹⁸ PRIMA-1 alone or in combination with ST did not influence the levels of p53, p21 Bax and Bcl-2.

In C33A cells carrying a p53 mutated on its DBD, PRIMA-1 or ST had no effect on basal expression of p53 and its target genes. By contrast, their combination gave rise to increase in p21 and Bax levels and decrease in Bcl-2 level without modifying p53 expression level.

Unexpectedly a Bax accumulation was observed in p53 null SaOs-2 cells in presence of ST. This increase in Bax expression could be attributed to the p53's homologue p73 which is expressed in SaOs-2 cells¹⁹ and has the ability to promotes cell death via Bax and PUMA transactivation.²⁰ Administration of PRIMA-1 along with ST did not influence the Bax expression in this cell line.

PRIMA-1 increases $\Delta\psi_m$ dissipation and DNA fragmentation during ST-induced apoptosis of C33A cells

Because Bax is a pro-apoptotic protein which can ensure the induction of mitochondrial depolarization, we next investigated the effects of PRIMA-1 on $\Delta\psi_m$ dissipation and DNA fragmentation of cells treated or not by ST.

Cells undergoing mitochondrial depolarization and fragmented DNA revealed by the Sub-G1 DNA content were quantified by flow cytometry and results were expressed as the percentage of the global cell population as described in detail previously.¹⁶ As shown in Figure 3A, the five cell lines

treated with PRIMA-1 alone exhibited no change in $\Delta\psi_m$ dissipation and DNA fragmentation, as compared with untreated cells. Moreover PRIMA-1 was unable to efficiently modulate ST-induced apoptosis of p53^{wt} HeLa and CaSki cells or SaOs-2 cells deficient in p53. In HaCat cells, the combination of PRIMA-1 and ST was associated with a slight enhanced cell death as compared with ST-induced death. On the other hand, ST-induced apoptosis of C33A cells, harbouring a transcriptionally inactive p53, was greatly enhanced by PRIMA-1. Indeed, as shown in Figure 3B, $\Delta\psi_m$ dissipation and DNA fragmentation of C33A cells were in-

creased by about 30% and 45% respectively after targeting p53 with PRIMA-1.

These observations confirm the ability of PRIMA-1 to restore the apoptotic function of mutated p53.

Pifithrin- α inhibits ST-induced expression of p53 target genes in transcriptionally active p53 cells

PFT- α has been demonstrated to inhibit the transcriptional activity of p53 and apoptosis.¹² In order to investigate whether or not the ST-induced apoptotic response is

Figure 2. Effect of PRIMA-1 on the expression of apoptosis-related proteins. Western blot analyses were performed to characterize the level of p53, p21, Bax and Bcl-2 proteins. The five cell lines were incubated for 24 h with 125 μ M PRIMA-1 and/or 300 nM ST. On the left side, ten micrograms of proteins were resolved on 10% SDS-PAGE gel. After transfer, nitrocellulose membranes were incubated with primary monoclonal antibodies raised against p53, p21, Bax and Bcl-2, and a secondary HRP-conjugated anti-mouse IgG (as described in Material and methods). To control for protein loading, the blots were also probed with an anti-body specific for actin. On the right side, densitometric analyses of p53, p21, Bax and Bcl-2 expression in untreated (black columns) and treated cells (grey columns: PRIMA-1; dashed columns: ST; dotted columns: ST plus PRIMA-1). All values were standardized against actine. Data are representative of 3 independent experiments. *: densitometric analysis not applicable

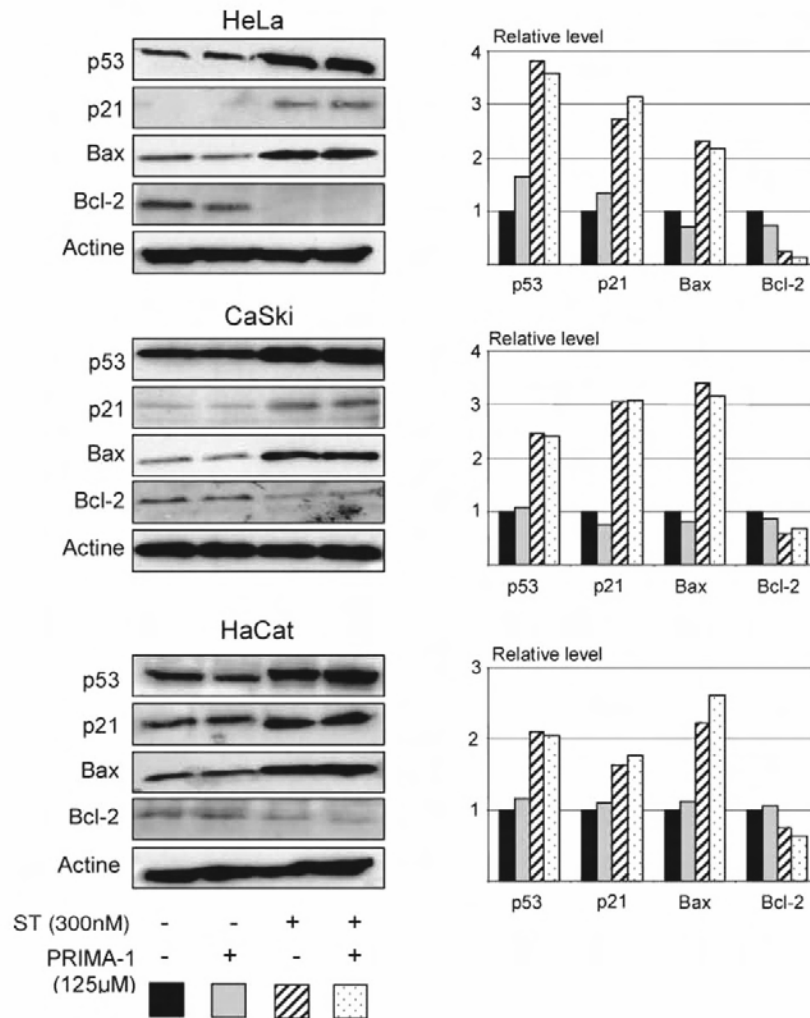
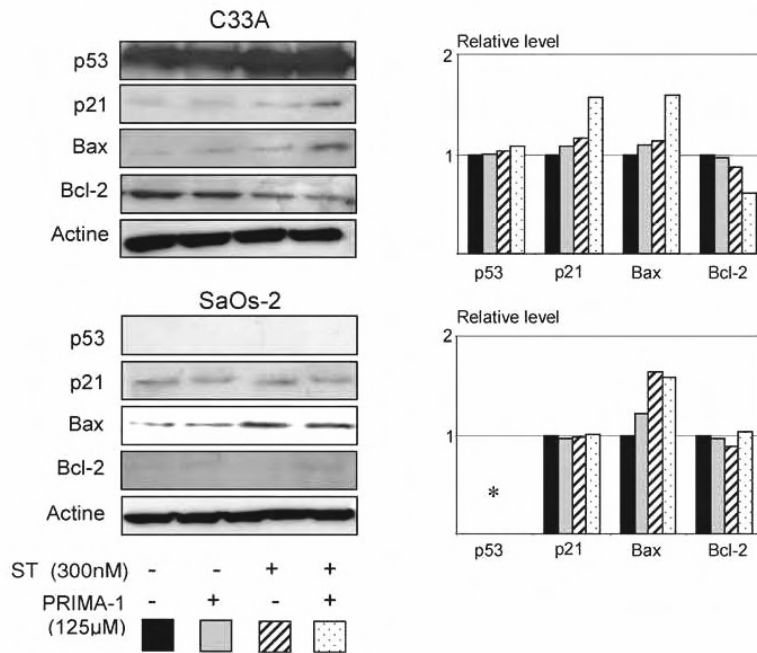


Figure 2. continued.



dependent or independent of the transactivation potential of p53, we tested PFT- α alone or in combination with ST. In preliminary experiments cell treatment with PFT- α at the time of ST exposure resulted in modest changes. We therefore examined efficiency of a pre-treatment with PFT- α and the most convincing results were obtained when PFT- α was added 12 h prior ST exposure.

As shown in Figure 4, PFT- α alone did not modify p53, p21 and Bax expression in the five cell lines compared with untreated cells, indicating that the chosen concentration of PFT- α had no adverse effect on cell survival. As above, p53, p21 and Bax proteins were overexpressed, whilst Bcl-2 was downregulated in HeLa, CaSki and HaCat cells upon ST exposure. PFT- α did not affect ST-induced increase in p53 but efficiently restored the basal level of Bcl-2 and partially inhibited the ST-induced expression of p21 and Bax, suggesting that PFT- α reduced the transcriptional activity of p53. Not surprisingly, both C33A cells with a transcriptionally inactive p53 and p53^{-/-} SaOs-2 cells treated with ST in absence or presence of PFT- α did not show any significant change in protein expressions, at the exception of Bax in p53^{-/-} cells.

Pifithrin- α partially inhibits ST-induced apoptosis of transcriptionally active p53 cells

The results described above led us to investigate the effects of PFT- α on $\Delta\psi_m$ dissipation and DNA fragmentation of cells exposed to ST.

Whether PFT- α alone had no significant effect on the five cell lines, it efficiently reduced the ST-induced apoptosis of p53^{wt} HeLa and CaSki cells. As shown in Figure 5A, a 24-h exposure to ST gave rise to 70–75% of cells with depolarized mitochondria and to 60–65% of cells with fragmented DNA. Administration of PFT- α along with ST reduced by about 25–30% the number of cells with $\Delta\psi_m$ collapse and sub-G1 DNA content (Figure 5B). This altered apoptotic response to ST in cells exposed to PFT- α could be attributed to the impaired Bax/Bcl-2 ratio.^{21–23}

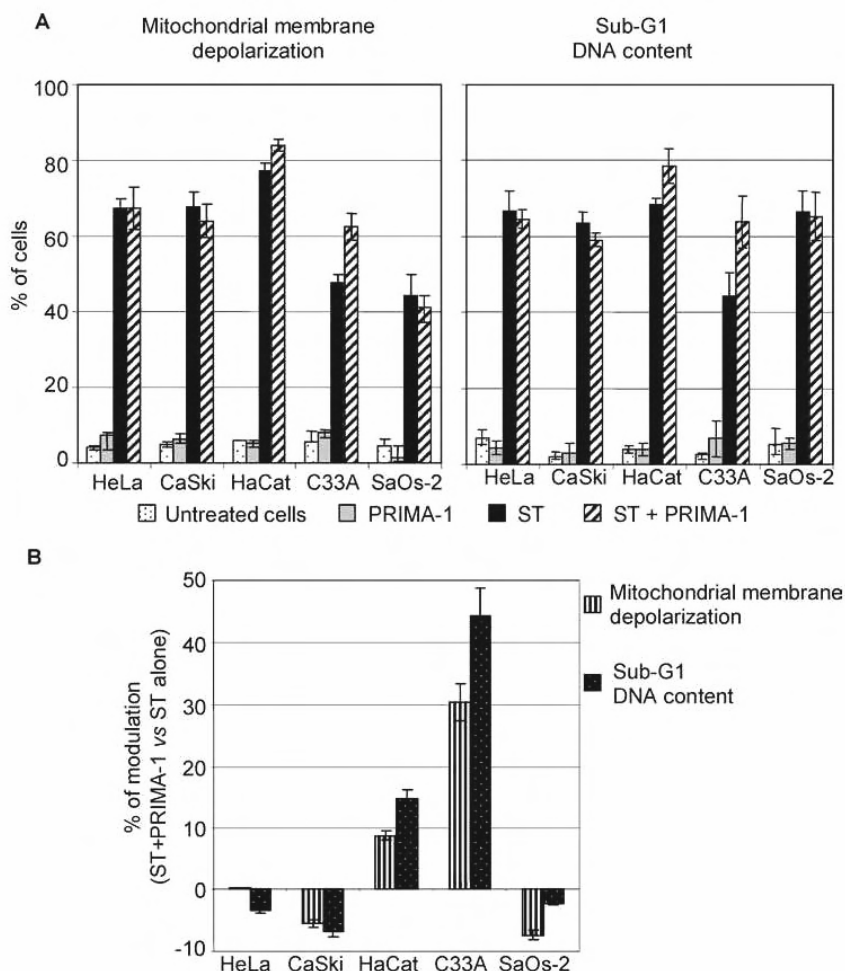
In HaCat cells, the variations in Bax and Bcl-2 protein levels were of the same extent than those observed in p53^{wt} cells, whilst the mitochondrial depolarization and the DNA fragmentation were weakly reduced following PFT- α and ST cotreatment.

On the other hand, PFT- α had a insignificant effect on the apoptotic response induced by ST in p53 mutated C33A cells and no effect in p53^{-/-} SaOs-2 cells (Figure 5A and B).

ST-induced mitochondrial p53 accumulation in C33A cells and HeLa cells is modulated by PRIMA-1 and PFT- α respectively

In a previous paper, we demonstrated an early mitochondrial localisation of p53, during ST-induced apoptosis of epithelial cells, whatever the p53 status is (wt or mt). However a delay for p53 translocation was observed in p53^{mt} C33A cells compared with p53^{wt} HeLa. Regarding to these data and the present ones, we raised the question whether

Figure 3. Reactivation of mutant p53 by PRIMA-1 increases ST-induced mitochondrial depolarization and DNA fragmentation in C33A cells. (A): The five cell lines were not treated (dotted columns) or incubated for 24 h in presence of 125 μ M PRIMA-1 (grey columns), 300 nM ST (black columns), ST plus PRIMA-1 (dashed columns). A batch of cells was resuspended in MitoTrackerRed and another one in propidium iodide for analysis by flow cytometry (as described in Material and methods) to appreciate the percentage of cells with depolarized mitochondria (left panel) and with a sub-G1 DNA content (right panel). C33A cells (p53 mutated on the DNA-binding domain) treated with both ST and PRIMA-1 exhibit an increase of the mitochondrial depolarization, compared to cells treated with ST alone. This process is accompanied by an increase in the DNA fragmentation. PRIMA-1 alone has no effect. (B): In order to compare the behaviour of the different cell lines, results were also expressed as the percentage of mitochondrial depolarization and Sub-G1 content changes for cells treated with ST plus PRIMA-1 compared to cells treated with ST alone. Results are representative of 3 independent experiments with error bars representing s.d.



modulators of p53 transcriptional activity were able to modify the kinetics of p53 translocation. Thus, we next performed immunofluorescence microscopy on C33A cells treated by ST alone or in combination with PRIMA-1 and on HeLa cells treated by ST alone or in combination with PFT- α . A time course study of Bax mitochondrial accumulation was also performed. Finally apoptosis was confirmed by Hoechst staining.

As shown in Figure 6A and C, p53 staining revealed an exclusively nuclear localization in untreated cells. As previously observed, a mitochondrial p53 localization was de-

tected at 60 min and 30 min poststaurosporine exposure in C33A cells and HeLa cells respectively, as indicated by superimposable patterns obtained with p53 antibody and NAO stained cells (arrow heads). Marked exclusive nuclear p53 accumulation became prominent after 12 h of ST treatment and the majority of C33A cells and HeLa cells underwent apoptosis, as indicated by Hoechst staining (arrows).

As shown in Figure 6B, shortly after ST plus PRIMA-1 treatment, C33A cells exhibited an intense and diffuse p53 mitochondrial accumulation compared to the restricted perinuclear signal observed in cells treated only by ST. On the

other hand, the mitochondrial translocation of p53 which was detectable as early as 30 min in HeLa cells after ST, was delayed when PFT- α was added to the culture medium (Figure 6D). In light of our present observation, it appears possible that both PRIMA-1 and PFT- α , could modulate the mitochondrial p53 transcription-independent pro-apoptotic activity. Co-immunoprecipitation or pull-down experiments to study interactions of p53 through its DBD with Bcl-2 and Bcl- α , would enable to understand the contribution of these new compounds on p53 mitochondrial activity.

Using immunofluorescence with an antibody specific for Bax, we confirmed that Bax was colocalized to the mitochondria in C33A and HeLa cells (data not shown). Bax was readily observed as soon as 30 min poststaurosporine treatment and the signal intensity increased with time exposure. The labelling was less in C33A cells than in HeLa cells but it clearly increased in presence of PRIMA-1, confirming the western-blot data. This set of experiment also demonstrated a decline in Bax levels in p53^{wt} HeLa cells exposed to ST plus PFT- α compared to ST alone.

Figure 4. Effect of Pifithrin- α on the expression of apoptosis-related proteins. Cell lines pre-treated or not for 12h with 20 μ M PFT- α were cultured for a 24 h supplementary period in presence or in absence of ST (as indicated in Figure 1). On the left side, ten micrograms of proteins were loaded and separated on a 10% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated with primary monoclonal antibodies raised against p53, p21, Bax and Bcl-2 and a secondary HRP-conjugated anti-mouse IgG (as described in Material and methods). To control for protein loading, the blots were also probed with an anti-body specific for actine. On the right side, densitometric analyses of p53, p21, Bax and Bcl-2 expression in untreated (black columns) and treated cells (grey columns: PRIMA-1; dashed columns: ST; dotted columns: ST plus PRIMA-1). All values were standardized against actine. Data are representative of 3 independent experiments. *: densitometric analysis not applicable.

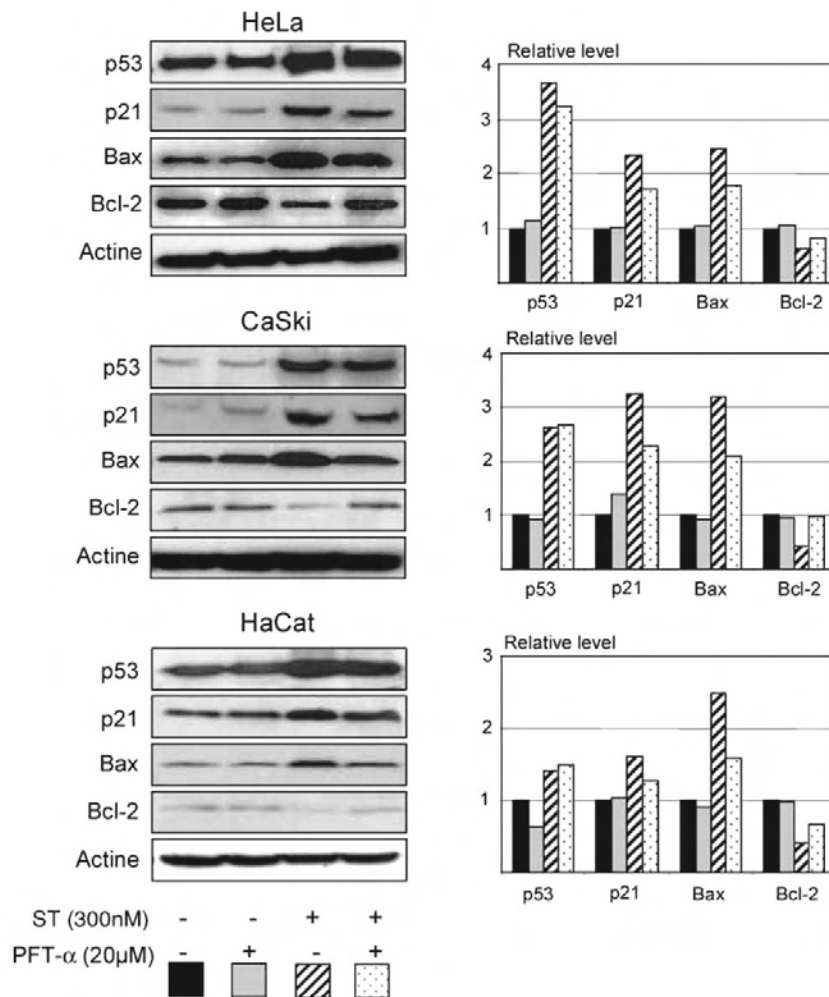
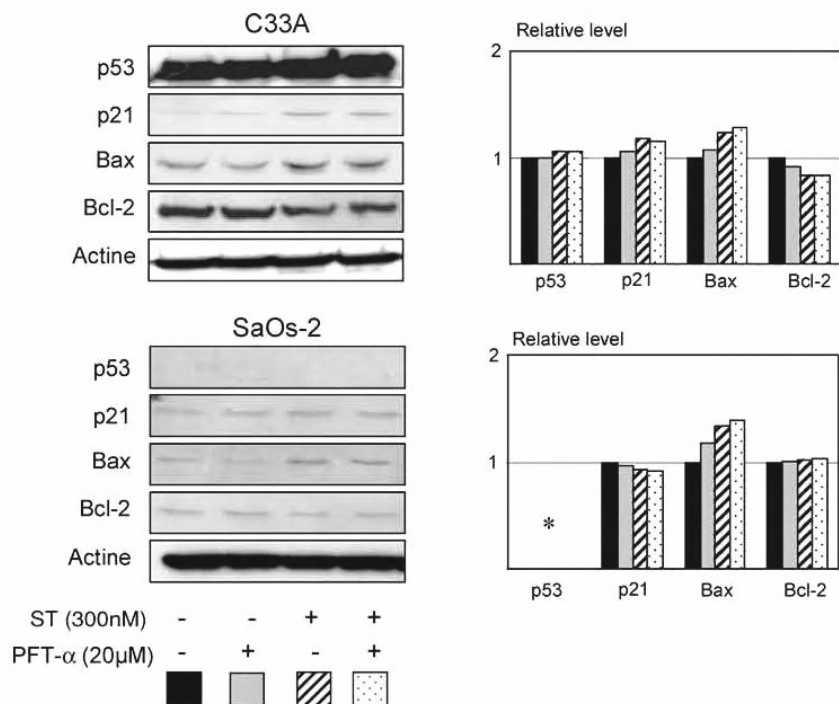


Figure 4. continued.



PRIMA-1 does not abrogate the effects of Pifithrin- α and vice versa

Since PRIMA-1 restores the transcriptional activity of p53 and PFT- α inhibits it, we wondered whether cells with a mutated p53 reactivated by PRIMA-1 were sensitive to PFT- α . As in PRIMA-1 assay, C33A cells exposed to ST plus PRIMA-1 plus PFT- α , demonstrated an increase in both mitochondrial depolarization and DNA fragmentation compared to cells exposed to ST alone, with however a lower extend (Figure 6). On the other hand, the ST-induced apoptosis of HeLa and CaSki cells was still inhibited by PFT- α despite the presence of PRIMA-1. Taken together these results argue for the absence of reverse effects of PRIMA-1 and PFT- α in our models. Interestingly, HaCat cells, harbouring a mutated but transcriptionally active p53, responded to both compounds when studied separately (Figures 3B and 5B), suggesting that a mutated but transcriptionally active p53 may be sensitive to PRIMA-1 and PFT- α ; the tritherapy bended however in favour of the PFT- α activity with a reduced death compared to ST-induced apoptosis (Figure 6).

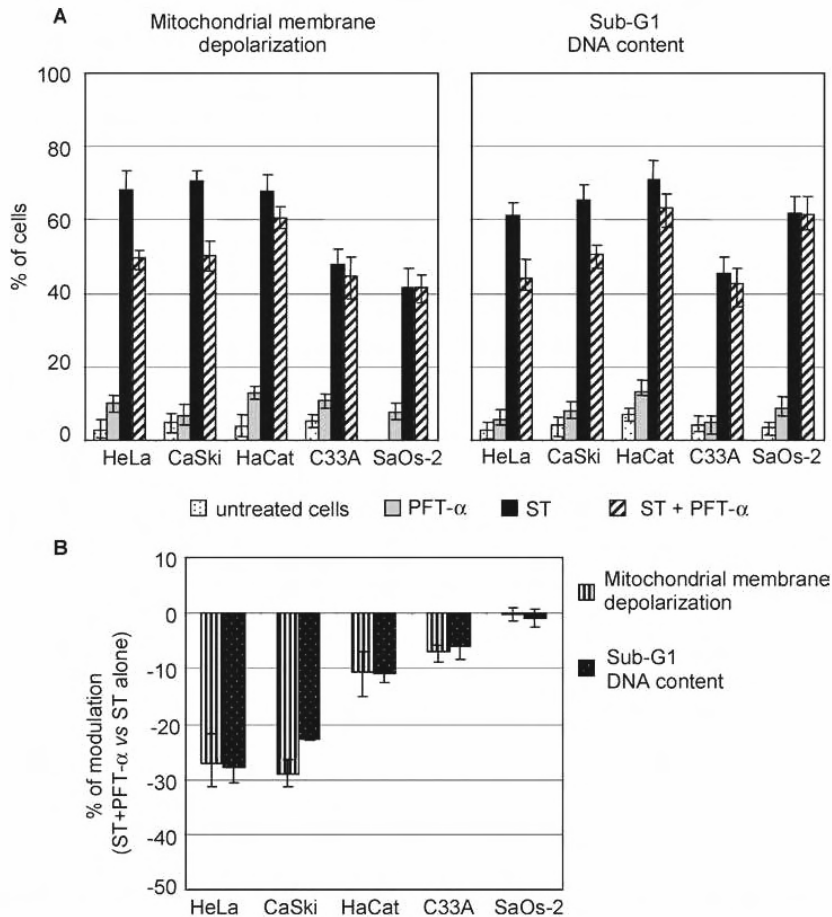
Discussion

In a previous report, we have shown that staurosporine-induced apoptosis of immortalized epithelial cell lines was

dependent of p53 status.¹⁶ Indeed, C33A cells, harbouring a R273C mutation in the p53 gene, were strongly less sensitive to ST-induced $\Delta\psi_m$ dissipation and DNA fragmentation compared to HeLa and CaSki cells harbouring a wild-type p53. HaCat cells with a mutated but transcriptionally active p53,²⁴ behaved similarly as p53^{wt} cells. We have also shown that wild-type p53, as well as p53 mutants were transiently localized to mitochondria, suggesting that p53 mitochondrial translocation may play a pivotal role in ST-induced apoptosis.¹⁶ We report here that PRIMA-1 increases the sensitivity to ST of tumor cells carrying mutant p53 with an activation of p53 functions, while PFT- α impairs ST-induced apoptosis of p53^{wt} tumor cells with a reduction of p53 activities.

Like in C33A cells, p53 is frequently inactivated by mutation in human cancer cells. Most of the time, mutations are located in the DNA binding domain, abrogating p53 transcriptional activity.²⁵⁻²⁷ Moreover, tumors carrying mutant p53 are often resistant to conventional cancer therapies.^{28,29} To eliminate such tumor cells, Bykov *et al.* have recently identified and used PRIMA-1, a low molecular compound able to trigger massive apoptosis *via* restoration of wild-type function to mutant p53.^{8,9,30,31} In the present study, PRIMA-1 at a final concentration of 125 μ M did not induce apoptosis of any tested cell lines, while Bykov *et al.* demonstrated that such a concentration was efficient to induce cell death of SaOs-2 cells transfected with a plasmid

Figure 5. Inhibition of p53 transcriptional activity by Pifithrin- α reduces ST-induced mitochondrial depolarization and DNA fragmentation in transcriptionally active p53 epithelial cells. (A): Cell lines were untreated (dotted columns) or treated by 20 μ M PFT- α (grey columns), 300 nM ST (black columns), or ST plus PFT- α (dashed columns). A batch of cells was resuspended in MitoTrackerRed and another one in propidium iodide for analysis by flow cytometry (as described in Material and Methods) to appreciate the percentage of cells with depolarized mitochondria (left panel) and with a sub-G1 DNA content (right panel). HeLa, CaSki and HaCat cells treated with both ST and PFT- α exhibit a decrease of the mitochondrial depolarization and DNA fragmentation, compared to cells treated with ST alone. No significant effect was observed in C33A (p53 mutated on the DNA-binding domain) and p53 null SaOs-2 cells. PFT- α alone has no effect. (B): In order to compare the behaviour of the different cell lines, results were also expressed as the percentage of mitochondrial depolarization and Sub-G1 content changes for cells treated with ST plus PFT- α compared to cells treated with ST alone. Results are representative of 3 independent experiments with error bars representing s.d.



encoding His-273 p53 mutant. But when tested in combination with ST, PRIMA-1 increased ST-induced death of C33A cells known to be defective for p53 transactivation function. The Human checkpoint kinase 1 (Chk1) might contribute to the effect of PRIMA-1 in our ST experiments. Indeed, it has been recently shown that UCN-01 (7-hydroxystaurosporine), a ST homologue, inhibits Chk1 leading to phosphorylation of ATR targets including p53, which is phosphorylated on serine 15.³² Such p53 phosphorylation increases p53 stability, DNA binding and gain of function³³ Moreover, UCN-01 was shown to increase p38 MAPK,³⁴ a kinase which activates phosphorylation of p53 on serine 46, 389 and 15 and constitutes a critical step

for p53-induced apoptosis.³⁵⁻³⁸ Thus, we may raise the hypothesis that even if p53 wild type spatial conformation is restored by PRIMA-1, its phosphorylation subsequently to the adjunction of ST appears necessary for apoptosis induction in our C33A model. However, we cannot exclude that the used concentration of PRIMA-1, in absence of ST, is not relevant to induce death of those cells.

Whether PRIMA-1 was already shown to have a mutant selective effect on lung and colon carcinoma lines, we confirm here the ability of this new compound to act on p53 mutant cervical carcinoma lines. The western blot and flow cytometry analyses provided clues as to possible mechanism of C33A cell response to PRIMA-1 and ST combination. Our

Figure 6. Immunofluorescence microscopy showing mitochondrial translocation of p53 in C33A cells upon ST alone (A) or in combination with PRIMA-1 (B), and in HeLa cells upon ST alone (C) or in combination with PFT- α (D). Cells were stained at the indicated times with anti-p53 DO-7 antibody, nonyl acridine orange (NAO) which binds to mitochondria and Hoechst 33342. They were examined under fluorescence microscopy at X400 magnification. Merge images were generated by superimposing coloured images of p53 (red), mitochondria (green) and DNA (blue). (A) C33A cells exhibit an overlay of green and red fluorescences (superimposed image as yellow, arrowheads) from 1h to 6h, representing the mitochondrial localization of p53 as previously observed (charlot et al., 2004). (B) The addition of PRIMA-1 to ST favours p53 translocation. Indeed, after 1h of ST alone exposure a part of the mitochondrial population, at the cellular periphery, remains green in the merge picture whereas most mitochondrias appear yellow under ST and PRIMA-1 exposure. (C) HeLa cells exhibit mitochondrial translocation of p53 (overlay of green and red fluorescences; superposed image as yellow; arrowheads) from 30 min to 6 h following ST exposure. (D) The addition of PFT- α to ST delays the p53 mitochondrial translocation, which occurs 30 min later. In each plate, arrows point the DNA cleavage.

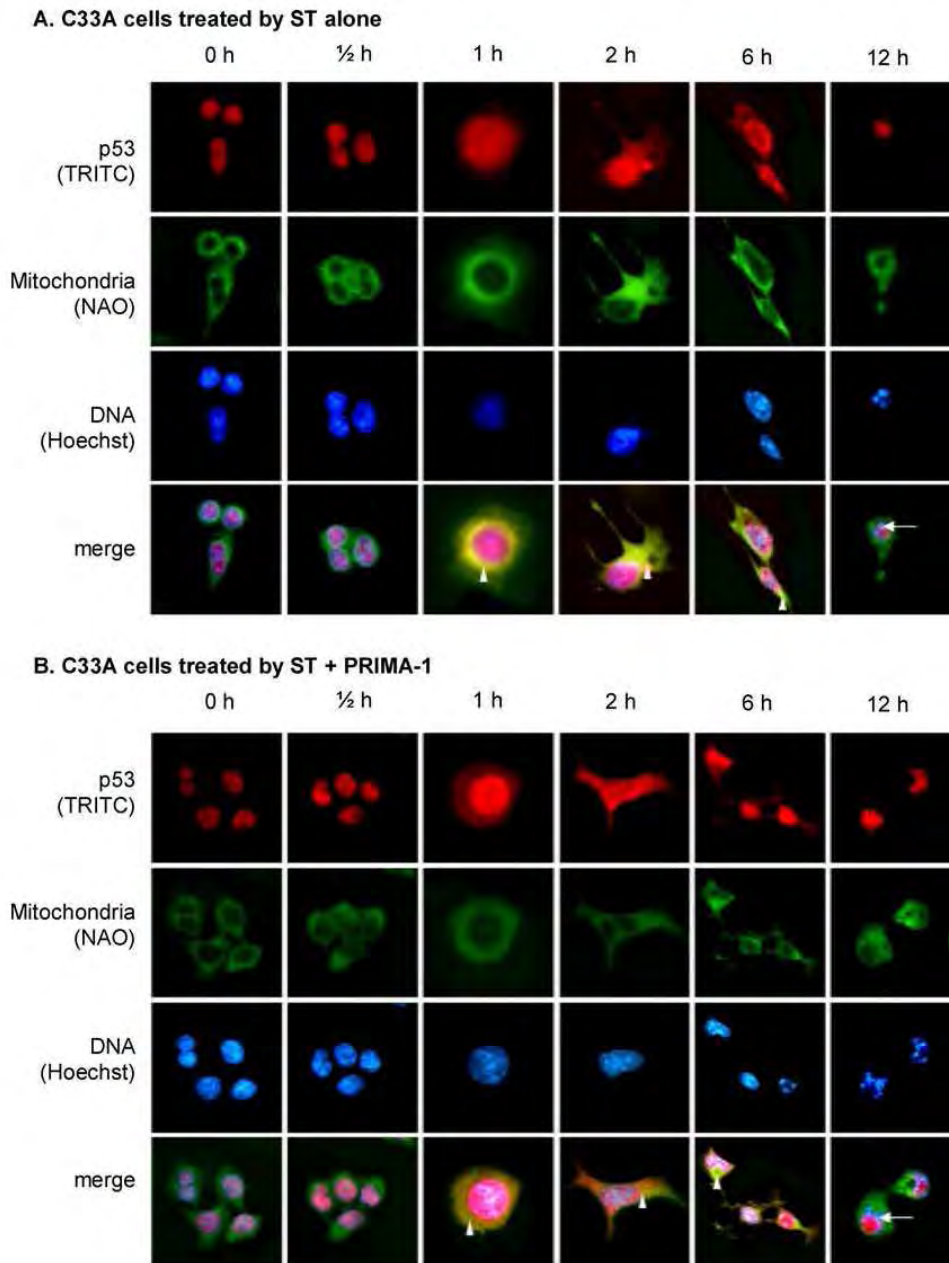
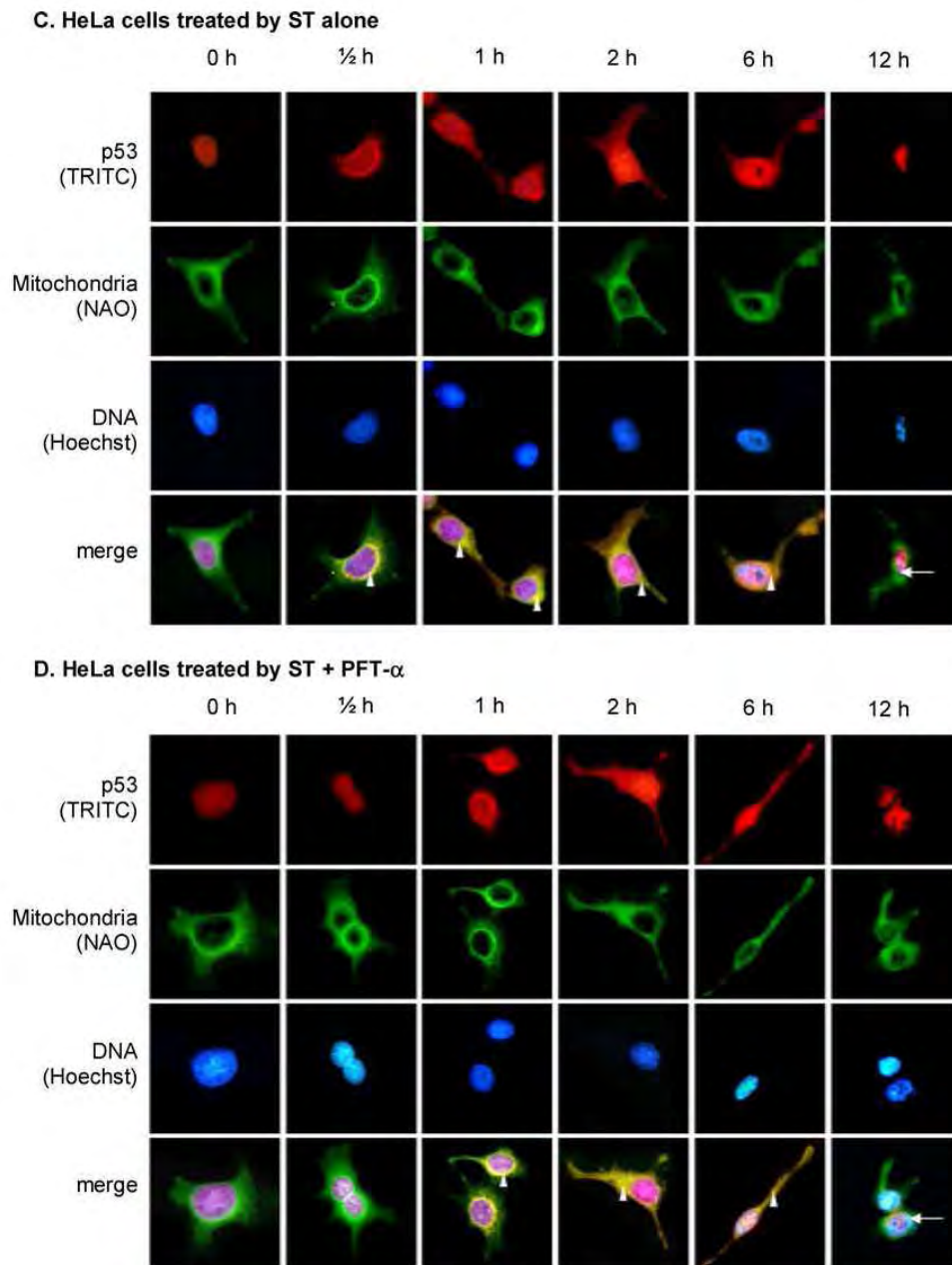


Figure 6. continued.

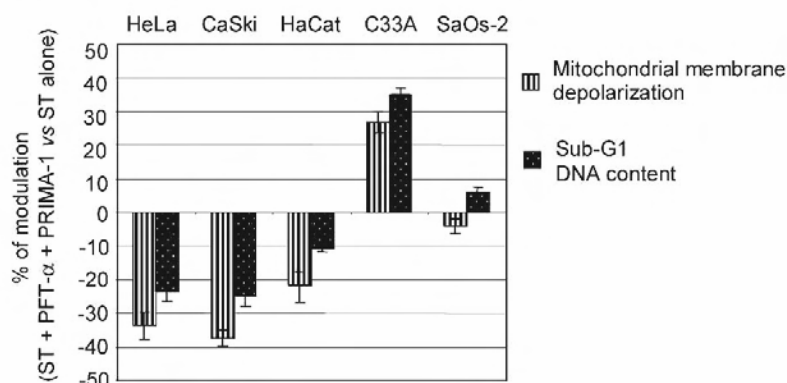


findings indicates that PRIMA-1 reactivated p53 without generating higher levels of this protein, which corroborates the hypothesis raised by Bykov *et al.*⁸ Indeed, It has been shown that *de novo* protein synthesis is not required for the effects of PRIMA-1.⁸ This molecule will force already accumulated unfolded mutant p53 to adopt a properly folded active conformation but will not induce p53 accumulation

because MDM2 overexpression.⁸ On the other hand, the cotreatment favored transcription activation of proapoptotic target genes such as Bax and repression of prosurvival proteins such as Bcl-2.

Adams and Cory have identified the Bcl-2 family proteins as key players in the mitochondrial disruption.³⁹ During ST-induced apoptosis, Bax is translocated from the cytosol

Figure 7. No reverse effects of PRIMA-1 and PFT- α . Cell lines were either treated with ST alone or ST plus PFT- α plus PRIMA-1 (as depicted in Figure 1). In order to compare the behaviour of the different cell lines, results are expressed as the percentage of mitochondrial depolarization and Sub-G1 content changes for cells under tritherapy compared to cells treated with ST alone. Results are representative of 3 independent experiments with error bars representing s.d.



to the mitochondria leading to disruption of the permeability transition and release of apoptogenic factors.⁴⁰ It is likely that the upregulated Bax, as observed in western blot and immunocytochemistry analyses, may participate to the increase in $\Delta\Psi_m$ dissipation and subsequently to the enhanced DNA fragmentation of C33A cells in the combined presence of PRIMA-1 and ST. Interestingly, mutant p53 of which wild type conformation was restored by PRIMA-1, seems to have a better ability to translocate to the mitochondria where it could bind Bcl-xL, Bax or Bak proteins to activate, with the contribution of PUMA,⁴¹ the pro-apoptotic activity of Bax and Bak.⁴²⁻⁴⁹ Thus, p53 might mediate apoptosis through both transcriptional and mitochondrial transcriptional independent activities. The latter activity appears to be a crucial event in anti-cancer therapies. Indeed, Erster *et al.* have recently shown that the mitochondrial p53 pathway participates in the p53 death program of radiosensitive but not radioresistant organs and may be one of the distinguishing features for the organ sensitivity upon radiotherapy.^{50,51} Finally, the reactivation of p53 activities triggered an increased percentage of apoptotic C33A cells reaching the percentage of apoptotic p53^{wt} HeLa and CaSki cells exposed to ST alone.

Since PFT- α , a small molecule identified as an inhibitor of p53 transcriptional activity, protects against the toxic side effects of anticancer treatment to the normal tissues, it holds promise for clinical studies.¹²⁻¹⁵ Here, PFT- α at a 20 μ M final concentration had no effect on the five cell lines. When used in combination with ST, PFT- α significantly decreased apoptosis of cells with a transcriptionally active p53 but had no effect on mutant p53 C33A cells or p53 deficient cells. Protective effect of PFT- α was already tested in many cell lines. It was shown that PFT- α was not efficient in mutated p53 SK-N-BE neuroblastoma cell line⁵² and in p53 null NH32 lymphoblastoid cell line⁵³ while it decreased apoptosis in wild type p53 SIN-KP neuroblastoma cell line.⁵² The observed effect of PFT- α can be related

to the suppressed transactivation of p53-responsive genes. This possibility is supported here by the decrease of p21 and Bax levels and the increase in Bcl-2 in HeLa, CaSki and HaCat cells, which is consistent with previous studies.⁵⁴⁻⁵⁷ Recent data showed that PFT- α efficiently prevented phosphorylation and activation of p38 which was associated with a blockage of p53 phosphorylation and apoptosis of rat liver epithelial cells exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (Andrysik toxicol and Appl pharmacol 2005 in press). Moreover, Komarova *et al.* led the hypothesis that PFT- α might modulate the nuclear import of p53 *via* inhibiting the chaperone machinery or decreasing the stability of nuclear p53.⁵⁸ However, other data suggested that PFT- α might inhibit p53 signaling by acting some stage after p53 transfer to the nucleus.⁵⁹ Our data are partly in agreement with this last hypothesis. As observed in our immunocytochemistry studies, p53 later moved to the mitochondria but its access to the nucleus was not prevented in presence of PFT- α . In this context, previous data have reported that PFT- α inhibited p53 mitochondrial translocation during apoptosis of tubular epithelial cells depleted in GTP or treated by actinomycin A.^{50,60} Here the decreased percentage of apoptotic HeLa, CaSki and HaCat cells following ST and PFT- α treatment, is correlated with a reduced $\Delta\Psi_m$ drop. The lower decrease in mitochondrial permeability might be attributed to the decrease of Bax protein levels.³⁸ We may also suggest that in addition to its reduced mitochondrial translocation, p53 is less competent to interact with Bcl-2/Bcl-xL proteins and subsequently can not exert its full activity.⁴⁵ However, PFT- α did not protect totally HeLa, CaSki and HaCat cells from ST-induced apoptosis. First, the 20 μ M of PFT- α , a currently used concentration,¹² is maybe not relevant to completely inhibit p53 transcriptional activity during the study period, as confirmed by p21 and Bax levels that were still higher in cells treated with ST plus PFT- α than in untreated cells. Second, apoptosis can be triggered, at least in part, by p53 still accessing to the mitochondria.⁴²⁻⁴⁸ Agree

with this hypothesis, the percentages of dying p53^{wt} HeLa and CaSki cells after ST and PFT- α cotreatment were of the same extent than that of C33A cells exposed to ST. Third, often cells treated with chemotherapeutic drugs will activate their suicide to die earlier by apoptosis. But, apoptosis inhibitors like PFT- α do not block the direct toxic effects of the drugs which are able to kill cells if used at a lethal concentration or for a long time exposure, the inhibitor only defer the process.^{61,62}

The present findings of these two experimental approaches provide evidence for the hypothesis that p53 is involved in the mechanism of apoptosis induction under ST exposure. The combination of PRIMA-1 with anti-cancer therapies could be effective to target mutant p53-carrying tumors and the addition of PFT- α to ST and PRIMA-1 could be useful to reduce the chemotherapy ill-fated secondary effects on healthy p53^{wt} tissues.⁶³ As demonstrated in this study, PFT- α did not compromise the anti-tumor activity of the combined ST and PRIMA-1 drugs in p53-mutated cancer C33A cells. In a similar approach, G1-121A cells (p53^{mt}) were treated with 100 μ M PRIMA-1 which induced p21 expression. Treatment of these cells with PRIMA-1 in presence of 20 μ M PFT- α resulted in an inhibition of p21 expression.⁶⁴ However, the authors did not examine the combined effect of PRIMA-1 and PFT- α on cells submitted to an apoptotic stimulus. In the tritherapy experiments on C33A cells, it is plausible that p53, which conformation was restored by PRIMA-1, can induce a transcription-independent apoptosis through early interactions with mitochondria regardless of protein synthesis.⁶⁵ This PRIMA-1-induced phenomenon likely precedes the p53 transcriptional activity⁵¹ and could outdo on the PFT- α effect.

Future animal experiments and clinical trials will be necessary to test these small molecules in whole-organism and to establish the efficacy of this promising tritherapy regimen. However, drugs would be strictly restricted to p53 transcriptionally defective tumors and not useful in wild-type p53 tumors. An elegant report published during the preparation of our manuscript described another small molecule named RITA (Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis) which restores the apoptosis-inducing function of wild-type p53 in tumor cells, but not in non-transformed cells.⁶⁶

Acknowledgments

This work was supported by grants from Ligue Contre le Cancer (Département du Doubs). J.-F.C. received fellowships from Ligue Contre le Cancer (Département du Doubs) and Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique (ARERS). The flow cytometer was obtained with funds from the association pour la recherche sur le cancer (ARC). We would like to thank Claudine Haughey and Virginie Mougey for technical support. The

authors thank students and all members of the laboratory for their help and encouragement during the course of this work.

References

1. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381): 15–16.
2. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408(6810): 307–310.
3. Lu H, Levine AJ. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(11): 5154–5158.
4. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: New online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19(6): 607–614.
5. Chene P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: An important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(2): 102–109.
6. Kessis TD, Slebos RJ, Han SM, et al. p53 gene mutations and MDM2 amplification are uncommon in primary carcinomas of the uterine cervix. *Am J Pathol* 1993; 143(5): 1398–1405.
7. Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, et al. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(9): 3988–3992.
8. Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 2002; 8(3): 282–288.
9. Bykov VJ, Selivanova G, Wiman KG. Small molecules that reactivate mutant p53. *Eur J Cancer* 2003; 39(13): 1828–1834.
10. Komarova EA, Chernov MV, Franks R, et al. Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity *in vivo*. *Embo J* 1997; 16(6): 1391–1400.
11. Schwartz D, Goldfinger N, Rotter V. Expression of p53 protein in spermatogenesis is confined to the tetraploid pachytene primary spermatocytes. *Oncogene* 1993; 8(6): 1487–1494.
12. Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 1999; 285(5434): 1733–1737.
13. Komarova EA, Gudkov AV. Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: Potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2001; 62(6): 657–667.
14. Komarova EA, Gudkov AV. Suppression of p53: A new approach to overcome side effects of antitumor therapy. *Biochemistry (Mosc)* 2000; 65(1): 41–48.
15. Komarova EA, Gudkov AV. Could p53 be a target for therapeutic suppression? *Semin Cancer Biol* 1998; 8(5): 389–400.
16. Charlot JE, Prézet JL, Haughey C, Mougins C. Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* 2004; 9(3): 333–343.
17. Henseleit U, Zhang J, Wanner R, Haase I, Kolde G, Rosenbach T. Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1997; 109(6): 722–727.
18. Bernard B, Prézet JL, Charlot JE, Mougins C. Human papillomavirus type 16+ and 18+ cervical carcinoma cells are sensitive to staurosporine-mediated apoptosis. *Biol Cell* 2003; 95(1): 17–26.
19. Zaika A, Irwin M, Sansome C, Moll UM. Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J Biol Chem* 2001; 276(14): 11310–11316.

20. Melino G, Bernassola F, Ranalli M, et al. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* 2004; 279(9): 8076–8083.
21. Katiyar SK, Roy AM, Baliga MS. Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving Bcl-2/Bax, cytochrome c release, and caspase activation. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(2): 207–216.
22. Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: Regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1999; 1(8): E209–216.
23. Takagi-Morishita Y, Yamada N, Sugihara A, Iwasaki T, Tsujimura T, Terada N. Mouse uterine epithelial apoptosis is associated with expression of mitochondrial voltage-dependent anion channels, release of cytochrome c from mitochondria, and the ratio of Bax to Bcl-2 or Bcl-X. *Biol Reprod* 2003; 68(4): 1178–1184.
24. Lehman TA, Modali R, Boukamp P, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 1993; 14(5): 833–839.
25. Szymanska K, Hainaut P. TP53 and mutations in human cancer. *Acta Biochim Pol* 2003; 50(1): 231–238.
26. Soussi T, Beroud C. Significance of TP53 mutations in human cancer: A critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum Mutat* 2003; 21(3): 192–200.
27. Crook T, Wrede D, Vousden KH. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* 1991; 6(5): 873–875.
28. Yeager TR, Reznikoff CA. Methotrexate resistance in human uroepithelial cells with p53 alterations. *J Urol* 1998; 159(2): 581–585.
29. Weller M. Predicting response to cancer chemotherapy: The role of p53. *Cell Tissue Res* 1998; 292(3): 435–445.
30. Bykov VJ, Wiman KG. Novel cancer therapy by reactivation of the p53 apoptosis pathway. *Ann Med* 2003; 35(7): 458–465.
31. Bykov VJ, Issaeva N, Selivanova G, Wiman KG. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: A statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis* 2002; 23(12): 2011–2018.
32. Syljuasen RG, Sorensen CS, Hansen LT, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, Metcalf RA, Stampfer MR, Fusenig N, Rogan EM, et al. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* 2005; 25(9): 3553–3562.
33. Zerbin L, Wang Y, Correa RG, Cho JY, Libermann TA. Blockage of NF-kappaB induces serine 15 phosphorylation of mutant p53 by JNK kinase in prostate cancer cells. *Cell Cycle* 2005; 4 (9): 1247–1253.
34. Chan UP, Lee JR, Wang SH, Leung KL, Chen GG. Induction of colon cancer cell death by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) is associated with increased p38 MAPK and decreased Bcl-xL. *Anticancer Drugs* 2003; 14(9): 761–766.
35. She QB, Chen N, Dong Z. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem* 2000; 275(27): 20444–20449.
36. Perfettini JL, Castedo M, Nardacci R, et al. Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J Exp Med* 2005; 201(2): 279–289.
37. Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem* 1999; 274(18): 12229–12235.
38. Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo J* 1999; 18(23): 6845–6854.
39. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001; 26(1): 61–66.
40. Scarlett JL, Sheard PW, Hughes G, Ledgerwood EC, Ku HH, Murphy MP. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Lett* 2000 475(3): 267–272.
41. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 2005; 309(5741): 1732–1735.
42. Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 2004; 6(5): 443–450.
43. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 2004; 303(5660): 1010–1014.
44. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 2005; 17(4): 525–535.
45. Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 2003; 11(3): 577–590.
46. Schuler M, Green DR. Transcription, apoptosis and p53: Catch-22. *Trends Genet* 2005; 21(3): 182–187.
47. Park BS, Song YS, et al. Phospho-ser 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl 2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis. *Apoptosis* 2005; 10(1): 193–200.
48. Erster S, Moll UM. Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(3): 843–850.
49. Zhao Y, Chaiswing L, Velez JM, et al. p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 2005; 65(9): 3745–3750.
50. Erster S, Moll UM. Stress-induced p53 runs a direct mitochondrial death program: its role in physiologic and pathophysiologic stress responses *in vivo*. *Cell Cycle* 2004; 3(12): 1492–1495.
51. Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM. *In vivo* mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol* 2004; 24(15): 6728–6741.
52. Pecere T, Sarinella F, Salata C, et al. Involvement of p53 in specific anti-neuroectodermal tumor activity of aloe-emodin. *Int J Cancer* 2003; 106(6): 836–847.
53. Vukicevic V, Kampfinger K, Stopper H. Influence of altered apoptosis in human lymphoblastoid cell lines on micronucleus frequency. *Toxicol Lett* 2004; 147(2): 187–195.
54. Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 1994; 9(8): 2261–2268.
55. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54(8): 2095–2097.
56. Selvakumar M, Lin HK, Miyashita T, et al. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: A paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 1994; 9(6): 1791–1798.
57. Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M, Boxer LM. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 2001; 20(2): 240–251.
58. Komarova EA, Neznanov N, Komarov PG, Chernov MV, Wang K, Gudkov AV. p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 2003; 278(18): 15465–15468.
59. Murphy PJ, Galigniana MD, Morishima Y, et al. Pifithrin-alpha inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *J Biol Chem* 2004; 279(29): 30195–30201.

60. Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC. P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: Protective role of a p53 inhibitor. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(1): 128–138.
61. Gerl R, Vaux DL. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26(2): 263–270.
62. Kaufmann SH, Vaux DL. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene* 2003; 22(47): 7414–7430.
63. Zhang M, Liu W, Ding D, Salvi R. Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience* 2003; 120(1): 191–205.
64. Rehman A, Chahal MS, Tang X, Bruce JE, Pommier Y, Daoud SS. Proteomic identification of heat shock protein 90 as a candidate target for p53 mutation reactivation by PRIMA-1 in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005; 7(5): R765–774.
65. Chipuk JE, Maurer U, Green DR, Schuler M. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* 2003; 4(5): 371–381.
66. Issaeva N, Bozko P, Enge M, *et al.* Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-MDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med* 2004; 10(12): 1321–1328.

2. Publication n°2

Spatiotemporal activation of caspase-dependent and -independent pathways in staurosporine-induced apoptosis of p53^{wt} and p53^{mt} human cervical carcinoma cells

M. Nicolier, A.Z. Decrion-Barthod, S. Launay, J.L. Prétet and C. Mougin

2009, *Biology of the Cell*, 101 : 455-467

PMID : 19216720

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/19216720?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum

Ce travail a été présenté sous forme orale à :

- ✓ ***Société de Biologie de Besançon*** : 18 décembre 2007, Besançon, France : « Les caspases sont-elles les seules à permettre la mort des cellules cancéreuses ? ». M. Nicolier, A.Z. Decrion-Barthod, J.L. Prétet, C. Mougin, 2^{ème} prix de communication.
- ✓ ***4th International Meeting of the Cutaneous HPV Consortium***: 27-30 juin 2007, Besançon, France : « Staurosporine induced apoptotic cell death of cervical carcinoma cells through cytochrome c- and AIF-dependent pathways ». M. Nicolier, S. Launay, A.Z. Decrion-Barthod, J.L. Prétet, C. Mougin (Abstract published in *Bulletin du Cancer*, 2007 : 94:613-23).

Ce travail a été présenté sous forme affichée à :

- ✓ ***15th Euroconference on Apoptosis & 4th Training course on « Concepts and Methods in Programmed Cell Death »*** : 26-31 octobre 2007, Portoroz, Slovénie : « Cervical carcinoma cells display apoptosis under staurosporine exposure through caspase-dependent and caspase-independent pathways ». M. Nicolier, A.Z. Decrion-Barthod, J.L. Prétet, C. Mougin.
- ✓ ***1^{er} Forum du Cancéropôle Grand-Est*** : 19 octobre 2007, Vittel, France : « Apoptosis of cervical carcinoma-derived cells : involvement of cytochrome c- and AIF-dependent pathways ». M. Nicolier, A.Z. Decrion-Barthod, S. Launay, J.L. Prétet, C. Mougin.

Introduction à la publication n°2

Dans ce travail, nous avons voulu approfondir l'implication de la voie apoptotique mitochondriale lors de l'apoptose induite par la STS. Une fois transloquée à la mitochondrie, la protéine p53 (transcriptionnellement active ou inactive) participe à l'activation de cette voie permettant *in fine* la libération de molécules apoptogènes de la mitochondrie au profit du cytosol. Nous nous sommes intéressée à la libération de deux de ces molécules apoptogènes, le *cyt c* et l'AIF, suite à l'induction de l'apoptose par la STS dans deux lignées cellulaires dérivées de carcinome du col de l'utérus : la lignée HeLa dérivant d'un adénocarcinome du col de l'utérus contient l'HPV18 et abrite une protéine p53 sauvage et la lignée C-33A HPV négative dérivant d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus abrite une p53 mutée au niveau de l'AA 273 (Arg273Cys) rendant cette protéine transcriptionnellement inactive.

Selon les modèles, ces deux facteurs apoptogènes sont impliqués dans des voies apoptotiques mitochondriales distinctes. i) Le *cyt c* participe à la voie apoptotique dépendante des caspases. Lors de l'apoptose, une fois libéré dans le cytosol, le *cyt c* s'associe avec la molécule adaptatrice Apaf-1 puis avec la procaspase-9 dite initiateur et l'ATP, formant ainsi l'apoptosome. La procaspase-9 est alors clivée en caspase-9, caspase initiateur, déclenchant ainsi la cascade des caspases dont la caspase-3, caspase effectrice et élément central du processus apoptotique. Les caspases effectrices cytosoliques ainsi activées vont cliver spécifiquement leurs cibles intracellulaires, notamment la protéine nucléaire PARP-1, aboutissant au démantèlement puis à la mort de la cellule. Par ailleurs, la caspase-8, caspase clé de la voie apoptotique extrinsèque, clive aussi la caspase-3 et peut aussi cliver Bid en t-Bid. Cette dernière est alors transloquée à la mitochondrie où elle permet l'activation de la voie apoptotique mitochondriale en agissant de concert avec Bax et Bak, ce qui favorise la dépolarisation de la membrane mitochondriale ainsi que la libération de facteurs apoptogènes. ii) L'AIF est quant à elle considérée comme le principal effecteur de la mort indépendante des caspases. Une fois libérée dans le cytosol, l'AIF est transloquée au noyau où elle s'associe avec la cyclophiline A, DNase, pour former le dégradosome. Ce dernier participe à la chromatolyse aboutissant *in fine* à la fragmentation de l'ADN en grands fragments d'environ 50 kpb, marqueur caractéristique de l'activité nucléaire de l'AIF et marqueur du niveau I de l'apoptose nucléaire. Récemment il a été montré que la protéine PARP-1, présente aussi au niveau de la mitochondrie (Du *et al.*, 2003), peut être impliquée dans la libération de l'AIF (Yu *et al.*, 2002).

Dans un premier temps, nous avons étudié par western-blotting l'effet de la STS sur la localisation sub-cellulaire du *cyt c* et de l'AIF. Dans les cellules HeLa, plus sensibles à l'apoptose induite par la STS, le *cyt c* est très rapidement libéré de la mitochondrie alors que dans les cellules C-33A, cette libération est plus tardive. Nous avons aussi observé que la libération plus tardive de l'AIF est similaire dans les deux lignées et est suivie par sa translocation au noyau.

Nos deux lignées d'intérêt se différenciant par le statut de p53, nous nous sommes intéressée à l'implication de cette protéine dans la libération du *cyt c* et de l'AIF. Pour ce faire, nous avons modulé l'activité transcriptionnelle de p53 avec PRIMA-1, molécule restaurant le domaine de liaison à l'ADN de p53 mutée à ce niveau, et PFT- α , molécule inhibant l'activité transcriptionnelle de p53 sauvage. L'ajout de PRIMA-1 à la STS augmente la libération du *cyt c* ainsi que la translocation nucléaire de l'AIF uniquement dans les cellules C-33A alors que PFT- α a l'effet inverse dans les cellules HeLa. Ainsi

la libération du *cyt c* et de la translocation nucléaire de l'AIF lors de l'apoptose induite par la STS sont en partie influencés par le statut de p53.

Après avoir modulé l'activité de p53, nous avons souhaité étudier plus en détail les cascades de réactions impliquant le *cyt c* et l'AIF. L'expression des diverses protéines impliquées dans les cascades apoptotiques dépendante et indépendante des caspases a été étudiée par western-blotting, à savoir : i) les caspases-9, -3, -8, Bid (substrat de la caspase-8), et la PARP-1 nucléaire (substrat de la caspase-3), pour la voie des caspases impliquant le *cyt c* et ii) la PARP-1 mitochondriale pour la voie indépendante des caspases impliquant l'AIF.

Dans les cellules HeLa, davantage sensibles à l'apoptose induite par la STS, la libération du *cyt c* entraîne l'activation de la voie apoptotique mitochondriale classique, à savoir l'activation de la caspase-9 suivie de la caspase-3. A l'inverse dans les C-33A, la caspase-8 est activée précocement et clive i) Bid en t-Bid, comme le montre la disparition de la pro-forme, ceci aboutissant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale ainsi que ii) la procaspase-3 en caspase-3, laquelle clive à son tour sa cible nucléaire PARP-1. L'implication des caspases a été confirmée par l'utilisation de z-VAD, inhibiteur générique de l'ensemble des caspases. En effet, quelle que soit la lignée (HeLa vs C-33A), le z-VAD inhibe le clivage et l'activation sub-séquentes des caspases-9, -3, -8 résultant en l'absence de clivage de leurs substrats cibles tels que PARP-1 nucléaire pour la caspase-3 et Bid pour la caspase-8. L'activation de la caspase-8 étant différée dans les cellules HeLa par rapport aux cellules C-33A, nous avons souhaité étudier l'effet de son inhibition par le z-IETD. L'ajout de z-IETD inhibe spécifiquement l'activation de la caspase-8 et uniquement le clivage de sa cible Bid dans les deux lignées traitées par la STS.

Nous nous sommes aussi intéressée à l'effet que pouvait avoir le z-VAD sur la dépolarisation membranaire mitochondriale (marquage au MitoTracker Red, cytométrie de flux). Le z-VAD diminue la dépolarisation de la membrane mitochondriale induite par la STS dans les deux lignées. Cet effet peut s'expliquer par l'inhibition par le z-VAD d'autres protéases que les caspases impliquées aussi dans la dépolarisation membranaire mitochondriale, telles que les calpaines. De plus, quel que soit l'inhibiteur utilisé, z-VAD ou z-IETD, ni la libération du *cyt c* ni celle de l'AIF ne sont modifiées. Ainsi, les libérations du *cyt c* et de l'AIF sont indépendantes des caspases.

En revanche et de façon surprenante, nous avons observé que le z-VAD diminue uniquement la fragmentation de l'ADN (marquage à l'iodure de propidium, cytométrie de flux) des cellules HeLa. Ces résultats tendent en faveur du rôle prédominant de la voie apoptotique mitochondriale dite « classique » à savoir *cyt c*/caspase-9/caspase-3 lors de l'apoptose induite par la STS dans les cellules HeLa (Figure 35). A l'inverse, dans les cellules C-33A, plus résistantes, la caspase-8 semble être activée en premier, activant à son tour la caspase-3. La voie *cyt c*/caspase-9/caspase-3 est quant à elle activée plus tardivement. Néanmoins, le z-VAD i) inhibe partiellement la fragmentation de l'ADN dans les cellules HeLa et ii) n'a aucun effet sur celle des cellules C-33A. Cette donnée tend en faveur de l'implication d'une autre voie que celle des caspases lors de l'apoptose induite par la STS.

En parallèle du *cyt c*, nous nous sommes intéressée à un autre facteur apoptogène, l'AIF, considéré comme le principal effecteur de l'apoptose indépendante des caspases. Quel que soit le statut de p53, la libération mitochondriale de l'AIF au profit du cytosol est similaire dans les deux lignées d'intérêt. De plus, cette libération est concomitante au clivage de la PARP-1 mitochondriale. Puis l'AIF est transloquée au noyau où elle forme le dégradosome avec la cyclophiline A, aboutissant

in fine à la dégradation de l'ADN en fragments de haut poids moléculaire de 50 kpb, fragments que nous avons mis en évidence par électrophorèse en champ pulsé. Récemment, il a été démontré que la libération de l'AIF peut être médiée par la protéine PARP-1, localisée aussi au niveau de la mitochondrie, et cette libération est indépendante des caspases, comme nous l'avons montré par l'utilisation de z-VAD et de z-IETD. L'implication de la PARP-1 mitochondriale dans cette libération a été confirmée par le traitement de nos deux lignées d'intérêt par le 3-aminobenzamide (3-AB), inhibiteur compétitif de PARP-1. L'administration de 3-AB simultanément à la STS dans les deux lignées cellulaires, diminue le clivage de PARP-1 (pools nucléaire et mitochondrial) principalement dans la lignée C-33A. De plus dans les deux lignées, le 3-AB inhibe aussi la libération de l'AIF, sa translocation nucléaire ainsi que la fragmentation de l'ADN en entités de haut poids moléculaire. Ces inhibitions affectent davantage les cellules C-33A. L'utilisation de 3-AB inhibe aussi la dépolarisation membranaire mitochondriale dans les deux lignées et inhibe fortement la fragmentation de l'ADN et ce, uniquement dans les cellules C-33A. La voie apoptotique mitochondriale médiée par PARP-1 impliquant l'AIF est donc activée par la STS dans les deux lignées cellulaires et semble être la voie prépondérante dans les cellules C-33A abritant une protéine p53 mutée (Figure 35). A l'inverse le 3-AB augmente la fragmentation de l'ADN induite par la STS des cellules HeLa abritant une protéine p53 sauvage, phénomène en faveur d'une potentialisation des dommages à l'ADN non réparés suite à l'inactivation de la PARP-1 nucléaire.

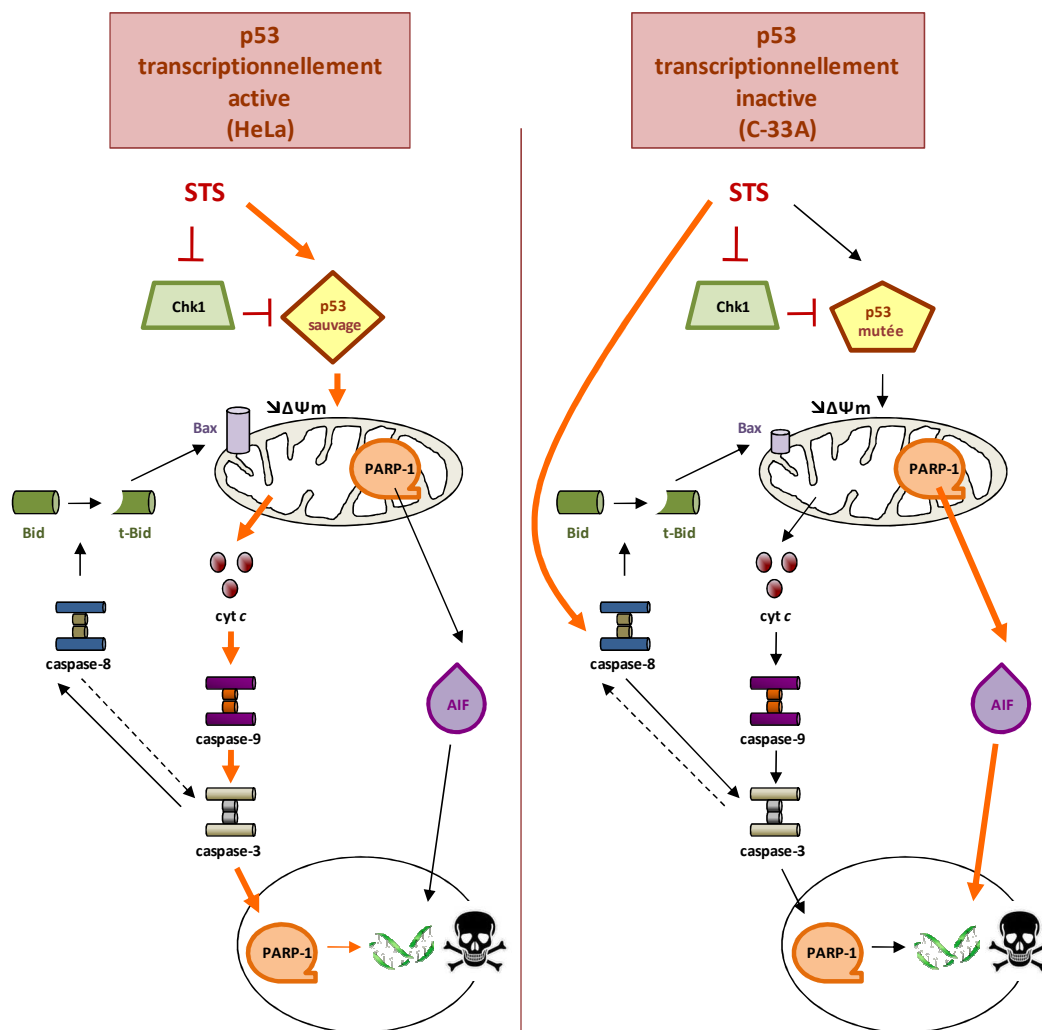


Figure 35 : Modèle proposé pour la cascade apoptotique induite par la STS dans les lignées HeLa et C-33A. Les voies prépondérantes sont indiquées par les flèches orange.

Cette étude a permis de confirmer l'implication de la voie apoptotique mitochondriale lors de l'apoptose induite par la STS *via* une activation hiérarchique de voies sous-jacentes (Figure 35) : i) la voie médiée par les caspases avec la cascade des caspases initiée par la caspase-8 et/ou la caspase-9 et ii) la voie médiée par PARP-1 et indépendante des caspases. L'implication de chaque voie est fonction du contexte cellulaire, notamment du statut de p53. La STS semble donc être un bon candidat pour traiter les lésions tumorales. Ce travail montre aussi que la hiérarchie d'activation des différentes voies impliquées dans cette apoptose intrinsèque est fonction des lignées cellulaires, qui se différencient par le statut de p53. Ainsi, en restaurant l'activité de la protéine p53 dans les tumeurs abritant une protéine p53 mutée (cas de la majorité des cancers), on peut espérer stimuler au maximum ces différentes voies, amplifiant ainsi l'efficacité de la STS.



Spatiotemporal activation of caspase-dependent and -independent pathways in staurosporine-induced apoptosis of p53^{wt} and p53^{mt} human cervical carcinoma cells

Magali Nicolier, Anne-Zélie Decrion-Barthod, Sophie Launay, Jean-Luc Prétet and Christiane Mougin¹

CHU Jean Minjoz, EA 3181, IFR 133, Université de Franche-Comté, UFR Médecine et Pharmacie, 19 rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France

Background information. Caspase-dependent and -independent death mechanisms are involved in apoptosis in a variety of human carcinoma cells treated with antineoplastic compounds. Our laboratory has reported that p53 is a key contributor of mitochondrial apoptosis in cervical carcinoma cells after staurosporine exposure. However, higher mitochondrial membrane potential dissipation and greater DNA fragmentation were observed in p53^{wt} (wild-type p53) HeLa cells compared with p53^{mt} (mutated p53) C-33A cells. Here, we have studied events linked to the mitochondrial apoptotic pathway.

Results. Staurosporine can induce death of HeLa cells via a cytochrome *c*/caspase-9/caspase-3 mitochondrial-dependent apoptotic pathway and via a delayed caspase-independent pathway. In contrast with p53^{wt} cells, p53^{mt} C-33A cells exhibit firstly caspase-8 activation leading to caspase-3 activation and Bid cleavage followed by cytochrome *c* release. Attenuation of PARP-1 [poly(ADP-ribose) polymerase-1] cleavage as well as oligonucleosomal DNA fragmentation in the presence of z-VAD-fmk points toward a major involvement of a caspase-dependent pathway in staurosporine-induced apoptosis in p53^{wt} HeLa cells, which is not the case in p53^{mt} C-33A cells. Meanwhile, the use of 3-aminobenzamide, a PARP-1 inhibitor known to prevent AIF (apoptosis-inducing factor) release, significantly decreases staurosporine-induced death in these p53^{mt} carcinoma cells, suggesting a preferential implication of caspase-independent apoptosis. On the other hand, we show that p53, whose activity is modulated by pifithrin- α , isolated as a suppressor of p53-mediated transactivation, or by PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis), that reactivates mutant p53, causes cytochrome *c* release as well as mitochondrio-nuclear AIF translocation in staurosporine-induced apoptosis of cervical carcinoma cells.

Conclusions. The present paper highlights that staurosporine engages the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway via caspase-8 or caspase-9 signalling cascades and via caspase-independent cell death, as well as through p53 activity.

¹To whom correspondence should be addressed (email christiane.mougin@univ-fcomte.fr).

Key words: apoptosis-inducing factor (AIF), cervical carcinoma, cytochrome *c*, p53, staurosporine.

Abbreviations used: 3-AB, 3-aminobenzamide; AIF, apoptosis-inducing factor; cyt *c*, cytochrome *c*; EMEM, Eagle's minimal essential medium; HPV, human papillomavirus; IMS, intermembrane space; p53^{mt}, mutated p53; p53^{wt}, wild-type p53; PAR, poly(ADP-ribose); PARP-1, PAR polymerase-1; PFT- α , pifithrin- α ; PRIMA-1, p53 reactivation and induction of massive apoptosis; STS, staurosporine; z-IETD-fmk, benzylloxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Du-Asp-Iluoromethylketone; z-VAD-fmk, benzylloxycarbonyl-His-Ala-Glu-Asp-Iluoromethylketone.

Introduction

Apoptotic cell death plays an important role in tissue development and homeostasis as well as in cancer cell clearance (Fearhead et al., 1998). To date, two main apoptotic pathways have been described. The extrinsic pathway involves the trimerization of death receptors [e.g. Fas and TRAIL (tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand) receptor], which results in the recruitment and activation

of procaspase-8 by adaptor proteins. Once activated, caspase-8 cleaves downstream effectors such as caspase-3. It can also truncate Bid into t-Bid, which translocates to the mitochondria to connect with the intrinsic death pathway (Korsmeyer et al., 2000). Truncated Bid serves as a membrane-targeted ligand which requires its BH3-domain to trigger oligomerization of Bax and/or Bak (Wei et al., 2001). It leads to mitochondrial outer membrane permeabilization with release of multiple apoptogenic proteins (reviewed in Danial and Korsmeyer, 2004; Kroemer et al., 2007). Among these proteins are *cyt c* (cytochrome *c*) and AIF (apoptosis-inducing factor). Once in the cytosol, *cyt c* initiates apoptosome formation by promoting the interaction between APAF-1, ATP and procaspase-9, which is cleaved into its activated form (Acehan et al., 2002). Caspase-9, in turn, cleaves and activates procaspase-3, which is responsible for the cleavage of various proteins such as nuclear PARP-1 {PAR [poly(ADP-ribose)] polymerase-1} (Nicholson et al., 1995) and DFF (DNA fragmentation factor), leading to oligonucleosomal DNA fragmentation (Liu et al., 1997). AIF contained in the mitochondrial IMS (intermembrane space) (Susin et al., 1999) is released upon apoptotic induction and translocated into the nucleus, where it interacts with cyclophilin A to form the degradosome that favours chromatinolysis with DNA degradation to about 50 kbp fragments (Cande et al., 2004). In most apoptosis models, mitochondrial release of AIF is caspase-independent, but mediated by p53 (Cregan et al., 2002) or PARP-1 (Yu et al., 2002) that has been demonstrated to be also present in mitochondria (Du et al., 2003). Furthermore, overexpression of PARP-1 generates PAR polymers which colocalize with the mitochondria where they induce AIF release (Yu et al., 2006), but the exact mechanisms involved are not yet fully understood (reviewed in Heeres and Hergenrother, 2007).

In previous studies, we have demonstrated that STS (staurosporine)-induced apoptosis of cervical carcinoma cells whatever the p53 status is [p53^{wt}; wild-type p53 and transcriptionally active or p53^{mt}; mutated p53 on the DNA-binding domain at codon 273 (R273C) and transcriptionally inactive] (Bernard et al., 2001; Charlot et al., 2004). Because p53^{wt} or p53^{mt} were transiently located to the mitochondria, we have suggested that STS-induced apoptosis was p53-dependent

(Charlot et al., 2004, 2006) as already reported (Marchenko et al., 2000). However, a delay in p53 translocation to the mitochondria was observed in p53^{mt} C-33A cells compared with p53^{wt} HeLa cells. Moreover, mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) collapses and sub-G₁ DNA content were reduced in p53^{mt} cells compared with p53^{wt} cells (Charlot et al., 2004) but were restored in the presence of PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis), which reactivates the transactivation capacity of some p53 mutants (Charlot et al., 2006). Although STS rapidly drives virtually all mammalian cells into apoptosis, its mechanisms of action remain complex. In the present study, we explored the pathways in STS-induced apoptosis of HeLa and C-33A cells derived from human cervical cancer. The results from the present study suggest that STS induces apoptosis of HeLa and C-33A cells in a spatiotemporal manner via caspase-8 and mitochondria-dependent caspase-9 activation, as well as via a caspase-independent pathway through mitochondrio-nuclear translocation of AIF. Nevertheless, the contribution of caspases in the cell death process is dependent on cells expressing wild-type or mutant p53.

Results

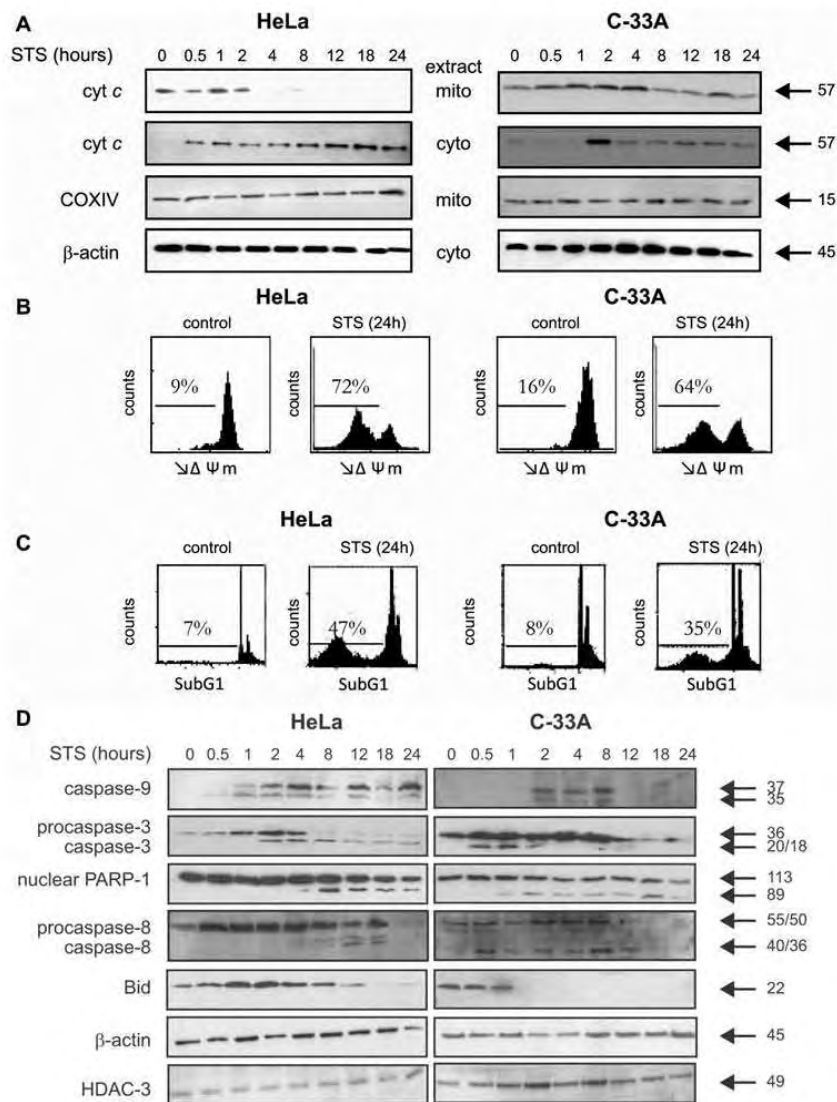
STS activates caspase-dependent apoptotic pathways with different time courses in p53^{wt} and p53^{mt} cervical carcinoma cells

To identify the downstream events in the mitochondrial apoptotic cascades, HeLa and C-33A cells were treated with 300 nM STS for various time periods. STS exposure resulted in a significant increase of *cyt c* in the cytosol of HeLa cells, starting at 30 min with a noticeable decrease of *cyt c* in mitochondria after 2 h of treatment (Figure 1A, left panel). In C-33A cells, *cyt c* release was delayed compared with HeLa cells. The shift in *cyt c* distribution was indeed not observed prior to 2–4 h of treatment (Figure 1A, right panel). Variations in $\Delta\psi_m$ and Sub-G₁ DNA content assessed in cells treated for 24 h with 300 nM STS confirmed the induction of apoptosis (Figures 1B and 1C respectively).

We evaluated further the caspase activation in STS-induced apoptosis. As shown in Figure 1(D), STS resulted in the formation of active (cleaved) forms of caspase-9, as shown by 37 and 35 kDa

Figure 1 | STS treatment induces mitochondrial membrane potential dissipation, cyt c release, caspase cascade activation and DNA fragmentation in HeLa and C-33A human cervical carcinoma cells

Cells were treated with 300 nM STS for the indicated time periods and harvested. **(A)** Cells were processed for subcellular fractionation. Extracts were analysed by immunoblotting for the detection of cyt c in mitochondria (mito) and cytosol (cyto). COXIV and β -actin were used as loading controls. **(B)** Representative data of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) by FACS using the MitoTracker Red dye. **(C)** Representative data of flow cytometry analysis of the sub-G₁ DNA content using propidium iodide. **(D)** Whole cell extracts were analysed by immunoblotting for the presence of caspase-9 and procaspase-3 and -8 and their cleaved fragments plus the Bid pro-form. Nuclear extracts were used for the detection of nuclear PARP-1. Immunoblotting for β -actin and HDAC-3 were used as protein loading controls. Numbers on the right in **(A)** and **(D)** indicate molecular masses in kDa. For each panel, 3 independent experiments were performed yielding similar results.



intermediates, with a similar time course to the delocalization of *cyt c* into the cytosol. In HeLa cells, caspase-9 cleavage occurring as early as 1 h was followed by caspase-3 cleavage in 20/18 kDa fragments 2 h after STS exposure. Interestingly, in C-33A cells, which are less sensitive to STS than HeLa cells, activation of caspase-3 within 30 min was sooner than activation of caspase-9, observed within 2 h. Thus we investigated the levels of cleaved caspase-8 as shown by 40/36 kDa intermediates. They were increased as early as 30 min in C-33A cells and only after 4–8 h in HeLa cells after STS exposure. STS also led to cleavage/activation of Bid as revealed by the decrease of the 22 kDa Bid proform as soon as 2 h in C-33A cells and after 12 h in HeLa cells, in accordance with the time course of caspase-8 activation (Figure 1D). Nuclear PARP-1, a substrate of caspase-3, was cleaved into an 89 kDa fragment in both cell lines. These data indicate that the implicated initiator caspases in STS-induced apoptosis are cell specific.

STS activates the AIF-dependent apoptotic pathway in p53^{wt} and p53^{mt} cervical carcinoma cells

In both cell lines, STS resulted in decreased AIF in mitochondria after 4 h of treatment, and was associated with a simultaneous increase of AIF in the cytosol (Figure 2A). A portion of AIF was found within the nucleus after 4–8 h STS exposure (Figure 2A). In addition to its nuclear localization (Figure 1D), PARP-1 was detected in mitochondria in untreated HeLa and C-33A cells (Figure 2B). At 4–8 h after STS treatment, cleaved PARP-1 was significantly increased in mitochondria in both cell lines (Figure 2B). Moreover, STS induced the formation of high-molecular-mass DNA fragments migrating near or slightly ahead of the 50 kbp marker (see Figure 5D), consistent with AIF nuclear translocation.

The pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk inhibits STS-induced apoptosis in p53^{wt} cells but not in p53^{mt} cells

To understand the role of caspases in STS-induced apoptosis of HeLa and C-33A cells, we investigated the effect of z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone). Used alone this inhibitor did not influence survival of both cell lines, but it inhibited STS-induced cleavage of procaspases, resulting in inhibition of nuclear PARP-1 processing

(Figure 3A). It also appeared that z-VAD-fmk associated with STS decreased the sub-G₁ DNA content in HeLa cells but did not modify the death of C-33A cells (Figure 3B). Incubation with z-VAD-fmk resulted in a decrease in $\Delta\psi_m$ collapse which was more pronounced in C-33A cells (Figure 3C, right panel) than in HeLa cells (Figure 3C, left panel) after 24 h of STS exposure. In contrast, z-VAD-fmk did not modify the subcellular localization of *cyt c* and AIF (Figure 3D), suggesting that the release of those proteins is very likely to be caspase-independent.

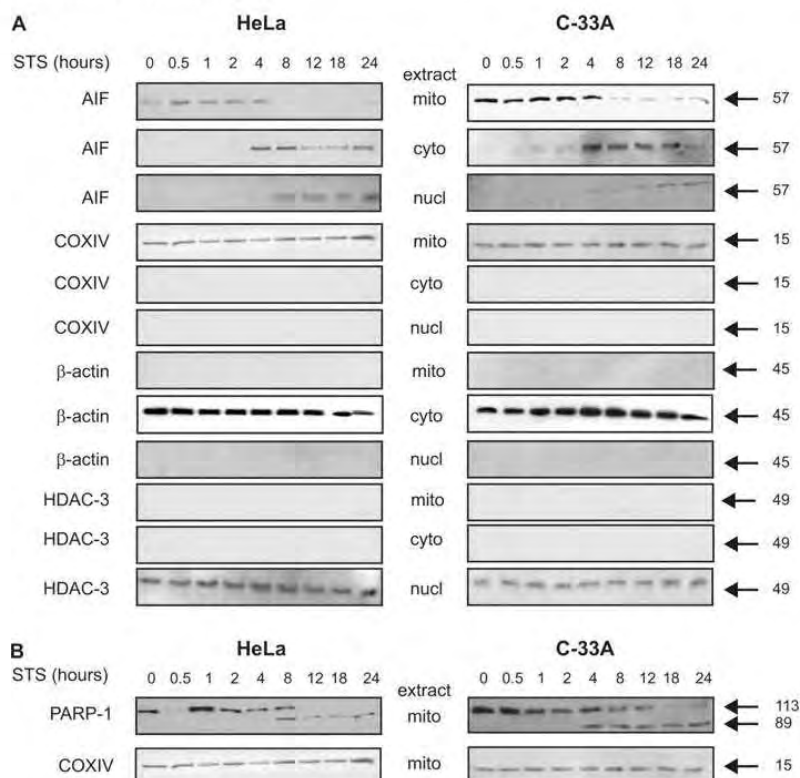
Upon STS exposure, z-IETD-fmk (benzyloxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-DL-Asp-fluoromethylketone), a specific caspase-8 inhibitor, abolished caspase-8 cleavage and subsequently prevented processing of the proform Bid (Figure 4A), but it did not alter cleavage of caspases-9 and -3 and nuclear PARP-1. In addition, *cyt c* as well as AIF were readily observed in the cytosol, and AIF nuclear translocation was not prevented in both cell lines (Figure 4B).

Inhibition of mitochondrial PARP-1 prevents STS-induced mitochondrial dysfunction, AIF release and death of p53^{mt} cells but not of p53^{wt} cells

To explore the role of mitochondrial PARP-1 in AIF release during STS-induced apoptosis, the effect of 3-AB (3-aminobenzamide), a PARP-1 inhibitor, was evaluated. Analysis by flow cytometry revealed no change in $\Delta\psi_m$ and DNA integrity of HeLa and C-33A cells following treatment with 3-AB alone (Figures 5A and 5B). Nevertheless, 3-AB significantly prevented STS-induced breakdown of the $\Delta\psi_m$ in both cell lines (Figure 5A). In C-33A cells, PARP-1 inhibition also protected STS-induced oligonucleosomal DNA fragmentation as shown by a decreased sub-G₁ cell population (Figure 5B, right panel), whereas it enhanced DNA fragmentation in HeLa cells treated with STS (Figure 5B, left panel). Moreover, 3-AB inhibited nuclear translocation of AIF (Figure 5C) and DNA degradation into ~50 kbp fragments (Figure 5D) in C-33A cells, whereas the effect was much less significant in HeLa cells. 3-AB also reduced PARP-1 proteolysis induced by STS in the mitochondrion (Figure 5C) and to a lesser degree in the nuclei (Figure 5E) and especially in C-33A cells. In contrast, neither *cyt c* release (Figure 5C) nor caspase activation (Figure 5E) were prevented in STS-treated HeLa and C-33A cells under 3-AB

Figure 2 | STS treatment induces mitochondrial AIF-dependent apoptotic pathway in HeLa and C-33A cells

Cells were treated with 300 nM STS for the indicated time periods, harvested and processed for subcellular fractionation. Extracts were analysed by immunoblotting for the detection of AIF (A) or PARP-1 (B) in mitochondrial (mito), cytosolic (cyto) and nuclear (nucl) extracts. Blottings with COXIV-, β -actin- and HDAC-3-specific antibodies were used to assess protein loading in mitochondrial, cytosolic and nuclear fractions respectively. Molecular masses are indicated to the right in kDa. Results are representative of 3 independent experiments.



exposure. Altogether, these results suggest that PARP-1-mediated cell death promotes AIF release upon treatment with STS. Such a pathway might be preferentially involved in STS-induced apoptosis in C-33A cells.

Modulation of p53 activity by PFT- α (pifithrin- α) and PRIMA-1 influences cyt *c* release and AIF nuclear translocation in cells exposed to STS

Regarding the cell line-dependent degree of apoptotic induction, we examined the assumption that the status of p53 might influence IMS protein traffic. Using pharmacological approaches which appear to have future promising therapeutic applications, we

have shown that PFT- α partly inhibited STS-induced apoptosis in p53^{wt} HeLa cells, whereas PRIMA-1 increased $\Delta\psi_m$ collapse and sub-G₁ DNA content in p53^{mt} C-33A cells (Charlot et al., 2006).

Accordingly, the requirement of p53 for cyt *c* release and AIF nuclear translocation was studied by modulating its activity with PFT- α and PRIMA-1. Alone, PFT- α (Figure 6A) or PRIMA-1 (Figure 6B) had no effect on cyt *c* and AIF localization in both cell lines. In p53^{wt} HeLa cells, the addition of PFT- α to STS showed that cyt *c* was less abundant in the cytosol compared with cells treated with only STS and the nuclear translocation of AIF was reduced as confirmed by an accumulation of the latter protein

Figure 3 | Effects of z-VAD-fmk on caspase cascade, DNA fragmentation, $\Delta\psi_m$ and release of cyt c and AIF in HeLa and C-33A cells exposed to STS

Cells were treated with 100 μ M z-VAD-fmk, 300 nM STS or pretreated with 100 μ M z-VAD-fmk 1 h prior to treatment with STS for different time periods. **(A)** Immunoblot analysis of whole cell extracts after exposure to 24 h of STS for detection of procaspase-9, -8 and their cleaved fragments, caspase-3 and Bid. PARP-1 cleavage was studied from nuclear fractions. **(B)** Cells were treated with the indicated compounds for different times. Propidium iodide-stained cells were determined by FACS analysis. **(C)** MitoTracker Red-stained cells were analysed by flow cytometry. **(D)** Mitochondrial (mito), cytosolic (cyto) and nuclear (nucl) fractions were immunoblotted using cyt c and AIF monoclonal antibodies. Numbers on the right in **(A)** and **(D)** indicate molecular masses in kDa. Results in **(A)** and **(D)** are representative of 3 independent experiments. Results in **(B)** and **(C)** are the means \pm S.E.M. of 3 determinations.

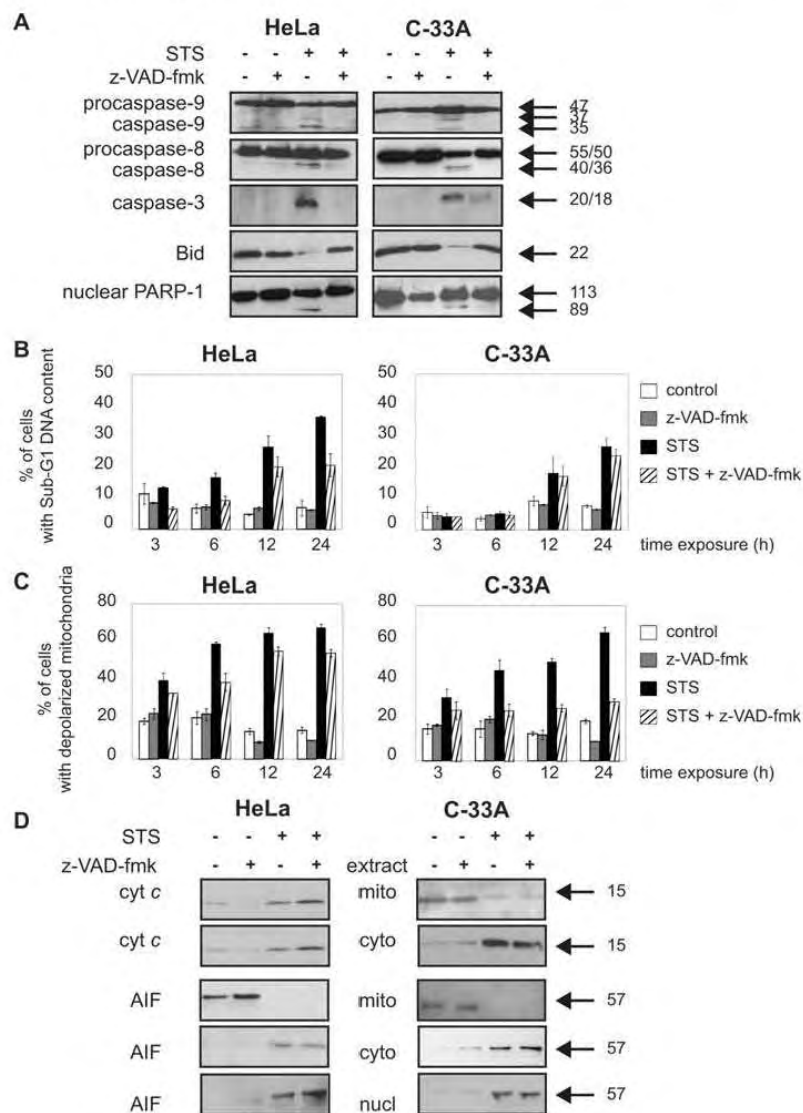
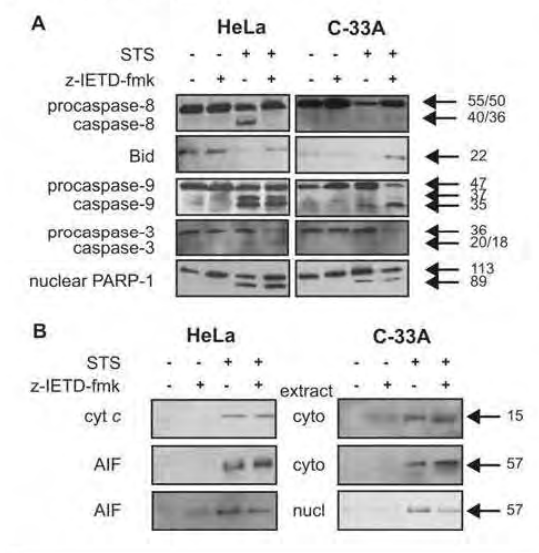


Figure 4 | Effects of z-IETD-fmk on caspase cascade and release of cyt c and AIF in HeLa and C-33A cells exposed to STS

Cells were treated with 100 μ M z-IETD-fmk, 300 nM STS or pretreated with 100 μ M z-IETD-fmk for 1 h prior to treatment with STS for 24 h. (A) Immunoblot analysis of whole cell lysates for the detection of procaspase-8, -9 and -3 and their cleaved fragments plus Bid protein. PARP-1 cleavage was studied from nuclear fractions. (B) Cytosolic (cyto) and nuclear (nucl) fractions were immunoblotted using cyt c and AIF monoclonal antibodies. Numbers on the right indicate molecular masses in kDa. Results are representative of 3 independent experiments.



in the cytosol (Figure 6A, left panel). In $p53^{mt}$ C-33A cells, no significant difference in cyt c and AIF localization was observed whatever the treatment was (Figure 6A, right panel). Although PRIMA-1 had no effect on the localization of IMS apoptogenic proteins in HeLa cells (Figure 6B, left panel), it increased cyt c release and AIF nuclear translocation in C-33A cells during STS-induced apoptosis (Figure 6B, right panel). Taken together, these results suggest that the IMS protein traffic is very likely partly regulated by p53.

Discussion

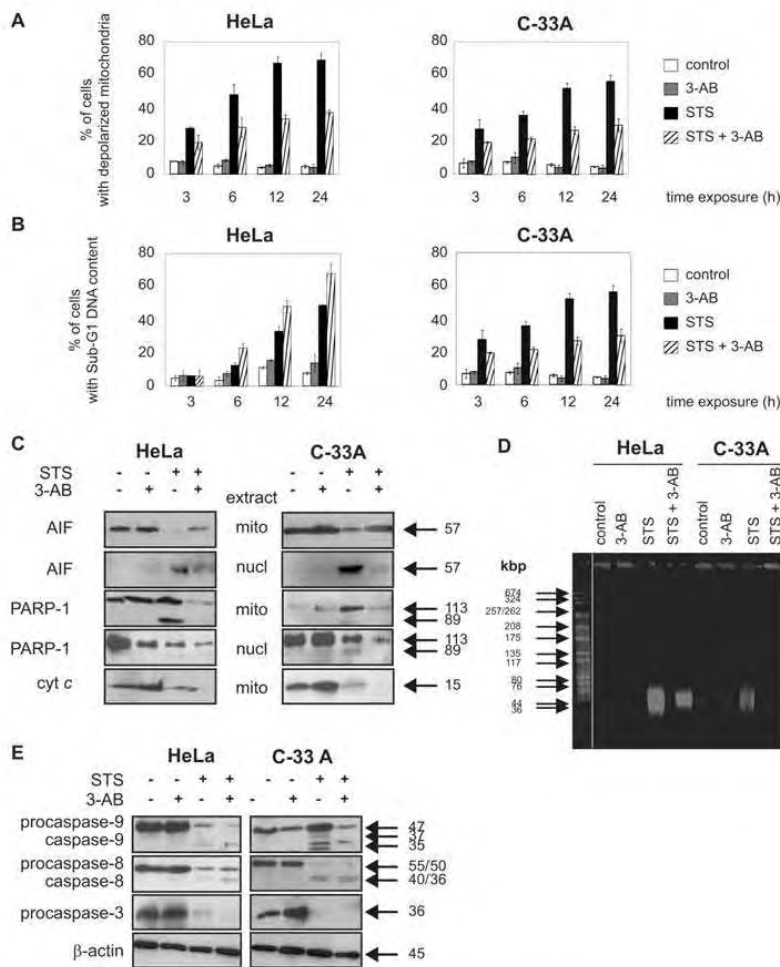
Upon induction of apoptosis in HeLa and C-33A cells with STS, we have reported that p53 translo-

cates to mitochondria whatever its status is (wild-type or mutated) and influences mitochondrial dysfunction, suggesting that activation of the mitochondrial pathway of apoptosis is triggered by the transcription-independent function of p53, that engages Bcl-2-family proteins (Charlot et al., 2004, 2006). Furthermore, it has been demonstrated that p53 can induce cell death via a caspase-mediated process and via a delayed caspase-independent mechanism (Cregan et al., 2002).

Here we show that mitochondria are at the cross-roads of at least two apoptotic pathways in both $p53^{wt}$ HeLa and $p53^{mt}$ C-33A tumour cell lines exposed to STS, a caspase-dependent apoptosis pathway with hierarchical activation of caspases depending on the cell type and a caspase-independent apoptosis pathway associated with mitochondrial PARP-1 activation and AIF mitochondria–nuclear translocation. Indeed, we have found that STS leads to the release of cyt c into the extramitochondrial environment and caspase activation; however, this occurs with different kinetics between $p53^{wt}$ cells and $p53^{mt}$ cells. Mitochondrial release of AIF followed by its nuclear translocation occurs with similar kinetics in both cell lines, but is not concurrent with cyt c release. We previously reported that the small molecule PFT- α , isolated as a suppressor of p53-mediated transactivation, has a protective effect against death of $p53^{wt}$ cervical cancer cells, suggesting a reduced binding of p53 to Bcl-2 and/or Bcl-xL proteins (Charlot et al., 2006). As observed in neuroblastoma SH-SY5Y cells (Yang and Tiffany-Castiglioni, 2008), PFT- α reduced the release of cyt c in $p53^{wt}$ HeLa cells, which supports the premise that p53 acts upstream of the mitochondrial intrinsic cascade in response to STS. PFT- α also decreases nuclear translocation of AIF in HeLa cells, which confirms that AIF translocation to nuclei may be partly p53 dependent as previously observed (Cregan et al., 2002; Seth et al., 2005; Wada et al., 2008). In C-33A cells, which are more resistant to apoptosis than HeLa cells, reactivation of the mutant p53 by PRIMA-1 exerts opposite effects. PRIMA-1, which increased the permeabilization of the mitochondrial membrane of C-33A cells exposed to STS (Charlot et al., 2006), results in increased cyt c release compared with cells treated with STS alone. A recent paper demonstrated that PRIMA-1^{MET}, which is more active than the original compound, is able to induce mutant-p53 loss of $\Delta\psi_m$, redistribution

Figure 5 | Effect of PARP-1 inhibition by 3-AB in HeLa and C-33A cells exposed to STS

Cells were harvested after exposure to 10 mM 3-AB, 300 nM STS or 300 nM STS plus 10 mM 3-AB for different time periods. (A) MitoTracker Red-stained cells were analysed by flow cytometry. (B) Propidium iodide-stained cells were assessed by FACS analysis. (C) Detection of AIF, PARP-1 and cyt *c* in mitochondrial (mito) and nuclear (nucl) fractions of cells exposed to 3-AB, STS or both for 24 h by Western blot. (D) Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of DNA degradation to ~50 kbp fragments in cells 24 h post-treatment with 3-AB, STS or both. Numbers on the left indicate fragment size in kbp. The DNA ladder and DNA extracts were run on the same gel. For clarification, the empty well between the ladder and extracts was deleted. (E) Whole lysates of cells treated for 24 h were immunoblotted with the indicated antibodies to detect the expression of procaspase-9, -8, and their cleaved fragments and procaspase-3. Blotting with β -actin was used as protein loading control. Numbers on the right in (C) and (E) indicate molecular masses in kDa. Results in (A) and (B) are the means \pm S.E.M. of 3 determinations. Results in (C), (D) and (E) are representative of 3 independent experiments.

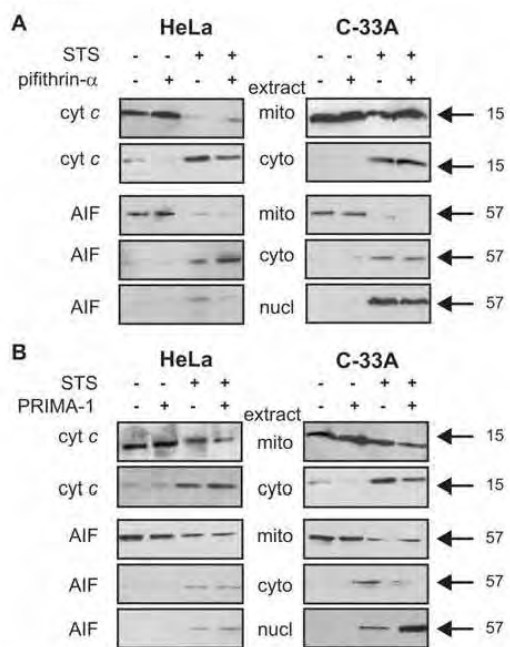


of cyt *c* and activation of caspases in H1299 cells alone (Shen et al., 2008). On the other hand, in the presence of PRIMA-1, C-33A cells would be able

to mobilize larger amounts of AIF to the nucleus (Figure 6B), giving rise to more efficient cell death (Charlot et al., 2006).

Figure 6 | Effects of PFT- α and PRIMA-1 on the expression of cyt *c* and AIF

HeLa and C-33A cells were treated for 24 h with a modulator of p53 activity, 300 nM STS or a combination of the two molecules. **(A)** Cells were pretreated for 12 h with 20 μ M PFT- α prior to the addition of STS. Mitochondrial (mito), cytosolic (cyto) and nuclear (nucl) fractions were immunoblotted with primary monoclonal antibodies raised against cyt *c* and AIF. **(B)** Cells were treated with 125 μ M PRIMA-1 in combination with STS. Subcellular fractions were immunoblotted with the indicated antibodies. Numbers on the right indicate molecular masses in kDa. Results are representative of 3 independent experiments.



As recently observed, our experimental data show a differential expression of caspases in both cell lines (Figure 1D), suggesting multiple alterations of the caspase pathways in cervical cancer (Atechaga-Ocampo et al., 2008). As a result of their genetic background, STS is able to activate distinct caspase cascades in cervical carcinoma cells. In p53^{wt} HeLa cells, STS causes cleavage of caspase-3 that coincides with cleavage of caspase-9 followed by cleavage of nuclear PARP-1. Caspase-8 activation, which occurs downstream of caspase-9 and -3 activation, probably functions as an amplifying effector mechanism of the mi-

tochondrial caspase cascade. Attenuation of nuclear PARP-1 cleavage in the presence of the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk, but not in the presence of the specific inhibitor of caspase-8, z-IETD-fmk, as well as attenuation of oligonucleosomal DNA fragmentation, points towards the major involvement of the caspase-9 pathway in the execution of STS-induced apoptosis of cervical adenocarcinoma-derived cells. In p53^{mt} C-33A cells, caspase-3 can be activated directly by caspase-8 and/or through t-Bid, which catalyses mitochondrial membrane permeabilization and cyt *c* release. Therefore, the requirement of t-Bid may explain the cyt *c* release at later time points. Prior treatment of C-33A cells with z-VAD-fmk has no effect on STS-induced propidium iodide-stained cells (Figure 3B). This indicates that caspase activity is not essential for STS-induced cell death in C-33A cells. Thus, the caspase-independent pathway may represent another way of killing p53-mutant cancer cells, as discussed below.

Moreover, partial reversion of the $\Delta\psi_m$ collapse induced by z-VAD-fmk might be explained by inhibition of initiator caspase-8 that could not truncate Bid anymore (Wei et al., 2001). In HeLa cells, the slight decrease of $\Delta\psi_m$ can be explained by inhibition of caspase-9 dimerization, which normally cleaves the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 (Chen et al., 2007). Caspase-3 and -7, two substrates of caspase-8 and -9, known to contribute to the loss of $\Delta\psi_m$ (Lakhani et al., 2006), might also be inactivated in both cell lines, but z-VAD-fmk does not affect cyt *c* release, which probably occurs via a caspase-independent mechanism, as mentioned previously (Li et al., 1997; Waterhouse et al., 2001).

Another objective of the present study was to gain insights into the role of AIF, considered to be one of the main caspase-independent death effectors (reviewed in Chipuk and Green, 2005; Kroemer and Martin, 2005). The release of AIF appears to occur after the release of cyt *c* and possibly as a consequence of mitochondrial depolarization during STS-mediated cell death in both carcinoma cell lines. It has previously been reported that AIF can be released from mitochondria simultaneously with, or even before, cyt *c* during STS-induced death of Rat-1 fibroblasts (Loeffler et al., 2001). The sequence of these events may therefore depend on the cell type. Furthermore, HeLa and C-33A cells exhibit high-molecular-mass DNA fragments migrating near to

or slightly ahead of the 50 kbp marker (Figure 5D). It was shown that such a DNA fragmentation was significantly less abundant in $p53^{-/-}$ cells (Stambolsky et al., 2006). Whether $p53$ may sensitize cells to caspase-independent death, little is known about the mechanisms which regulate AIF traffic. It has been recently demonstrated that Bid mediates mitochondrial release of AIF in glutamate-induced neuronal death (Landshamer et al., 2008). In addition, caspase-2 activation mediated by $p53$ is an important pathway for cisplatin-induced AIF mitochondrial release (Seth et al., 2005). In our experiments, inhibition of caspases by z-VAD-fmk failed to prevent STS-induced mitochondrio-nuclear translocation of AIF, as previously reported (Yu et al., 2002; Gallego et al., 2004). On the other hand, PARP-1 has been shown to be a key molecule in mediating AIF release (Yu et al., 2002). In addition to facilitating nuclear DNA repair, PARP-1 is also localized within mitochondria (Du et al., 2003). In our models, mitochondrial PARP-1 is expressed in untreated HeLa and C-33A cells and cleaved concomitantly with mitochondrial AIF release under STS exposure (Figure 2). In both cell lines, inhibition of PARP-1 by 3-AB prevents STS-induced mitochondrio-nuclear translocation of AIF, but not cyt *c* release and subsequent caspase activation, which is consistent with previous studies (Czapski et al., 2006; Du et al., 2003). 3-AB has no effect on STS-induced caspase activation, however, it significantly reduces the $\Delta\psi_m$ collapse, suggesting that PARP-1 is also implicated in mitochondrial membrane depolarization (Alano et al., 2004) by triggering the early mitochondrial depolarization that follows the mitochondrial calcium uptake (Abramov and Duchon, 2008). As observed in HL-60 cells during GL331-induced apoptosis (Kuo et al., 1998), 3-AB abrogates STS-induced fragmentation of nuclear DNA into high-molecular-mass fragments in C-33A cells (Figure 5D), a typical feature of stage I nuclear apoptosis, and decreases cleavage of DNA into oligonucleosomal fragments (reflected by the sub- G_1 DNA peak) (Figure 5B, right panel), a hallmark of stage II nuclear apoptosis. The protective effect of 3-AB indicates that PARP-1 is a key contributor to STS-induced programmed cell death in $p53^{mt}$ C-33A cells. In contrast, HeLa cells exposed to 3-AB are very sensitive to apoptosis in response to STS. Indeed, 3-AB increases STS-induced sub- G_1 DNA content (Figure 5B, left panel). This might be explained by the fact that nuc-

lear PARP-1 inhibition enhances deficient repair of DNA breaks, leading to accumulation of DNA damage, which results in a significant increase in the proteolysis of cell death substrates and DNA fragmentation (Munoz-Gamez et al., 2005), as observed in HeLa cells co-treated with an alkylating agent and the PARP-1 inhibitor ABT-888 (Liu et al., 2008). The molecular mechanism of PARP-1-induced cell death is still unclear. Some authors have identified interactions between PARP-1 and $p53$, irrespective of its status, in the induction of apoptosis (reviewed in Wesierska-Gadek et al., 2005). Overall, the results from the present study indicate that caspases and AIF may co-operate in the commitment of carcinoma cells to apoptosis induced by STS and their contribution depends on the cell type. They also indicate a likely role for mitochondrial $p53$, with regards to its status, which modulates cell sensitivity to STS. Finally, through the inhibition of the human checkpoint kinase 1 (Jackson et al., 2000), STS may increase the phosphorylation of $p53$ and thereby favours its stability, DNA binding and gain of function (Figure 7).

In conclusion, a better understanding of mitochondrial cell death pathways may provide insights into the sensitivity or resistance of cancer-derived cells and may be helpful for tumour cell chemotherapy.

Materials and methods

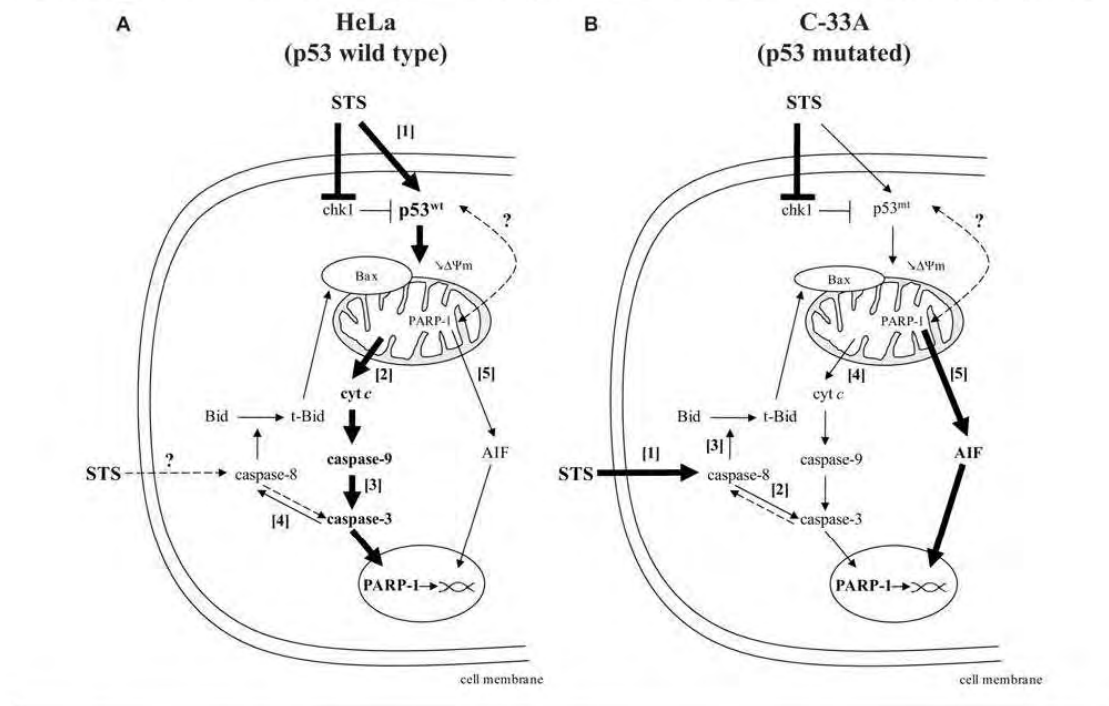
Cell lines and treatments

HeLa and C-33A cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, U.S.A.). HeLa cells are derived from a human cervical adenocarcinoma from a 31-year-old black female containing HPV18 (human papillomavirus 18) and carrying $p53^{wt}$, whereas C-33A cells are derived from a human squamous cervical carcinoma from a 66-year-old Caucasian female and do not contain HPV and overexpress $p53^{mt}$ on the DNA-binding domain at codon 273 (R273C), which is not competent for transcription (Yee et al., 1985; Scheffner et al., 1991). HeLa cells were grown in EMEM (Eagle's minimal essential medium; Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 5% foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 5% penicillin/streptomycin in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37°C. C-33A cells were grown in the same medium as HeLa cells supplemented with 5% sodium pyruvate.

Exponentially growing cells were seeded in fresh medium (at approx 30 to 40% confluence) 24 h prior to treatment (Bernard et al., 2001). Then, cells were treated with 300 nM STS (Sigma, St Quentin-Fallavier, France) for the indicated times. For co-treatments, 100 μ M z-VAD-fmk (Sigma) or 100 μ M z-IETD-fmk (Bachem, Weil am Rhein, Germany) were added 1 h prior to STS, 20 μ M PFT- α (Tebu Bio, Le Perray en Yvelines, France) was added 12 h prior to STS and 10 mM 3-AB (Sigma) or 125 μ M PRIMA-1 (Tebu Bio) was administered simultaneously

Figure 7 | A proposed model for the events in STS-induced apoptosis of cervical carcinoma cells

In both cell lines, STS can inhibit the human checkpoint kinase 1 (Chk 1) (Jackson et al., 2000) that activates p53. The resulting p53 phosphorylations on Ser¹⁵, located outside of the DNA-binding domain, increase p53 stability, DNA binding and gain of function and constitute a critical step for p53-induced apoptosis. **(A)** In p53^{wt} and STS-highly sensitive HeLa cells, the classical caspase cascade predominates. STS induces an early mitochondrial translocation of p53 [1], which acts upstream of Bax oligomerization and $\Delta\psi_m$ dissipation. This results in cyt c release [2], followed by caspase-9 activation, then caspase-3 activation [3], leading to nuclear PARP-1 cleavage. Caspase-3 may further amplify apoptosis by activating caspase-8 [4]. As a result of mitochondrial PARP-1-mediated cell death, AIF is translocated from mitochondria to the nucleus where it induces DNA fragmentation [5]. **(B)** In p53^{mt} and STS-less sensitive C-33A cells, STS activates firstly caspase-8 [1], which directly processes caspase-3 [2]. Moreover, caspase-8 cleaves Bid [3], and the produced t-Bid translocates into mitochondria to oligomerize Bax. Translocation of t-Bid and delayed p53 mitochondrial translocation could explain the delayed cyt c release and subsequent caspase cascade [4]. On the other hand, the PARP-1/AIF-mediated cell death pathway appears to be the predominant pathway involved in this model [5].



with STS. After treatment for the indicated times, cells were harvested by trypsination (Lonza) and processed for analysis.

Flow cytometry analysis

For measurement of $\Delta\psi_m$, cells were resuspended in 200 nM MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) diluted in EMEM and incubated at 37°C for 30 min. Then cells were washed with PBS, centrifuged and resuspended in PBS for flow cytometry analysis. The percentage of cells with depolarized mitochondria was furthermore calculated.

For sub-G₁ DNA content analysis, cells were resuspended and fixed overnight in 70% (v/v) ice-cold ethanol. Fixed cells were washed 3 times with ice-cold PBS before the addition of staining solution (PBS, 1 mg/ml RNase A DNase-free and 10 µg/ml propidium iodide) for 30 min.

Cells were analysed on a FACScan Epics[®] Altra flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, U.S.A.). A minimum of 10000 events were collected for each sample. The analyses performed on a gated cell population in order to discard cellular debris were conducted using the expo-32 software.

Isolation of cytosol, mitochondrial and nuclear fractions

Cells were resuspended in 1 ml of cytosol extraction buffer (Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit, BioVision, Mountain View, CA, U.S.A.). After 30 min, cells were homogenized with a grinder on ice and centrifuged at 700 g for 10 min at 4°C to separate intact cells and nuclei from the first supernatant, designated S1. The pellet was resuspended in 100 µl of nuclear buffer [500 mM KCl, 25 mM Hepes, pH 7.8, 1 mM PMSF, 100 µl DTT (dithiothreitol) and 10% glycerol] and centrifuged

at 20 000 *g* for 10 min at 4°C. The obtained supernatant, designated S2, represented the nuclear fraction. The S1 fraction was centrifuged at 10 000 *g* for 30 min at 4°C: the obtained supernatant (S3) corresponded to the cytosolic fraction, and the pellet resuspended in 100 µl of mitochondria extraction buffer (Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit, BioVision) represented the mitochondrial fraction. The purity of each subcellular fraction was checked by the detection of COXIV, β-actin, and HDAC-3 as specific markers for mitochondria, cytosol and nucleus respectively.

Immunoblotting

Briefly, the protein concentration of whole cell lysates obtained by disrupting cells in RIPA lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% Na deoxycholate and 1 mM EDTA) as well as that of mitochondrial, cytosolic and nuclear extracts was determined by the Bio-Rad Protein Assay® (Bio-Rad). Except for total lysates from experiments using caspase and PARP-1 inhibitors for which 70 µg of protein was used, a total of 30 µg of protein was boiled in Laemmli's buffer (BioRad) supplemented with 5% 2-mercaptoethanol, subjected to SDS electrophoresis and transferred to Hybond™-P membranes (GE Healthcare Lifesciences, Saclay, France). Blots were incubated for 90 min with the appropriate primary antibodies and further incubated for 1 h with horseradish-peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG antibodies (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.). Proteins were revealed by chemiluminescence using the ECL® (enhanced chemiluminescence) Plus reagent system (GE Healthcare). The primary antibodies were mouse monoclonal antibodies, diluted at 1:500 except when indicated, were: cyt *c* (clone 7H8.2C12, Pharmingen), AIF (clone E-1, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.), procaspase-9 and cleaved fragments (rabbit polyclonal, #9502, Cell Signaling, Danvers, MA, U.S.A.), procaspase-3 and cleaved fragments (rabbit polyclonal, clone AAP-113, Stressgen, Ann Arbor, MI, U.S.A.), procaspase-8 and cleaved fragments (clone 3-1-9, Pharmingen), PARP-1 (clone 4C10-5, Pharmingen) and Bid (rabbit polyclonal, #2002, Cell Signaling). Equal loading was verified with an antibody against COXIV (1:1000; clone 20E8-C12, Molecular Probes Europe), β-actin (1:10000; clone AC-15, Sigma) and HDAC-3 (1:1000; rabbit polyclonal, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, U.S.A.).

Pulsed-field gel electrophoresis

Cells were washed twice in PBS. DNA was extracted using the QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. DNA samples were transferred into agarose plugs. Pulsed-field gel electrophoresis was carried out using a CHEF-DR III PFGE system® (Bio-Rad). High-molecular-mass DNA fragments were separated on a 1% agarose gel at 14°C for 20 h in 0.5× Tris-Borate EDTA. Field strength was 6 V/cm; initial and final switching times were set at 5–60 s with a 120° angle ramp. DNA was stained with ethidium bromide and visualized under a UV light source and photographed with the Bio-Rad Geldoc quantity program.

Acknowledgements

We would like to thank Adeline Lavoignat for technical support.

Funding

This work was supported by grants from Ligue Contre le Cancer (Département du Doubs) and from Cancéropôle Grand-Est. M.N. was supported by a fellowship from Ville de Besançon and A.-Z. D.-B. by Institut National du Cancer. The present study forms part of the Ph.D. thesis by M. N. from the University of France-Comté.

References

- Abramov, A.Y. and Duchon, M.R. (2008) Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 953–964.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X. and Akey, C.W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* **9**, 423–432.
- Alano, C.C., Ying, W. and Swanson, R.A. (2004) Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **279**, 18895–18902.
- Arechaga-Ocampo, E., Pereira-Suarez, A.L., del Moral-Hernandez, O., Cedillo-Barron, L., Rodriguez-Sastre, M.A., Castillo-Alvarez, A., Lopez-Bayghen, E. and Villegas-Sepulveda, N. (2008) HPV+ cervical carcinomas and cell lines display altered expression of caspases. *Gynecol. Oncol.* **108**, 10–18.
- Bernard, B., Fest, T., Pretet, J.L. and Mougou, C. (2001) Staurosporine-induced apoptosis of HPV positive and negative human cervical cancer cells from different points in the cell cycle. *Cell. Death Differ.* **8**, 234–244.
- Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., Garrido, C. et al. (2004) AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* **23**, 1514–1521.
- Charlot, J.F., Pretet, J.L., Haughey, C. and Mougou, C. (2004) Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* **9**, 333–343.
- Charlot, J.F., Nicolier, M., Pretet, J.L. and Mougou, C. (2006) Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and pifithrin- α on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* **11**, 813–827.
- Chen, M., Guerrero, A.D., Huang, L., Shabier, Z., Pan, M., Tan, T.H. and Wang, J. (2007) Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic BCL-2 family members. *J. Biol. Chem.* **282**, 33888–33895.
- Chipuk, J.E. and Green, D.R. (2005) Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 268–275.
- Cregan, S.P., Fortin, A., MacLaurin, J.G., Callaghan, S.M., Ceccconi, F., Yu, S.W., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Park, D.S., Kroemer, G. and Slack, R.S. (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol.* **158**, 507–517.
- Czapowski, G.A., Cakala, M., Gajkowska, B. and Strosznajder, J.B. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition protects the brain against systemic inflammation. *Neurochem. Int.* **49**, 751–755.
- Daniel, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205–219.

- Du, L., Zhang, X., Han, Y.Y., Burke, N.A., Kochanek, P.M., Watkins, S.C., Graham, S.H., Carcillo, J.A., Szabo, C. and Clark, R.S. (2003) Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **278**, 18426–18433
- Fearnhead, H.O., Rodriguez, J., Govek, E.E., Guo, W., Kobayashi, R., Hannon, G. and Lazebnik, Y.A. (1998) Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13664–13669
- Gallego, M.A., Joseph, B., Hemstrom, T.H., Tamiji, S., Mortier, L., Kroemer, G., Formstecher, P., Zhivotovskiy, B. and Marchetti, P. (2004) Apoptosis-inducing factor determines the chemoresistance of non-small-cell lung carcinomas. *Oncogene* **23**, 6282–6291
- Heeres, J.T. and Hergenrother, P.J. (2007) Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 644–653
- Jackson, J.R., Gilmartin, A., Imburgia, C., Winkler, J.D., Marshall, L.A. and Roshak, A. (2000) An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage. *Cancer Res.* **60**, 566–572
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J. and Schlesinger, P.H. (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* **7**, 1166–1173
- Kroemer, G. and Martin, S.J. (2005) Caspase-independent cell death. *Nat. Med.* **11**, 725–730
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**, 99–163
- Kuo, M.L., Shen, S.C., Yang, C.H., Chuang, S.E., Cheng, A.L. and Huang, T.S. (1998) Bcl-2 prevents topoisomerase II inhibitor GL331-induced apoptosis is mediated by down-regulation of poly(ADP-ribose)polymerase activity. *Oncogene* **17**, 2225–2234
- Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter, Jr, G.A., Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I. and Flavell, R.A. (2006) Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* **311**, 847–851
- Landshamer, S., Hoehn, M., Barth, N., Duvezin-Caubet, S., Schwake, G., Tobaben, S., Kazhdan, I., Becattini, B., Zahler, S., Vollmar, A. et al. (2008) Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. *Cell Death Differ.* **15**, 1553–1563
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**, 175–184
- Liu, X., Luo, X., Shi, Y., Zhu, G.D., Penning, T., Giranda, V.L. and Luo, Y. (2008) Poly (ADP-ribose) polymerase activity regulates apoptosis in HeLa cells after alkylating DNA damage. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 934–941
- Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Metivier, D., Nieminen, A.L., Brothers, G., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (2001) Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J.* **15**, 758–767
- Marchenko, N.D., Zaika, A. and Moll, U.M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 16202–16212
- Munoz-Gamez, J.A., Martin-Oliva, D., Aguilar-Quesada, R., Canuelo, A., Nunez, M.I., Valenzuela, M.T., Ruiz de Almodovar, J.M., De Murcia, G. and Oliver, F.J. (2005) PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem. J.* **386**, 119–125
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. et al. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37–43
- Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J.C. and Howley, P.M. (1991) The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5523–5527
- Seth, R., Yang, C., Kaushal, V., Shah, S.V. and Kaushal, G.P. (2005) p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *J. Biol. Chem.* **280**, 31230–31239
- Shen, J., Vakifahmetoglu, H., Stridh, H., Zhivotovskiy, B. and Wiman, K.G. (2008) PRIMA-1(MET) induces mitochondrial apoptosis through activation of caspase-2. *Oncogene* **27**, 6571–6580
- Stambolsky, P., Weisz, L., Shats, I., Klein, Y., Goldfinger, N., Oren, M. and Rotter, V. (2006) Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death Differ.* **13**, 2140–2149
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M. et al. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441–446
- Wada, T., Pippin, J.W., Nangaku, M. and Shankland, S.J. (2008) Dexamethasone's prosurvival benefits in podocytes require extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Nephron Exp. Nephrol.* **109**, e8–e9
- Waterhouse, N.J., Goldstein, J.C., von Ahnen, O., Schuler, M., Newmeyer, D.D. and Green, D.R. (2001) Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J. Cell Biol.* **153**, 319–328
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727–730
- Wesierska-Gadek, J., Ranftler, C. and Schmid, G. (2005) Physiological ageing: role of p53 and PARP-1 tumor suppressors in the regulation of terminal senescence. *J. Physiol. Pharmacol.* **56** (Suppl 2), 77–88
- Yang, W. and Tiffany-Castiglioni, E. (2008) Paraquat-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: involvement of p53 and mitochondria. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* **71**, 289–299
- Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C.C., Schlegel, R. and Howley, P.M. (1985) Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.* **119**, 361–366
- Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M. and Dawson, V.L. (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**, 259–263
- Yu, S.W., Andrabi, S.A., Wang, H., Kim, N.S., Poirier, G.G., Dawson, T.M. and Dawson, V.L. (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 18314–18319

Received 8 September 2008/10 February 2009; accepted 13 February 2009

Published as Immediate Publication 13 February 2009, doi:10.1042/BC20080164

3. Résultats non publiés

En parallèle à l'analyse protéique par western-blotting de la localisation sub-cellulaire du cyt c et de l'AIF, nous avons mis au point une technique de marquage immunocytochimique. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressée au choix du fluorochrome le plus adapté pour les mitochondries (NAO vs MT) ainsi qu'à celui couplé à l'anticorps secondaire chargé de fixer l'anticorps primaire anti-cyt c ou anti-AIF.

3.1. Choix du marqueur mitochondrial

Parallèlement à l'optimisation des marquages du cyt c et de l'AIF, deux marquages mitochondriaux ont été réalisés, respectivement au NAO et au MT (Figure 36).

Les mitochondries des cellules HeLa non traitées ont été marquées en présence de 1 μ M de NAO qui possède une fluorescence spécifique située dans le vert ou de 20 nM de MT qui fluoresce dans le rouge.

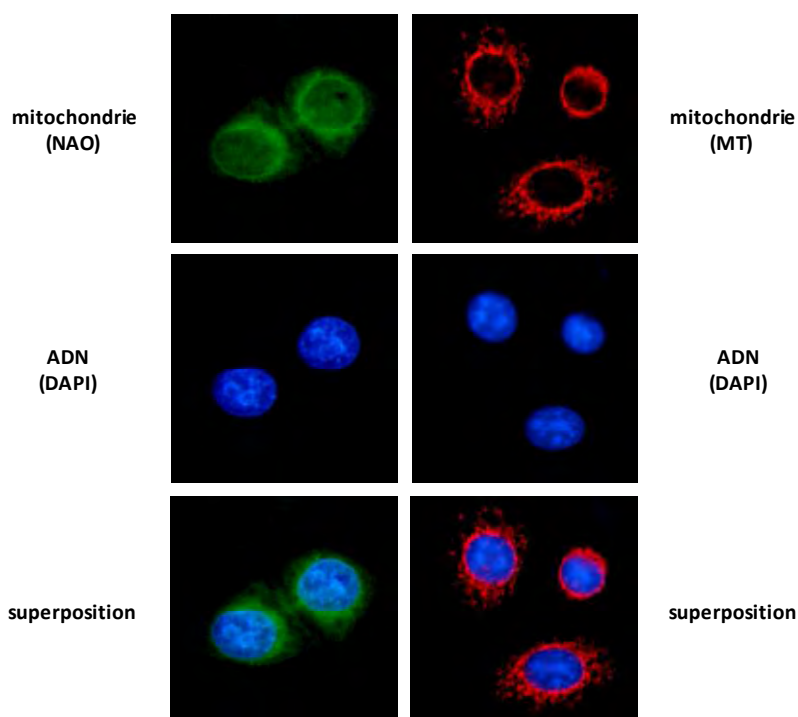


Figure 36 : Marquage au NAO vs MT des mitochondries de cellules HeLa non traitées.

L'ADN nucléaire est marqué par 5 μ g/ml de DAPI.

Les plans présentés sont les plus représentatifs de chaque condition.

Les résultats obtenus (Figure 36) montrent clairement que le signal spécifique du marquage mitochondrial au MT apparaît plus ponctué et plus intense que le marquage au NAO. De plus, le choix du MT pour la suite de cette étude a été conforté par le fait que i) ce dernier a une fluorescence beaucoup plus stable dans le temps que le NAO et ii) la révélation du marquage au

cyt c avec l'anticorps secondaire couplé à Alexa 488 est de bien meilleure qualité qu'avec l'anticorps secondaire couplé au TRITC (Figure 37).

3.2. Choix du fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire

Deux types de fluorochromes de même longueur d'onde d'excitation couplés à l'anticorps secondaire anti-IgG de souris ont été testés. D'une part le TRITC dont la fluorescence maximale se situe dans le rouge à 527 nm et d'autre part, Alexa 488 dont le spectre d'émission se localise dans le vert à 519 nm.

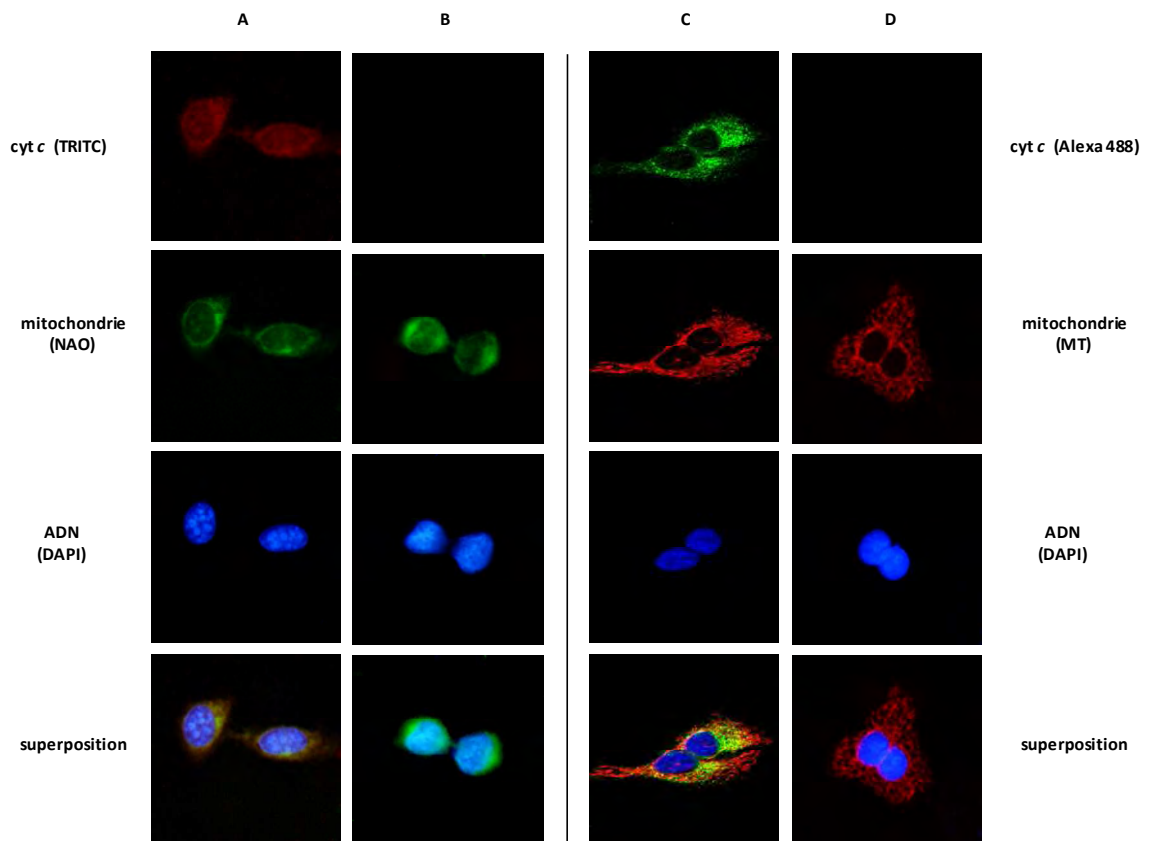


Figure 37 : Comparaison de l'émission de fluorescence du TRITC et d'Alexa 488 couplé à l'anticorps secondaire anti-IgG de souris (A et C) dans des cellules HeLa non traitées. Les plans présentés sont les plus représentatifs de chaque condition. Les témoins négatifs (B et D) subissent le même traitement sans l'incubation avec l'anticorps primaire anti-cyt c. Les mitochondries sont marquées respectivement au NAO (A et B) ou au MT (C et D) et l'ADN nucléaire est marqué au DAPI.

Pour cette étude, les cellules HeLa ont subi une première incubation avec l'anticorps primaire anti-cyt c dilué au 1/100° puis un lot de cellules a ensuite été marqué avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au TRITC ou à l'Alexa 488 dilué à 1/100°.

Les résultats obtenus (Figure 37) montrent que le meilleur marquage est obtenu avec l'anticorps secondaire couplé à Alexa 488. En effet, ce dernier marquage est plus lumineux et moins diffus que celui au TRITC.

Ainsi, la technique immunocytochimique choisie pour notre étude est un triple marquage i) des mitochondries avec 20 nM de MT, ii) du cyt c ou de l'AIF par un anticorps primaire spécifique (1/100), lequel est reconnu par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (1/100) et iii) l'ADN nucléaire par 5 µg/ml de DAPI.

3.3. Localisation intra-cellulaire du cyt c au cours de l'apoptose induite par la STS

Le triple marquage précédemment optimisé a été réalisé sur des cellules HeLa et C-33A stimulées ou non au cours du temps par 300 nM de STS.

Dans les cellules non stimulées, la visualisation d'une ceinture jaune-orangée (addition du rouge et du vert) localisée au niveau des mitochondries reflète la localisation mitochondriale du cyt c (Figure 38). Cette observation est en adéquation avec nos observations obtenues par western-blotting (Publication n°2). En effet, dans les conditions non apoptotiques, le cyt c se localise principalement au niveau de cet organelle et ce, quelles que soient les cellules, HeLa ou C-33A.

Par contre, dès 1 à 2h de traitement, la fluorescence d'Alexa 488 semble plus diffuse dans les cellules HeLa (Figure 38A), ce qui reflète une libération du cyt c de la mitochondrie au profit du cytosol. La présence de cyt c dans le cytosol des cellules HeLa est marquée dès 4h de traitement où l'on voit clairement une fluorescence verte. Ces résultats corroborent ceux obtenus par western-blotting. En effet, nous avons observé que le cyt c est présent dans le cytosol des cellules HeLa dès 30 min de traitement par la STS et qu'une diminution importante du pool mitochondrial de cyt c est observé à partir de 4h d'induction d'apoptose par la STS.

De plus, l'analyse protéique par western-blotting nous a montré que la libération du cyt c dans les cellules C-33A est retardée par rapport à celle observée dans les cellules HeLa. L'analyse immunocytochimique confirme ces résultats (Figure 38B). En effet, jusqu'à 4h de traitement, la fluorescence verte émise par Alexa 488 et représentant le cyt c est très prononcée au niveau des mitochondries, ce qui est mis en évidence par la formation d'une ceinture jaune-orangée due à la superposition du vert et du rouge. Au-delà de 4h, par contre, la fluorescence verte est plus diffuse, traduisant la localisation du cyt c dans les cellules C-33A au niveau du cytosol.

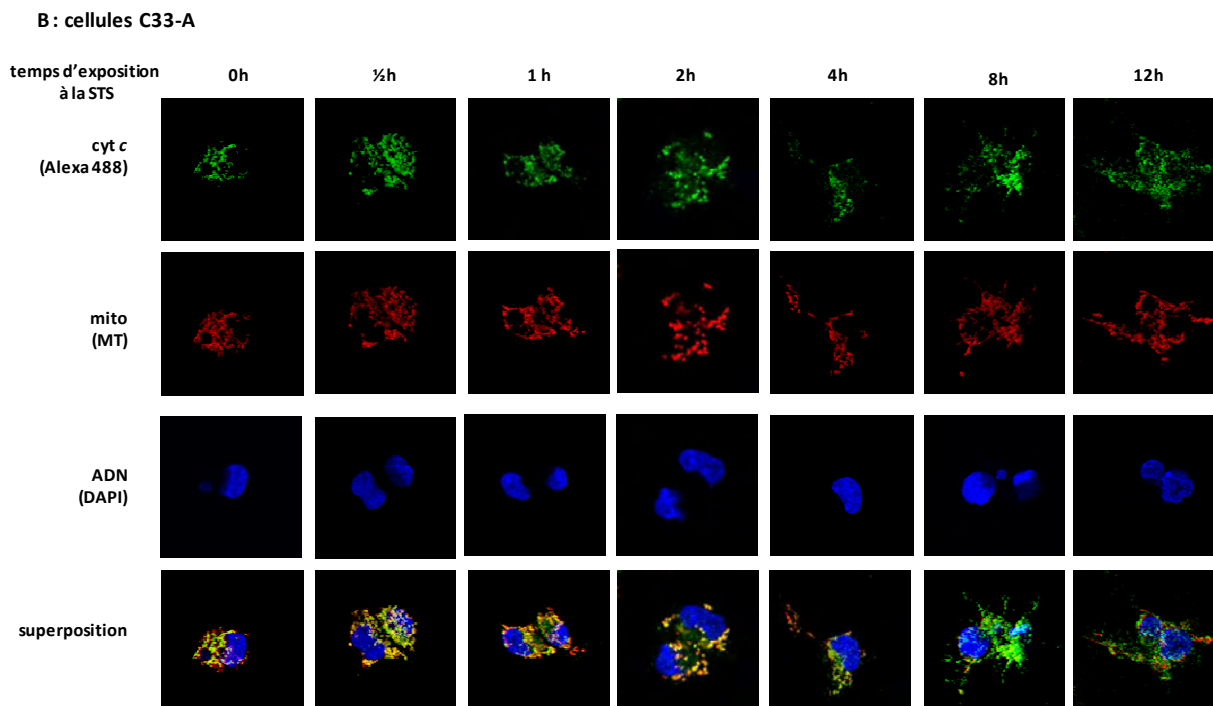
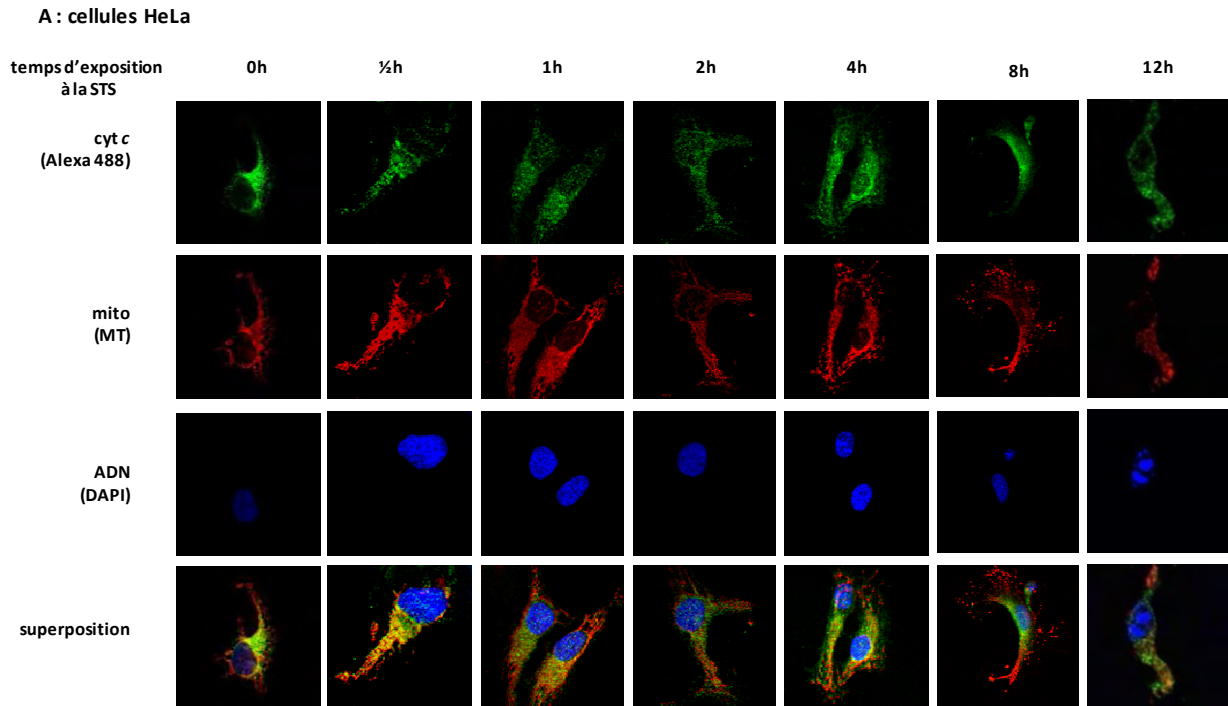


Figure 38 : Localisation sub-cellulaire du cyt c dans des cellules HeLa **(A)** et C-33A **(B)** traitées par de la STS. Le cyt c est marqué par la fluorescence verte d'Alexa 488, les mitochondries par le MT (rouge) et l'ADN nucléaire par le DAPI (bleu). Les plans présentés sont les plans les plus représentatifs de chaque condition.

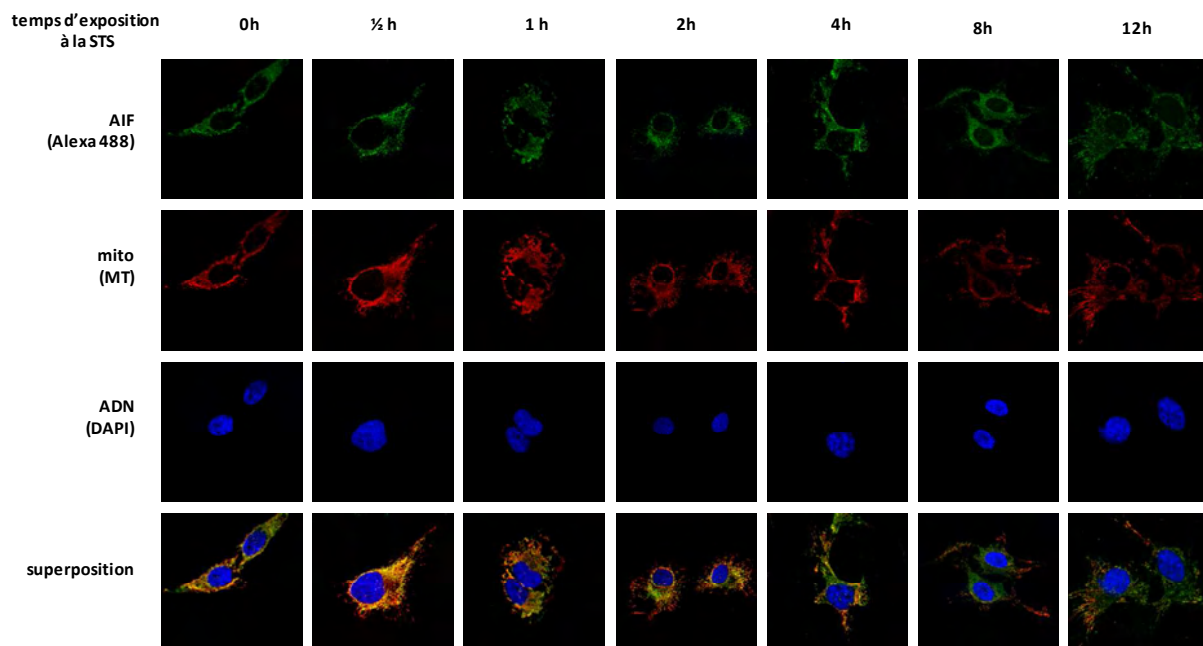
3.4. Localisation intra-cellulaire de l'AIF au cours de l'apoptose induite par la STS

Le triple marquage précédemment optimisé a été aussi réalisé sur des cellules HeLa et C-33A afin d'observer la localisation intra-cellulaire de l'AIF, autre facteur apoptogène, au cours de l'apoptose induite par la STS.

Comme pour le *cyt c* précédemment, dans les cellules non stimulées, la visualisation d'une ceinture jaune-orangée (addition du rouge et du vert) localisée au niveau des mitochondries reflète la localisation mitochondriale de l'AIF (Figure 39). Cette observation est en adéquation avec nos résultats obtenus par western-blotting (Publication n°2). En effet, dans les conditions non apoptotiques, l'AIF se localise principalement au niveau de cet organe et ce, quelles que soient les cellules, HeLa ou C-33A.

Dans les deux lignées cellulaires, la ceinture jaune-orangée est présente jusqu'à 2h d'induction de l'apoptose par la STS, ce qui traduit la localisation mitochondriale de l'AIF. Par contre, dès 4h, la fluorescence d'Alexa 488 semble plus diffuse dans les cellules HeLa (Figure 39A) ainsi que dans les cellules C-33A (Figure 39B), et cet effet est accru à 8 et 12h de traitement. Par la suite, la fluorescence verte semble être localisée au niveau du noyau [8-12 h pour les cellules HeLa (Figure 39A) vs 12 h pour les cellules C-33A (Figure 39B)]. Ainsi, l'analyse immunocytochimique montre que pour les deux lignées cellulaires, l'AIF est libérée de la mitochondrie au profit du cytosol à partir de 4h de traitement par la STS, avant de gagner le noyau, ce qui est en totale adéquation avec l'analyse par western-blotting (Publication n°2).

A : cellules HeLa



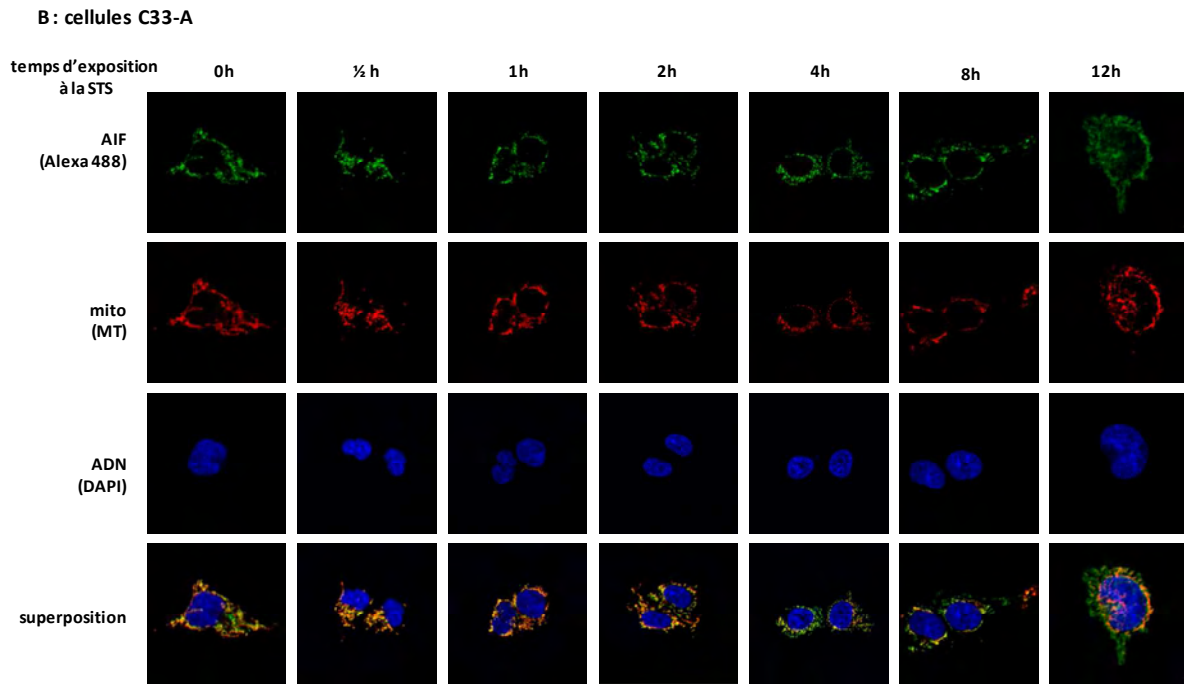


Figure 39 : Localisation sub-cellulaire de l'AIF dans des cellules HeLa (A) et C-33A (B) traitées par de la STS. L'AIF est marquée par la fluorescence verte d'Alexa 488, les mitochondries par le MT (rouge) et l'ADN nucléaire par le DAPI (bleu). Les plans présentés sont les plans les plus représentatifs de chaque condition.

Ainsi, l'analyse immunocytochimique corrobore les résultats obtenus par western-blotting (Publication n°2) concernant la localisation intra-cellulaire du cyt c et de l'AIF au cours de l'apoptose induite par la STS.

Partie 4

Discussion et Perspectives

Le cancer du col de l'utérus est le second cancer le plus fréquent chez la femme avec près de 500 000 nouveaux cas annuels dans le monde. Malgré une nouvelle ère vaccinale avec les vaccins prophylactiques, des femmes seront toujours infectées et développeront pour certaines un cancer, cancer conduisant actuellement à plus de 200 000 décès par an (Bosch *et al.*, 1995 ; Parkin *et al.*, 2006). En effet une partie de la population trop âgée ou résidente dans des pays sans campagne vaccinale ne sera pas vaccinée. De plus, selon les types d'HPV impliqués, ces vaccins peuvent être impuissants. Face à l'efficacité limitée des traitements actuels classiques et des vaccins thérapeutiques, il est donc nécessaire de développer de nouvelles chimiothérapies.

En se basant sur différents modèles d'étude, notre travail de thèse a permis d'avancer des arguments quant à la possible utilisation de la staurosporine (STS) pour le traitement des cancers du col de l'utérus. Ainsi nous discuterons de la manière dont la STS, molécule inhibitrice de nombreuses protéines kinases et anti-proliférative (Gescher, 2000), entraîne la mort de lignées cellulaires dérivant de cancer du col de l'utérus.

Nous avons utilisé dans notre principale étude la lignée cellulaire HeLa dérivant d'un adénocarcinome du col de l'utérus et abritant un HPV, comme la quasitotalité des cancers du col de l'utérus (Bosch *et al.*, 1995 ; Walboomers *et al.*, 1999). Cette lignée est infectée par l'HPV18, l'un des deux HPV les plus fréquemment impliqués dans la carcinogenèse épithéliale et elle est caractérisée par un faible niveau d'expression de la protéine gardienne du génome p53, sous forme sauvage. Nous nous sommes aussi intéressée à la lignée cellulaire C-33A qui dérive d'un carcinome du col de l'utérus. Non infectée par HPV, cette lignée abrite une protéine p53 mutée au niveau de son domaine de liaison à l'ADN. Cette mutation, retrouvée dans plus de 60% des cancers autres que celui du col de l'utérus, rend la protéine p53 inapte au niveau transcriptionnel.

Notre équipe a montré qu'un traitement par 300 nM de STS pendant 24 h permet d'induire la mort par apoptose de cellules dérivées de cancer du col de l'utérus. Selon le statut HPV des différentes lignées, cette apoptose s'effectue à différentes phases du cycle cellulaire : en phase G₂/M pour les cellules HeLa (p53^{wt} HPV⁺) et en phase G₁ pour les cellules C-33A (p53^{mt} HPV) (Bernard *et al.*, 2001). De plus, les cellules HeLa sont davantage sensibles à l'apoptose induite par la STS que les cellules C-33A, plus résistantes (Charlot *et al.*, 2004).

Notre équipe a aussi observé que le traitement par la STS entraîne, dans les cellules infectées par HPV, une diminution de l'expression des oncogènes viraux, E6 et E7 (Bernard *et al.*, 2003). Ces oncogènes sont impliqués dans l'immortalisation et la transformation tumorale des cellules infectées et ce, en interférant avec diverses protéines, notamment deux protéines suppresseurs de tumeurs, respectivement p53 et pRb, qu'elles inactivent. Le traitement par la STS s'accompagne aussi d'une diminution de l'ubiquitine ligase MDM2, qui réduit la dégradation de p53 et favorise son accumulation. Tout ceci permet *in fine* l'augmentation de l'expression de la protéine p53 (Bernard *et al.*, 2003). Dans les cellules dépourvues d'HPV, la STS entraîne aussi l'augmentation de l'expression de p53. Cette augmentation de p53 peut être due à l'inhibition de la protéine kinase Chk1 par la STS (Jackson *et al.*, 2000). En effet, en inhibant Chk1, UCN-01, analogue de la STS, entraîne la phosphorylation et donc l'activation de la protéine p38 MAPK, ce qui résulte en la phosphorylation de p53 au niveau des sérines 15 et 46 (Vitale *et al.*, 2008). Ces phosphorylations augmentent la stabilité de p53, ce qui facilite ainsi son activité transcriptionnelle (dans le modèle HeLa en

particulier) et l'activité apoptotique indépendante de son activité transcriptionnelle (dans les deux modèles).

L'apoptose étant le mécanisme ultime d'élimination des cellules dont les lésions génomiques sont trop importantes, nous avons souhaité étudier le mécanisme d'action de la STS sur l'apoptose mitochondriale. Pour ce faire, nous nous sommes intéressée à trois éléments clés de cette voie : la protéine p53 et deux facteurs apoptogènes libérés de la mitochondrie, le *cyt c* et l'AIF.

Grâce à sa fonction transcriptionnelle, p53 inhibe la synthèse de protéines cibles, telles que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL et favorise la synthèse d'autres protéines telles que p21, Bax ou PUMA. Dans certains modèles, p53 favorise aussi la synthèse de Fas, résultant en l'activation de la voie des récepteurs de mort (Hougardy *et al.*, 2005). En effet, les cellules HeLa sont partiellement sensibles à l'apoptose induite par un agoniste qui mime l'effet de FasL alors que les cellules C-33A sont résistantes, la résistance est probablement liée au défaut de la fonction transcriptionnelle de p53.

En plus de son activité transcriptionnelle, suite à un stimulus apoptotique la protéine p53 gagne la mitochondrie (Marchenko *et al.*, 2000) où elle interagit avec les membres de la famille Bcl-2 (Marchenko *et al.*, 2000 ; Mihara *et al.*, 2003 ; Mihara et Moll, 2003 ; Leu *et al.*, 2004) facilitant l'activité pro-apoptotique des protéines Bax et Bak. La protéine p53 interagit avec Bcl-xL, cette dernière ne peut donc plus séquestrer Bax et/ou Bak (Mihara *et al.*, 2003 ; Mihara et Moll, 2003). Quant à PUMA, une autre cible de p53, elle active Bax et/ou Bak provoquant la dépolarisation de la membrane mitochondriale (Jeffers *et al.*, 2003 ; Villunger *et al.*, 2003) et fixe Bcl-xL, ce qui libère p53. p53 interagit alors avec Bax, favorisant son changement conformationnel. Ce changement de conformation est un prérequis nécessaire à son insertion mitochondriale permettant ainsi la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Bax et Bak sont aussi activés *via* d'autres facteurs tels que Bid, Bim (Letai *et al.*, 2002). En accord avec les résultats décrits dans la littérature (Erster *et al.*, 2004 ; Erster et Moll, 2005 ; Zhao *et al.*, 2005), notre équipe a montré la translocation précoce de p53 à la mitochondrie, à savoir 30 min après l'induction de l'apoptose par la STS dans les cellules HeLa et 1 h dans les cellules C-33A (Charlot *et al.*, 2004). Cette translocation est favorisée par la mono-ubiquitylation de p53 par MDM2 (Marchenko *et al.*, 2007). Cette activité mitochondriale i) précède sa localisation nucléaire et donc son activité transcriptionnelle et ii) est indépendante de son activité transcriptionnelle (Marchenko *et al.*, 2000). L'activité mitochondriale de p53 est ainsi considérée comme un marqueur d'une apoptose dépendante de p53 (Marchenko *et al.*, 2000 ; Mihara *et al.*, 2003 ; Chipuk *et al.*, 2005). *In vivo*, Erster *et al.* ont montré que seule, l'activité mitochondriale de p53 est suffisante pour entraîner l'apoptose de cellules tumorales (Erster et Moll, 2004).

Le déclenchement de la voie apoptotique mitochondriale est caractérisé par la formation et/ou l'ouverture de pores membranaires associées ou non à la dépolarisation de la membrane mitochondriale. Ceci permet la libération de la mitochondrie au profit du cytosol de facteurs apoptogènes, notamment le *cyt c* et l'AIF. Tout ceci aboutit *in fine* à la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN, témoin de la mort de la cellule.

Nos travaux de thèse ont confirmé que l'apoptose induite par la STS est dépendante de p53. En effet, dans les cellules C-33A abritant une p53 mutée (R273C), PRIMA-1, petite molécule qui restaure le domaine de liaison à l'ADN des protéines p53 mutées à ce niveau, réactive l'activité

transcriptionnelle de p53 et augmente efficacement l'apoptose induite par la STS (Charlot *et al.*, 2006). En effet, les cellules C-33A traitées par STS + PRIMA-1 présentent un taux d'apoptose (observé par le pourcentage de cellules ayant des membranes mitochondriales dépolarisées ainsi que le pourcentage de cellules dont l'ADN est fragmenté) comparable à celui observé dans les cellules HeLa traitées uniquement par la STS. Par ailleurs, nous avons observé que dans les cellules C-33A, l'ajout de PRIMA-1 facilite la libération mitochondriale du cyt *c* ainsi que la translocation nucléaire de l'AIF (Nicolier *et al.*, 2009). Cet effet sur la libération du cyt *c* est en accord avec les travaux de Shen *et al.*, qui montrent que PRIMA-1^{MET}, analogue plus actif de PRIMA-1 (Bykov *et al.*, 2005), active la chute du $\Delta\Psi_m$ et la libération du cyt *c* via l'activation de la caspase-2 (Shen *et al.*, 2008). L'activité de PRIMA-1 est sélective puisque seules les cellules C-33A répondent au traitement comme l'avaient déjà montré les travaux de Bykov *et al.* (Bykov *et al.*, 2002b ; Bykov *et al.*, 2003 ; Charlot *et al.*, 2006 ; Nicolier *et al.*, 2009). Le mode d'action de PRIMA-1 est encore mal connu mais il semble que la protéine chaperonne HSP90 soit impliquée (Rehman *et al.*, 2005). L'augmentation de la sensibilité aux agents anti-tumoraux grâce à PRIMA-1 est aussi observée dans les cellules de cancer de poumon non à petites cellules abritant une p53 mutée et traitées par l'adriamycine (Magrini *et al.*, 2008). De plus, PRIMA-1^{MET} potentialise l'effet du cisplatine dans des adénocarcinomes de poumons (Bykov *et al.*, 2005).

A l'inverse de PRIMA-1, PFT- α inhibe l'activité transcriptionnelle des p53 sauvages (Komarov *et al.*, 1999 ; Komarova et Gudkov, 2001). L'inhibition de cette activité transcriptionnelle par PFT- α diminue l'apoptose des cellules HeLa qui devient comparable à celle observée dans les cellules C-33A traitées par la STS seule (Charlot *et al.*, 2006). Cet effet cytoprotecteur de PFT- α est aussi observé dans des myoblastes H9c2 traités par la doxorubicine (Sardao *et al.*, 2009). Comme dans des cellules de neuroblastome SH-SY5Y traitées par le paraquat (Yang et Tiffany-Castiglioni, 2008), PFT- α diminue la libération du cyt *c* induite par la STS dans des cellules HeLa. La translocation nucléaire de l'AIF est aussi diminuée dans ces cellules (Nicolier *et al.*, 2009). En plus de son implication dans l'expression basale de l'AIF (Stambolsky *et al.*, 2006), p53 joue donc un rôle dans la translocation nucléaire de l'AIF, ce qui est en accord avec d'autres travaux (Cregan *et al.*, 2002 ; Seth *et al.*, 2005 ; Wada *et al.*, 2008).

Les résultats étant souvent spécifiques des stimuli et des cellules étudiées, il serait intéressant d'utiliser un siRNA anti-p53 afin d'inhiber l'expression de p53 dans les cellules HeLa, technique déjà optimisée au laboratoire (Clere *et al.*, 2007), et de réintroduire parallèlement une p53 sauvage dans les cellules C-33A.

L'ouverture et/ou la formation des pores membranaires est fortement régulée par les différents membres de la famille Bcl-2, tels que les membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL opposés aux membres pro-apoptotiques Bax, Bak, t-Bid. Ainsi la protéine Bax peut s'oligomériser pour former des canaux Bax/Bax ou Bax/Bak (Korsmeyer *et al.*, 2000 ; Roucou *et al.*, 2002a, 2002b ; Mikhailov *et al.*, 2003) et peut aussi interagir avec le VDAC permettant l'ouverture du PTPC. A l'opposé, Bcl-2 peut agir directement sur le PTPC, entraînant sa fermeture. Cette protéine, ainsi que Bcl-xL, interagissent avec Bax et Bak, inhibant ainsi la formation ou l'ouverture des pores (Vander Heiden *et al.*, 1999 ; Tsujimoto, 2002). Une fois opérationnels, les pores permettent la libération de facteurs apoptogènes. Dans notre étude, nous nous sommes focalisée sur l'effet de la STS sur la libération de deux facteurs particuliers, le cyt *c* et l'AIF, dont la libération mitochondriale et la translocation nucléaire sont respectivement influencées par le statut de p53. L'ensemble de ces

phénomènes (ouverture des pores, libération du cyt *c* et de l'AIF) est accompagné d'une transition de la perméabilité membranaire mitochondriale (Delbart, 2000), caractérisée par une chute du potentiel membranaire ou dépolarisation membranaire mitochondriale notée « $\nabla\Delta\Psi_m$ » (Seo *et al.*, 2003 ; Henry-Mowatt *et al.*, 2004). A l'heure actuelle, aucun consensus concernant la cinétique de l'ensemble de ces événements n'existe dans la littérature. En effet, le stimulus apoptotique ainsi que le type cellulaire étudié semblent influencer de façon notable les résultats observés (Henry-Mowatt *et al.*, 2004 ; Munoz-Pinedo *et al.*, 2006). Néanmoins, selon Ly *et al.*, il semble que le cyt *c* soit libéré avant une diminution du $\Delta\Psi_m$, alors que la libération de l'AIF s'avère strictement dépendante de cette dissipation (Ly *et al.*, 2003).

Dans notre modèle d'étude, la chute du $\Delta\Psi_m$ semble concomitante avec la libération du cyt *c* dans les cellules HeLa alors qu'elle semble précéder cette libération dans les cellules C-33A. Afin de mieux élucider le lien entre $\nabla\Delta\Psi_m$ et libération du cyt *c*, il serait intéressant de trier les cellules traitées par la STS en fonction de l'état de polarité de la membrane mitochondriale (non dépolarisées vs depolarisées) puis d'observer l'expression et la localisation sub-cellulaire du cyt *c* dans chaque sous-population. Des études précédentes avec la cyclosporine A, qui inhibe le PTPC mais qui n'inhibe pas totalement la $\nabla\Delta\Psi_m$ induite par la STS, sont en faveur de l'implication d'autres types de canaux membranaires tels que Bax/Bax et/ou Bax/Bak (Charlot *et al.*, 2004). Dans ce contexte, la caractérisation par une immunoprécipitation des complexes des différents membres de la famille Bcl-2 serait un élément important. Des études préliminaires ont permis de mettre en évidence dans les cellules HeLa, que l'apoptose induite par la STS pendant 12 h s'accompagne de la formation de deux types d'interactions, p53/Bcl-xL et p53/Bak (Nicolier, données non publiées). La présence des différents membres de la famille Bcl-2 ainsi que la formation des complexes associant membres de la famille Bcl-2 et/ou p53 responsables de la chute du $\Delta\Psi_m$ seraient des éléments clés afin de mettre en évidence des variations entre nos deux lignées d'intérêt.

Une fois libéré dans le cytosol, nous avons observé que le cyt *c* active la cascade des caspases classique. En effet, dans les cellules HeLa traitées par la STS, le cyt *c* cytosolique active la caspase-9, laquelle active à son tour la caspase-3. Dans cette lignée, une activation tardive de la caspase-8 est un phénomène en faveur d'une amplification du processus de mort. L'activation des caspases-9 et -8 a été montré au niveau d'un clone dans la lignée T Jurkat traitée par la STS mais le mécanisme d'action est inconnu (Stepczynska *et al.*, 2001). L'activation tardive de la caspase-8 dans les cellules HeLa permet d'amplifier d'une part la cascade des caspases en clivant directement la caspase-3 et d'autre part la voie mitochondriale *via* le clivage de Bid en t-Bid. A l'inverse dans les cellules C-33A, la caspase-8 est activée en premier, elle est donc dans ce modèle une caspase initiatrice entraînant l'activation directe de la caspase-3 ainsi que le clivage de Bid en t-Bid. t-Bid gagne alors la mitochondrie pour favoriser la perméabilisation de la membrane mitochondriale en permettant la formation de pores membranaires de type t-Bid/Bax et/ou t-Bid/Bak. Il a été montré qu'en tant que caspase initiatrice, la caspase-8 peut être activée par diverses drogues anti-cancéreuses notamment la STS (Ferrari *et al.*, 1998) en l'absence d'activation de la voie des récepteurs de mort (Wesselborg *et al.*, 1999). Par ailleurs, la caspase-8 peut être activée par des protéases autres que les caspases, telles que la cathepsine D libérée par les granules azurophiles lors de l'inflammation (Conus *et al.*, 2008) ou la calpaine I dans des cellules HeLa traitées par la doxorubicine (Wu *et al.*, 2006). Ainsi, la caspase initiatrice du processus apoptotique diffère selon la nature des lignées.

Nos travaux ont montré que le z-VAD (inhibiteur de l'ensemble des caspases) atténue la chute du $\Delta\Psi_m$ induit par la STS, principalement dans les cellules C-33A. Les caspases sont donc impliquées

dans la dépolarisation membranaire mitochondriale. Dans les cellules C-33A, l'activation précoce de la caspase-8 favorise la chute du $\Delta\Psi_m$. Dans les deux lignées, l'effet des caspases sur la dissipation du $\Delta\Psi_m$ peut s'expliquer par la dimérisation de la caspase-9 qui clive les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, ce qui favorise la dépolarisation de la membrane mitochondriale (Chen *et al.*, 2007). Par ailleurs, les caspases effectrices -3 et -7, cibles des caspases initiatrices -8 et -9, peuvent aussi réguler la chute du $\Delta\Psi_m$ (Lakhani *et al.*, 2006). En effet, l'ajout de z-VAD à la STS diminue fortement la chute du $\Delta\Psi_m$ uniquement dans les cellules C-33A. Afin de distinguer les caspases réellement impliquées dans la dissipation du $\Delta\Psi_m$, les cellules pourraient être traitées par un inhibiteur spécifique de la caspase-8 (le z-IETD) ou un inhibiteur spécifique de la caspase-9 (le z-LEHD) lors de l'apoptose induite par la STS afin d'analyser par cytométrie de flux l'état de la polarité de la membrane mitochondriale.

Nous avons observé que la libération du cyt *c* subséquente à l'activation de la caspase-8 est plus tardive dans la lignée C-33A abritant une protéine p53 non fonctionnelle que dans la lignée HeLa abritant une protéine p53 sauvage. Ce délai de libération du cyt *c* entre les 2 lignées peut s'expliquer par l'absence d'activité transcriptionnelle de p53 entraînant une expression faible de la protéine Bax (Charlot *et al.*, 2006), ce qui se répercute au niveau de la quantité de pores membranaires formés. Par ailleurs, la caspase-8 est faiblement exprimée dans les cellules C-33A (Arechaga-Ocampo *et al.*, 2008). Ainsi dans ces cellules, la faible expression des protéines à l'origine de la dépolarisation membranaire mitochondriale corrobore la libération plus tardive de protéines apoptotiques par rapport aux cellules HeLa dans lesquelles l'expression des protéines Bax et caspase-9 est plus importante (Charlot *et al.*, 2006 ; Arechaga-Ocampo *et al.*, 2008). De plus, la protéine pro-apoptotique Bak joue un rôle prépondérant dans la libération du cyt *c* et l'activation subséquente des caspases dans des cellules Jurkat (Shawgo *et al.*, 2008). Dans des lignées cellulaires MCF-7 exprimant des variants Bax- ou Bak-GFP, l'apoptose induite par la STS est médiée par l'engagement préférentiel de Bak (Neise *et al.*, 2007). Il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression de Bak au niveau de la membrane mitochondriale dans nos lignées d'intérêt lors de l'apoptose induite par la STS. En effet, un défaut soit en Bax soit en Bak entraîne des modifications au niveau de la perméabilisation de la membrane mitochondriale alors qu'un défaut des deux, Bax et Bak, est souvent associé à la résistance des cellules à l'apoptose médiée par la voie mitochondriale (Wei *et al.*, 2001 ; Lindsten et Thompson, 2006). La libération plus tardive du cyt *c* observée dans les cellules C-33A peut enfin s'expliquer par l'existence de 2 pools de cyt *c* au sein de la mitochondrie. Une partie du cyt *c* est libre dans l'espace intermembranaire alors qu'un autre pool est attaché à la membrane mitochondriale interne *via* les cardiolipines. Des études sur des mitochondries de foie isolées ont montré que la libération du cyt *c* peut s'effectuer après la libération d'autres facteurs apoptogènes notamment Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 (Uren *et al.*, 2005). Cette libération tardive est due à la nécessité pour le cyt *c* de se détacher de la membrane mitochondriale interne (Uren *et al.*, 2005). Ainsi la perméabilisation de la membrane mitochondriale entraîne la libération du pool de cyt *c* libre dans l'espace intermembranaire. Dans les cellules C-33A, ce pool libéré est peut-être très minoritaire. Une fois dans le cytosol, la première vague de cyt *c* libérée permet la libération complète du cyt *c* *via* 3 différentes boucles d'amplifications (Garrido *et al.*, 2006b) (cf partie 2.4.3.4). Par ailleurs, la libération tardive du principal pool de cyt *c* lié aux cardiolipines dans les cellules C-33A est renforcé par le fait que t-Bid, élément clé dans cette lignée, participe aux remodelages des cristaux mitochondriaux (Scorrano *et al.*, 2002), ce qui permet la libération maximale du cyt *c* et facilite aussi la mobilité du cyt *c* à l'intérieur des mitochondries (Gillick et Crompton, 2008).

Notre étude a aussi montré, par l'utilisation de z-VAD (inhibiteur de l'ensemble des caspases) et de z-IETD (inhibiteur spécifique de la caspase-8), que la libération du cyt *c* est indépendante de l'activation des caspases (Goldstein *et al.*, 2000b). Cette observation est en accord avec de nombreuses données de la littérature (Li, P. *et al.*, 1997 ; Waterhouse *et al.*, 2001) qui montrent que l'indépendance vis-à-vis des caspases permet, malgré la libération initiale du cyt *c*, le maintien de la chaîne respiratoire qui approvisionne la cellule en ATP nécessaire pour l'activation subséquente des caspases dans le cytosol. Une fois activées, les caspases, notamment la caspase-3, pénètrent *via* les pores membranaires dans la mitochondrie pour bloquer totalement la chaîne respiratoire aboutissant *in fine* au démantèlement de la cellule.

Nous avons montré que le traitement de nos lignées cellulaires par la STS associée au z-VAD favorise la survie des cellules HeLa mais n'affecte pas l'apoptose induite par la STS des cellules C-33A. Cet effet du z-VAD tend en faveur d'une apoptose qui s'effectue à travers l'activation des caspases dans les cellules HeLa, c'est-à-dire que les caspases sont les éléments clés de l'apoptose induite par la STS. En effet à 24 h de traitement, le z-VAD diminue de plus de 50% la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN caractérisée par le pic Sub-G₁ dans les cellules HeLa, ce qui suggère le rôle clé des caspases. A l'inverse, dans les cellules C-33A, l'apoptose semble davantage s'effectuer avec l'activation des caspases, mais ces dernières ne sont pas les éléments clés du processus apoptotique (Kroemer et Martin, 2005). Une autre voie semble donc être impliquée dans l'apoptose induite par la STS. Ceci est renforcée par le fait que le z-VAD n'inhibe pas complètement la mort induite par la STS des cellules HeLa et est inefficace sur la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN induite par la STS dans les cellules C-33A.

Suite à l'induction de l'apoptose, l'AIF est elle aussi libérée de la mitochondrie au profit du cytosol. A l'heure actuelle aucun consensus n'existe concernant l'AIF. Selon les modèles cellulaires et les stimuli apoptotiques, l'AIF est impliquée dans 3 modèles d'apoptose différents. Tout d'abord l'AIF peut agir en amont et indépendamment des caspases (Susin *et al.*, 1999a, 1999b ; Yu *et al.*, 2002). La libération et l'activation subséquente de l'AIF peuvent être indépendantes des caspases mais elles sont des événements secondaires pour compléter l'apoptose des cellules (Cregan *et al.*, 2002). Enfin, l'AIF est un événement en aval des caspases et dépend strictement de l'activation de ces dernières (Arnoult *et al.*, 2002, 2003).

Dans notre modèle, nous avons observé que la libération de l'AIF suivie de sa translocation nucléaire est similaire quelle que soit la lignée. Dans la lignée HeLa, ces événements suivent la libération du cyt *c* alors que dans les cellules C-33A, la libération tardive du cyt *c* est concomitante avec celle de l'AIF. Une fois dans le cytosol, l'AIF est transloquée au niveau du noyau où elle s'associe avec la cyclophiline A pour former le dégradosome. Ce dernier permet la condensation de la chromatine nucléaire ainsi que le clivage de l'ADN en grands fragments de 50 kpb, événement caractéristique de l'activité nucléaire de l'AIF et de l'étape I de l'apoptose nucléaire.

Pour les 2 lignées, l'ajout de z-VAD ou de z-IETD ne modifie pas la libération ainsi que la translocation nucléaire de l'AIF. Ce résultat suggère que ces phénomènes sont indépendants des caspases (Susin *et al.*, 1999a, 1999b ; Yu *et al.*, 2002). Nous avons donc souhaité étudier la voie indépendante des caspases responsable de la libération de l'AIF activée lors de l'apoptose induite par la STS.

Récemment, il a été montré que l'AIF pouvait participer à une voie d'induction de mort particulière dans laquelle les membres de la famille Bcl-2 ainsi que les caspases n'étaient pas nécessaires. Dans ce modèle, la protéine PARP-1 médie la libération de l'AIF (Yu *et al.*, 2002). En effet, en plus de réparer les dommages à l'ADN au niveau du noyau, PARP-1 favorise la libération de l'AIF par un

mécanisme encore mal connu. Actuellement, deux hypothèses sont envisagées. i) Les travaux menés par l'équipe de Dawson tendent en faveur du rôle clé de PARP-1 au niveau du noyau (Yu *et al.*, 2002, 2003, 2006b ; Andrabi *et al.*, 2006). Une fois activée, c'est-à-dire juste avant d'être clivée, elle permet la synthèse des polymères de PAR qui gagnent alors la mitochondrie où ils induisent la dissipation du $\Delta\Psi_m$ de part leur nature très chargés ou de part leur liaison avec une protéine encore non décrite. Tout ceci permet *in fine* la libération de l'AIF. Ce mécanisme de mort particulier est appelé parthanatose. ii) Les travaux de Du *et al.* ont montré quant à eux que la protéine PARP-1 est localisée aussi au niveau mitochondrial où elle joue le même rôle qu'au niveau nucléaire. Cette équipe a montré que l'inhibition de PARP-1 par le INH2BP préserve le $\Delta\Psi_m$, le pool de NAD^+ , la chaîne respiratoire et diminue la mort neuronale induite par un stress oxydatif ou par l'excitotoxicité (Du *et al.*, 2003).

Dans notre modèle d'étude, la protéine PARP-1 est présente au niveau du noyau mais aussi au niveau des mitochondries. De plus, la libération mitochondriale de l'AIF au profit du cytosol est concomitante avec le clivage de la PARP-1 mitochondriale.

Afin de vérifier le rôle de PARP-1 dans la libération de l'AIF, nous avons utilisé le 3-AB, un inhibiteur enzymatique de PARP-1 (Virag et Szabo, 2002) L'ajout de 3-AB inhibe le clivage induit par la STS des deux pools de PARP-1, nucléaire et mitochondrial, favorisant le maintien de l'AIF au niveau de la mitochondrie, maintien aussi observé *in vivo* par Czapski *et al.* (Czapski *et al.*, 2006), alors que le cyt c gagne le cytosol. Il s'en suit une diminution de la fragmentation de l'ADN en grands fragments de 50 kpb. Le traitement par le 3-AB diminue aussi la $\Delta\Psi_m$ d'environ 50% quelle que soit la lignée. Au vu de ces résultats, la PARP-1 mitochondriale semble agir en amont de la dissipation du $\Delta\Psi_m$ permettant la libération de l'AIF, ce qui est en accord avec Abramov (Abramov et Duchon, 2008). Ainsi, notre modèle est davantage semblable à celui proposé par Du *et al.*.

Afin de confirmer cette hypothèse et d'écarter celle de Dawson, des western-blotting anti-polymères de PAR pourraient être réalisés pour mettre en évidence la présence ou l'absence des polymères de PAR à la surface de la membrane mitochondriale comme le suggère le modèle de Dawson. Par ailleurs, ce dernier propose l'existence d'un intermédiaire entre les polymères de PAR et l'AIF. Cet intermédiaire pourrait être les calpaines, protéases responsables de la maturation de l'AIF, c'est-à-dire du passage de la forme ancrée à la membrane mitochondriale à la forme soluble dans la matrice. En effet, Moubarak *et al.* ont montré que l'inactivation génétique des calpaines protège les cellules de la mort induite par PARP-1 (Moubarak *et al.*, 2007). L'activité des calpaines nécessitant du Ca^{2+} , l'incubation de mitochondries isolées de cellules HeLa et C-33A avec différentes concentrations de Ca^{2+} permettrait d'observer la libération ou non de l'AIF et de définir le lien entre calpaines et AIF. Il serait par ailleurs intéressant de distinguer les différents pools de PARP-1, nucléaire vs mitochondrial, pour clarifier le rôle de chacun lors de la libération de l'AIF suite à l'induction de l'apoptose induite par la STS. Des travaux utilisant sur des mitochondries isolées de cellules non traitées mises en contact avec des cytosols de cellules traitées par la STS, technique déjà mise en place au laboratoire (Bernard *et al.*, 2001), devraient permettre de répondre à cette question.

En accord avec d'autres auteurs (Gartenhaus *et al.*, 1996 ; Kuo *et al.*, 1998), le 3-AB protège les cellules C-33A abritant une protéine p53 mutée de la mort induite par la STS en diminuant la fragmentation de l'ADN en fragments multiples de 180 à 200 pb, observée par le pic Sub-G₁. A l'inverse et de façon surprenante, l'inhibition de PARP-1 augmente cette fragmentation dans les cellules HeLa abritant une p53 sauvage, comme l'a montré Liu *et al.* en traitant ces mêmes cellules par un autre inhibiteur de PARP-1, ABT-788 (Liu *et al.*, 2008). Cet effet toxique du 3-AB peut

s'expliquer par une augmentation accrue des dommages à l'ADN, dommages non réparés du fait de l'inhibition du pool nucléaire de PARP-1 (Munoz-Gamez *et al.*, 2005).

Il serait intéressant d'établir le lien, si lien il y a, entre PARP-1 et statut de p53. En effet, il a été montré que PARP-1 contrôle l'activité transcriptionnelle de p53 *via* les polymères de PAR synthétisés par PARP-1 et qui lient p53. Cette dernière ne peut alors plus interagir avec Crm1, ce qui empêche son exportation du noyau (Kanai *et al.*, 2007). La protéine p53 s'accumule alors dans le noyau où elle transactive ou transréprime ses gènes cibles. Cependant, des controverses existent. En effet, il semble que selon la taille des polymères de PAR qui lient p53, les liaisons spécifiques et non spécifiques de cette dernière à l'ADN sont modifiées (Fahrer *et al.*, 2007). Il serait important d'étudier si la protéine p53, sauvage vs mutée, est poly(ADP)ribosylée dans les deux lignées lors de l'apoptose induite par la STS et ce, au niveau nucléaire mais aussi au niveau mitochondrial.

Un autre élément clé impliqué en amont de l'AIF est la protéine Bax qui intervient dans le modèle de Moubarak *et al.* dans lequel la mort programmée est induite par un agent alkylant l'ADN, le MNNG (Moubarak *et al.*, 2007). L'activation nucléaire de PARP-1 précède l'activation de Bax par les calpaines et non par les cathepsines résultant *in fine* en la libération de l'AIF. Dans la lignée cellulaire C-33A, la voie médiée par PARP-1 est majoritaire. L'implication de Bax, protéine peu exprimée dans ce modèle, et aussi de Bak serait à élucider afin de mieux cerner le mécanisme liant PARP-1 à l'AIF.

Nos travaux de thèse ont permis de mettre en évidence en amont de la voie apoptotique mitochondriale induite par la STS dans des cellules dérivées de cancer du col de l'utérus le rôle clé de p53 et en aval celui des facteurs apoptogènes *cyt c* et AIF, chacun étant impliqués dans des cascades de mort propre. Cependant, afin de confirmer l'implication de ces deux cascades de mort, à savoir la cascade des caspases et la voie médiée par PARP-1, ainsi que l'absence d'autres voies impliquées, il serait intéressant d'étudier l'effet combiné du z-VAD et du 3-AB sur l'apoptose induite par la STS des cellules HeLa et C-33A.

Notre étude fournit des éléments indiquant que la STS ou ses dérivés, notamment UCN-01, pourraient être utilisés en tant que nouvelles molécules chimiothérapeutiques dans le traitement du cancer du col de l'utérus. En effet, la STS pourrait agir non seulement sur les tumeurs p53 sauvage, cas de la quasi-totalité des cancers du col de l'utérus, mais aussi sur les quelques cas de cancers du col de l'utérus abritant une p53 mutée et ce, en combinaison avec PRIMA-1.

Les thérapies anti-tumorales engendrant souvent des effets secondaires néfastes, un autre axe de recherche consisterait à combiner des molécules anti-tumorales comme PRIMA-1 à la STS dans le but de potentialiser l'effet d'une des molécules ou de créer un effet synergique afin de réduire les doses utilisées et donc de limiter la toxicité de la chimiothérapie. Dans ce contexte, un projet collaboratif entre le Cancéropôle Grand-Est et le DKFZ à Heidelberg (Allemagne) a permis à notre équipe de s'intéresser à la synergie pouvant exister entre la STS et/ou son analogue UCN-01 avec le butyrate de sodium (NaB) et la trichostatine A (Tsa), deux inhibiteurs de HDACs (HDI). Nos collègues allemands ont montré que le NaB entraîne la mort par apoptose des cellules HeLa suite à un arrêt du cycle cellulaire en G₁ (Finzer *et al.*, 2001). Cette mort implique la voie apoptotique mitochondriale avec une chute du $\Delta\Psi_m$ et la libération du *cyt c* et non la voie des récepteurs de mort. L'effet du NaB est indépendant de p53 et passe principalement par la voie E2F/p73 (Finzer *et al.*, 2001, 2004), alors que l'apoptose induite par la STS est essentiellement médiée par p53. Notre équipe a récemment montré qu'*in vitro* et *in vivo* chez des souris nude xénotreffées avec des cellules dérivées de cancer du col de

l'utérus (cellules CaSki infectées par HPV16) ou des cellules primaires de cancer du col de l'utérus, UCN-01 potentialise l'effet du NaB ou celui de la TsA (Décrion-Barthod *et al.*, en préparation), ce qui se traduit par une diminution de la croissance tumorale. Ainsi, en limitant la toxicité du traitement, cette stratégie thérapeutique associant la STS ou son analogue UCN-01 et les HDIs induit une apoptose des tumeurs associées aux HPV *via* la mobilisation de différentes voies de mort cellulaire.

L'induction de l'apoptose des cellules tumorales est une voie privilégiée dans la recherche de nouvelles thérapies anti-cancéreuses. La majorité des cellules tumorales présente des mutations de protéines clé, principalement p53 et Bcl-2. Dans ce contexte, en plus de la caractérisation des voies de signalisation impliquées lors de l'apoptose induite par les différents agents anti-cancéreux, comme la STS par exemple une autre approche thérapeutique consiste en l'élaboration de molécules réactivant p53 autres que PRIMA-1 (Levesque et Eastman, 2007 ; Wang et El-Deiry, 2008). En empêchant la liaison de p53, sauvage et mutée, avec MDM2, le composé CP31398 inhibe la croissance tumorale de tumeurs humaines xénogreffées sans aucun effet secondaire (Wang *et al.*, 2006) mais il semble aussi entraîner une mort indépendamment de p53 (Wischhusen *et al.*, 2003) alors que RITA semble entraîner une mort uniquement dépendante de p53 (Issaeva *et al.*, 2004). La molécule P53R3 quant à elle induit un arrêt de la croissance *via* p53 et sensibilise les cellules de gliomes à l'apoptose induite par TRAIL (Weinmann *et al.*, 2008). Ces stratégies visent à réactiver p53 dans les cancers, dans le but de ralentir ou d'inhiber la progression tumorale. Cependant des études complémentaires doivent être menées pour optimiser les effets dus à la modulation de p53 sur les cellules tumorales et minimiser les effets secondaires néfastes et indésirables sur les cellules saines avoisinant la tumeur. Un récent travail montre que PFT- α exerce aussi son effet cytoprotecteur indépendamment de p53 *via* probablement la cycline D1 (Sohn *et al.*, 2009) Dans ce contexte, hormis PFT- α , d'autres molécules émergent, comme PFT- μ . Ce nouveau composé inhibe sélectivement la translocation de p53 à la mitochondrie en réduisant l'affinité de p53 pour Bcl-xL et Bcl-2 et ce, sans altérer l'activité transcriptionnelle de p53. Tout ceci résulte en la protection des organes lors des traitements par rayons γ (Strom *et al.*, 2006). Nous avons évoqué les différents complexes protéines pro-apoptotiques/protéines anti-apoptotiques conduisant à l'ouverture et/ou la formation de canaux membranaires responsables de la dissipation du $\Delta\Psi_m$. Les réseaux complexes d'interaction protéine/protéine définissent l'interactome. Le dysfonctionnement de ce réseau hautement spécifique lié notamment à des mutations est à l'origine de diverses pathologies, notamment le cancer. La protéine anti-apoptotique Bcl-2 étant souvent sur-exprimée dans les cancers, une approche thérapeutique a consisté en la mise au point de composés bloquant l'hétérodimérisation entre protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad...) et protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1...). Ces composés sont dits « BH3-mimetics » (Labi *et al.*, 2008 ; Vogler *et al.*, 2009). ABT-737, inhibiteur de Bcl-2 et Bcl-xL, induit l'apoptose de cellules transformées, sensibilise des cellules tumorales sur-exprimant Bcl-2 aux chimiothérapies mais est inefficace contre Mcl-1. Des travaux récents ont montré que l'effet synergique d'ABT-737 couplé à PUMA sur l'activation des protéines impliquées dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Chipuk *et al.*, 2008). L'analogue administré *per os* d'ABT-737 et dont les essais cliniques semblent prometteurs est ABT-263.

Conclusion Générale

Le développement récent de deux vaccins prophylactiques représente une grande avancée dans la lutte contre les infections aux HPV haut risque et les lésions qui leur sont associées, à savoir les lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Néanmoins, ces stratégies ne peuvent éclipser la nécessité de développer des traitements chimiothérapeutiques efficaces. En effet, ces traitements sont indispensables en attendant la mise en place d'une campagne vaccinale efficace mais aussi pour traiter les cancers du col de l'utérus dus aux génotypes non ciblés par les vaccins.

Notre travail de thèse a permis d'élucider les voies activées lors de l'apoptose mitochondriale induite par la staurosporine de cellules dérivées de cancer du col de l'utérus. Nous avons observé en amont de la mitochondrie le rôle de p53 et en aval l'importance de deux facteurs apoptogènes impliqués dans des voies distinguées, à savoir i) le cyt c et la voie des caspases et ii) l'AIF et la voie indépendante des caspases médiée par PARP-1. Ces connaissances sont des prérequis nécessaires à l'élaboration et à la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses efficaces telles que l'utilisation de la STS qui vise à éliminer les cellules tumorales en activant la voie apoptotique mitochondriale.

Références Bibliographiques

A

- Abraham, R. T. (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the atm and atr kinases. *Genes Dev*, 15: 2177-2196.
- Abramov, A. Y. and Duchon, M. R. (2008) Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta*, 1777: 953-964.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. and Akey, C. W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, 9: 423-432.
- Adams, J. M. and Cory, S. (2007) The bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26: 1324-1337.
- Adrain, C., Slee, E. A., Harte, M. T. and Martin, S. J. (1999) Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the wd-40 repeat region. *J Biol Chem*, 274: 20855-20860.
- Akiyama, T., Yoshida, T., Tsujita, T., Shimizu, M., Mizukami, T., Okabe, M. and Akinaga, S. (1997) G1 phase accumulation induced by ucn-01 is associated with dephosphorylation of rb and cdk2 proteins as well as induction of cdk inhibitor p21/cip1/waf1/sdi1 in p53-mutated human epidermoid carcinoma a431 cells. *Cancer Res*, 57: 1495-1501.
- Alano, C. C., Ying, W. and Swanson, R. A. (2004) Poly(adp-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires nad⁺ depletion and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, 279: 18895-18902.
- Alarcon-Vargas, D. and Ronai, Z. (2002) P53-mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis*, 23: 541-547.
- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K. and Peter, M. E. (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of cd95. *Mol Cell Biol*, 22: 207-220.
- Alirol, E. and Martinou, J. C. (2006) Mitochondria and cancer: Is there a morphological connection? *Oncogene*, 25: 4706-4716.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. and Yuan, J. (1996) Human ice/ced-3 protease nomenclature. *Cell*, 87: 171.
- Altieri, D. C. (2003) Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res*, 88: 31-52.
- Alva, A. S., Gultekin, S. H. and Baehrecke, E. H. (2004) Autophagy in human tumors: Cell survival or death? *Cell Death Differ*, 11: 1046-1048.
- Alvarez-Salas, L. M., Cullinan, A. E., Siwkowski, A., Hampel, A. and DiPaolo, J. A. (1998) Inhibition of hpv-16 e6/e7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 1189-1194.
- Alvarez-Salas, L. M. and DiPaolo, J. A. (2007) Molecular approaches to cervical cancer therapy. *Curr Drug Discov Technol*, 4: 208-219.
- Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G. and Altieri, D. C. (1998) Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem*, 273: 11177-11182.
- Ameisen, J. C. (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: A timeline of four billion years. *Cell Death Differ*, 9: 367-393.
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H. and Kurland, C. G. (1998) The genome sequence of rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria. *Nature*, 396: 133-140.
- Andrabi, S. A., Kim, N. S., Yu, S. W., Wang, H., Koh, D. W., Sasaki, M., Klaus, J. A., Otsuka, T., Zhang, Z., Koehler, R. C., Hurn, P. D., Poirier, G. G., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (2006) Poly(adp-ribose) (par) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 18308-18313.
- Apostolova, N., Cervera, A. M., Victor, V. M., Cadenas, S., Sanjuan-Pla, A., Alvarez-Barrientos, A., Esplugues, J. V. and McCreath, K. J. (2006) Loss of apoptosis-inducing factor leads to an increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants. *Cell Death Differ*, 13: 354-357.
- Arechaga-Ocampo, E., Pereira-Suarez, A. L., del Moral-Hernandez, O., Cedillo-Barron, L., Rodriguez-Sastre, M. A., Castillo-Alvarez, A., Lopez-Bayghen, E. and Villegas-Sepulveda, N. (2008) Hpv+ cervical carcinomas and cell lines display altered expression of caspases. *Gynecol Oncol*, 108: 10-18.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F. and Youle, R. J. (2003) Mitochondrial release of aif and endog requires caspase activation downstream of bax/bak-mediated permeabilization. *Embo J*, 22: 4385-4399.

- Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J. C., Antonsson, B., Estaquier, J. and Ameisen, J. C. (2002) Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol*, 159: 923-929.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998) Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-1308.
- Atkinson, E. A., Barry, M., Darmon, A. J., Shostak, I., Turner, P. C., Moyer, R. W. and Bleackley, R. C. (1998) Cytotoxic t lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme b. *J Biol Chem*, 273: 21261-21266.
- Aubin, F., Pretet, J. L., Jacquard, A. C., Saunier, M., Carcopino, X., Jaroud, F., Pradat, P., Soubeyrand, B., Leocmach, Y., Mougin, C. and Riethmuller, D. (2008) Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: A large french national study (edith iv). *Clin Infect Dis*, 47: 610-615.
- B**
- Baehrecke, E. H. (2005) Autophagy: Dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 505-510.
- Bai, L., Ni, H. M., Chen, X., DiFrancesca, D. and Yin, X. M. (2005) Deletion of bid impedes cell proliferation and hepatic carcinogenesis. *Am J Pathol*, 166: 1523-1532.
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J. and Molkentin, J. D. (2005) Loss of cyclophilin d reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434: 658-662.
- Baker, M. J., Frazier, A. E., Gulbis, J. M. and Ryan, M. T. (2007) Mitochondrial protein-import machinery: Correlating structure with function. *Trends Cell Biol*, 17: 456-464.
- Bao, Q. and Shi, Y. (2007) Apoptosome: A platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*, 14: 56-65.
- Barkla, D. H. and Gibson, P. R. (1999) The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology*, 31: 230-238.
- Barry, M., Heibein, J. A., Pinkoski, M. J., Lee, S. F., Moyer, R. W., Green, D. R. and Bleackley, R. C. (2000) Granzyme b short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic t-lymphocyte killing by directly cleaving bid. *Mol Cell Biol*, 20: 3781-3794.
- Basanez, G., Sharpe, J. C., Galanis, J., Brandt, T. B., Hardwick, J. M. and Zimmerberg, J. (2002) Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem*, 277: 49360-49365.
- Baselga, J. and Hammond, L. A. (2002) Her-targeted tyrosine-kinase inhibitors. *Oncology*, 63 Suppl 1: 6-16.
- Bayas, J. M., Costas, L. and Munoz, A. (2008) Cervical cancer vaccination indications, efficacy, and side effects. *Gynecol Oncol*, 110: S11-14.
- Beart, P. M., Lim, M. L., Chen, B., Diwakarla, S., Mercer, L. D., Cheung, N. S. and Nagley, P. (2007) Hierarchical recruitment by ampa but not staurosporine of pro-apoptotic mitochondrial signaling in cultured cortical neurons: Evidence for caspase-dependent/independent cross-talk. *J Neurochem*, 103: 2408-2427.
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M. and Green, D. R. (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, 2: 469-475.
- Benedet, J. L., Bender, H., Jones, H., 3rd, Ngan, H. Y. and Pecorelli, S. (2000) FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO committee on gynecologic oncology. *Int J Gynaecol Obstet*, 70: 209-262.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L. and Cookson, B. T. (2009) Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, 7: 99-109.
- Bernard, B., Fest, T., Pretet, J. L. and Mougin, C. (2001) Staurosporine-induced apoptosis of hpv positive and negative human cervical cancer cells from different points in the cell cycle. *Cell Death Differ*, 8: 234-244.
- Bernard, B., Pretet, J. L., Charlot, J. F. and Mougin, C. (2003) Human papillomaviruses type 16+ and 18+ cervical carcinoma cells are sensitive to staurosporine-mediated apoptosis. *Biol Cell*, 95: 17-26.
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Di Lisa, F. and Forte, M. A. (2006) The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *Febs J*, 273: 2077-2099.
- Beutler, B. and van Huffel, C. (1994) Unraveling function in the tnf ligand and receptor families. *Science*, 264: 667-668.
- Beutner, G., Ruck, A., Riede, B. and Brdiczka, D. (1998) Complexes between porin,

- hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1368: 7-18.
- Bhonde, M. R., Hanski, M. L., Magrini, R., Moorthy, D., Muller, A., Sausville, E. A., Kohno, K., Wiegand, P., Daniel, P. T., Zeitz, M. and Hanski, C. (2005) The broad-range cyclin-dependent kinase inhibitor ucn-01 induces apoptosis in colon carcinoma cells through transcriptional suppression of the bcl-x(l) protein. *Oncogene*, 24: 148-156.
- Bicknell, G. R. and Cohen, G. M. (1995) Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 207: 40-47.
- Bikfalvi, A. (2007) [tumor angiogenesis]. *Bull Cancer*, 94: F193-198.
- Blasina, A., Hallin, J., Chen, E., Arango, M. E., Kraynov, E., Register, J., Grant, S., Ninkovic, S., Chen, P., Nichols, T., O'Connor, P. and Anderes, K. (2008) Breaching the DNA damage checkpoint via pf-00477736, a novel small-molecule inhibitor of checkpoint kinase 1. *Mol Cancer Ther*, 7: 2394-2404.
- Bleiberg, H. and Hendlisz, A. (2002) Advanced colorectal cancer treatment in europe: What have we achieved? *Anticancer Drugs*, 13: 461-471.
- Boehning, D., Patterson, R. L., Sedaghat, L., Glebova, N. O., Kurosaki, T. and Snyder, S. H. (2003) Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*, 5: 1051-1061.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. and Wallach, D. (1996) Involvement of mach, a novel mort1/fadd-interacting protease, in fas/apo-1- and tnf receptor-induced cell death. *Cell*, 85: 803-815.
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H. and Wallach, D. (1995) A novel protein that interacts with the death domain of fas/apo1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*, 270: 7795-7798.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R. and Shah, K. V. (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (ibsc) study group. *J Natl Cancer Inst*, 87: 796-802.
- Bossy-Wetzler, E., Newmeyer, D. D. and Green, D. R. (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of devd-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J*, 17: 37-49.
- Bottger, A., Bottger, V., Sparks, A., Liu, W. L., Howard, S. F. and Lane, D. P. (1997) Design of a synthetic mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Curr Biol*, 7: 860-869.
- Bouchet, B. P., de Fromental, C. C., Puisieux, A. and Galmarini, C. M. (2006) P53 as a target for anti-cancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol*, 58: 190-207.
- Bouchier-Hayes, L., Lartigue, L. and Newmeyer, D. D. (2005) Mitochondria: Pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*, 115: 2640-2647.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R. A., Casares, N., Perfettini, J. L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P. and Kroemer, G. (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*, 25: 1025-1040.
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. and Sheu, S. S. (2004) Calcium, atp, and ros: A mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287: C817-833.
- Brown, F. M., Faquin, W. C., Sun, D., Crum, C. P. and Cibas, E. S. (1999) Lsil biopsies after hsil smears. Correlation with high-risk hpv and greater risk of hsil on follow-up. *Am J Clin Pathol*, 112: 765-768.
- Bruckner, H. W. and Motwani, B. T. (1991) Chemotherapy of advanced cancer of the colon and rectum. *Semin Oncol*, 18: 443-461.
- Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E. and Garrido, C. (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*, 2: 645-652.
- Brustovetsky, T., Antonsson, B., Jemmerson, R., Dubinsky, J. M. and Brustovetsky, N. (2005) Activation of calcium-independent phospholipase a (ipla) in brain mitochondria and release of apoptogenic factors by bax and truncated bid. *J Neurochem*, 94: 980-994.
- Budd, R. C. (2002) Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest*, 109: 437-441.
- Bukau, B. and Horwich, A. L. (1998) The hsp70 and hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92: 351-366.

- Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P. and et al. (1995) Inhibition of ice family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*, 269: 1885-1888.
- Bunch, R. T. and Eastman, A. (1997) 7-hydroxystaurosporine (ucn-01) causes redistribution of proliferating cell nuclear antigen and abrogates cisplatin-induced s-phase arrest in chinese hamster ovary cells. *Cell Growth Differ*, 8: 779-788.
- Burkart, V., Wang, Z. Q., Radons, J., Heller, B., Herceg, Z., Stingl, L., Wagner, E. F. and Kolb, H. (1999) Mice lacking the poly(adp-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med*, 5: 314-319.
- Busby, E. C., Leistriz, D. F., Abraham, R. T., Karnitz, L. M. and Sarkaria, J. N. (2000) The radiosensitizing agent 7-hydroxystaurosporine (ucn-01) inhibits the DNA damage checkpoint kinase hchk1. *Cancer Res*, 60: 2108-2112.
- Buzzard, K. A., Giaccia, A. J., Killender, M. and Anderson, R. L. (1998) Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 273: 17147-17153.
- Bykov, V. J., Issaeva, N., Selivanova, G. and Wiman, K. G. (2002a) Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes prima-1 from known anticancer drugs: A statistical analysis of information in the national cancer institute database. *Carcinogenesis*, 23: 2011-2018.
- Bykov, V. J., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K. G. and Selivanova, G. (2002b) Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med*, 8: 282-288.
- Bykov, V. J., Selivanova, G. and Wiman, K. G. (2003) Small molecules that reactivate mutant p53. *Eur J Cancer*, 39: 1828-1834.
- Bykov, V. J. and Wiman, K. G. (2003) Novel cancer therapy by reactivation of the p53 apoptosis pathway. *Ann Med*, 35: 458-465.
- Bykov, V. J., Zache, N., Stridh, H., Westman, J., Bergman, J., Selivanova, G. and Wiman, K. G. (2005) Prima-1(met) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene*, 24: 3484-3491.
- Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K. J. and Cryns, V. L. (2001) Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ*, 8: 443-450.
- C**
- Cai, X., Li, G., Laimins, L. A. and Cullen, B. R. (2006) Human papillomavirus genotype 31 does not express detectable microrna levels during latent or productive virus replication. *J Virol*, 80: 10890-10893.
- Cain, K., Bratton, S. B. and Cohen, G. M. (2002) The apaf-1 apoptosome: A large caspase-activating complex. *Biochimie*, 84: 203-214.
- Cain, K., Langlais, C., Sun, X. M., Brown, D. G. and Cohen, G. M. (2001) Physiological concentrations of k⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem*, 276: 41985-41990.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C. M. (2004) Human microrna genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 2999-3004.
- Callus, B. A. and Vaux, D. L. (2007) Caspase inhibitors: Viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ*, 14: 73-78.
- Camidge, D. R. (2007) The potential of death receptor 4- and 5-directed therapies in the treatment of lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 8: 413-419.
- Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R. T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J. M. and Kroemer, G. (2004) Aif and cyclophilin cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene*, 23: 1514-1521.
- Candi, E., Schmidt, R. and Melino, G. (2005) The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 328-340.
- Cao, X., Deng, X. and May, W. S. (2003) Cleavage of bax to p18 bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 bax. *Blood*, 102: 2605-2614.
- Caravatti, G., Meyer, T., Fredenhagen, A., Trinks, U., Mett, H. and Fabbro, D. (1994) Inhibitory activity and selectivity of staurosporine derivatives towards protein kinase c. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4: 399-404.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J. C. (1998) Regulation of

- cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282: 1318-1321.
- Carlo-Stella, C., Lavazza, C., Locatelli, A., Vigano, L., Gianni, A. M. and Gianni, L. (2007) Targeting trail agonistic receptors for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 13: 2313-2317.
- Carlson, R. W., Moench, S. J., Hammond, M. E., Perez, E. A., Burstein, H. J., Allred, D. C., Vogel, C. L., Goldstein, L. J., Somlo, G., Gradishar, W. J., Hudis, C. A., Jahanzeb, M., Stark, A., Wolff, A. C., Press, M. F., Winer, E. P., Paik, S. and Ljung, B. M. (2006) Her2 testing in breast cancer: Nccn task force report and recommendations. *J Natl Compr Canc Netw*, 4 Suppl 3: S1-22; quiz S23-24.
- Castedo, M., Ferri, K., Roumier, T., Metivier, D., Zamzami, N. and Kroemer, G. (2002) Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods*, 265: 39-47.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. and Kroemer, G. (2004a) Cell death by mitotic catastrophe: A molecular definition. *Oncogene*, 23: 2825-2837.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Valent, A., Raslova, H., Yakushijin, K., Horne, D., Feunteun, J., Lenoir, G., Medema, R., Vainchenker, W. and Kroemer, G. (2004b) Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene*, 23: 4362-4370.
- Cereghetti, G. M. and Scorrano, L. (2006) The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene*, 25: 4717-4724.
- Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X. and Shi, Y. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by smac/diablo. *Nature*, 406: 855-862.
- Chaigne-Delalande, B., Moreau, J. F. and Legembre, P. (2008) Rewinding the disc. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 56: 9-14.
- Chan, F. K., Shisler, J., Bixby, J. G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B. and Lenardo, M. J. (2003a) A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem*, 278: 51613-51621.
- Chan, U. P., Lee, J. F., Wang, S. H., Leung, K. L. and Chen, G. G. (2003b) Induction of colon cancer cell death by 7-hydroxystaurosporine (ucn-01) is associated with increased p38 mapk and decreased bcl-xl. *Anticancer Drugs*, 14: 761-766.
- Chandra, D., Bratton, S. B., Person, M. D., Tian, Y., Martin, A. G., Ayres, M., Fearnhead, H. O., Gandhi, V. and Tang, D. G. (2006) Intracellular nucleotides act as critical prosurvival factors by binding to cytochrome c and inhibiting apoptosome. *Cell*, 125: 1333-1346.
- Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E. and Yang, X. (2002) C-flip(I) is a dual function regulator for caspase-8 activation and cd95-mediated apoptosis. *Embo J*, 21: 3704-3714.
- Charlot, J. F., Nicolier, M., Pretet, J. L. and Mougin, C. (2006) Modulation of p53 transcriptional activity by prima-1 and pifithrin-alpha on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis*, 11: 813-827.
- Charlot, J. F., Pretet, J. L., Haughey, C. and Mougin, C. (2004) Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis*, 9: 333-343.
- Chen, H. and Chan, D. C. (2005) Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No. 2: R283-289.
- Chen, M., Guerrero, A. D., Huang, L., Shabier, Z., Pan, M., Tan, T. H. and Wang, J. (2007) Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic bcl-2 family members. *J Biol Chem*, 282: 33888-33895.
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J. C. and Gottlieb, R. A. (2001) Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem*, 276: 30724-30728.
- Chen, X., Lowe, M. and Keyomarsi, K. (1999) Ucn-01-mediated g1 arrest in normal but not tumor breast cells is prb-dependent and p53-independent. *Oncogene*, 18: 5691-5702.
- Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K. and Hardwick, J. M. (1997) Conversion of bcl-2 to a bax-like death effector by caspases. *Science*, 278: 1966-1968.
- Cheng, E. H., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J. and Korsmeyer, S. J. (2003) Vdac2 inhibits bak activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, 301: 513-517.
- Cheung, E. C., Joza, N., Steenaart, N. A., McClellan, K. A., Neuspiel, M., McNamara, S., MacLaurin, J. G., Rippstein, P., Park, D. S., Shore, G. C., McBride, H. M., Penninger, J. M. and Slack, R. S. (2006) Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in

- maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *Embo J*, 25: 4061-4073.
- Chimini, G. (2004) [phosphatidylserine receptor and clearance of apoptotic cells]. *Med Sci (Paris)*, 20: 501-502.
- Chinnaiyan, A. M., Hanna, W. L., Orth, K., Duan, H., Poirier, G. G., Froelich, C. J. and Dixit, V. M. (1996) Cytotoxic t-cell-derived granzyme b activates the apoptotic protease ice-lap3. *Curr Biol*, 6: 897-899.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R. and Dixit, V. M. (1997) Interaction of ced-4 with ced-3 and ced-9: A molecular framework for cell death. *Science*, 275: 1122-1126.
- Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D. D. and Green, D. R. (2005) Puma couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science*, 309: 1732-1735.
- Chipuk, J. E., Fisher, J. C., Dillon, C. P., Kriwacki, R. W., Kuwana, T. and Green, D. R. (2008) Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 20327-20332.
- Chipuk, J. E. and Green, D. R. (2003) P53's believe it or not: Lessons on transcription-independent death. *J Clin Immunol*, 23: 355-361.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M. and Green, D. R. (2004) Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303: 1010-1014.
- Chowdhury, I., Tharakan, B. and Bhat, G. K. (2006) Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*, 11: 506-525.
- Ciardiello, F. and Tortora, G. (2001) A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*, 7: 2958-2970.
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A. and David, C. N. (1999) Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan hydra. *Curr Biol*, 9: 959-962.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L. and De Strooper, B. (2006) Mitochondrial rhomboid parl regulates cytochrome c release during apoptosis via opa1-dependent cristae remodeling. *Cell*, 126: 163-175.
- Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M. J. and Chan, F. K. (2005) Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between trail receptor 4 (tr4) and tr2 regulates trail-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 18099-18104.
- Clarke, P. G. (1990) Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*, 181: 195-213.
- Clarke, P. G., Posada, A., Primi, M. P. and Castagne, V. (1998) Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother*, 52: 356-362.
- Clarke, S. J., McStay, G. P. and Halestrap, A. P. (2002) Sangliferin acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-d at a different site from cyclosporin a. *J Biol Chem*, 277: 34793-34799.
- Clere, N., Bermont, L., Fauconnet, S., Lascombe, I., Saunier, M., Vettoretti, L., Plissonnier, M. L. and Mougou, C. (2007) The human papillomavirus type 18 e6 oncoprotein induces vascular endothelial growth factor 121 (vegf121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Exp Cell Res*, 313: 3239-3250.
- Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Munoz, N. and Franceschi, S. (2003) Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: A meta-analysis. *Br J Cancer*, 88: 63-73.
- Clohessy, J. G., Zhuang, J., de Boer, J., Gil-Gomez, G. and Brady, H. J. (2006) Mcl-1 interacts with truncated bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 281: 5750-5759.
- Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters, C., Scapozza, L., Yousefi, S. and Simon, H. U. (2008) Caspase-8 is activated by cathepsin d initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *J Exp Med*, 205: 685-698.
- Cregan, S. P., Dawson, V. L. and Slack, R. S. (2004) Role of aif in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*, 23: 2785-2796.
- Cregan, S. P., Fortin, A., MacLaurin, J. G., Callaghan, S. M., Cecconi, F., Yu, S. W., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Park, D. S., Kroemer, G. and Slack, R. S. (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol*, 158: 507-517.

- Cremesti, A., Paris, F., Grassme, H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins, E. and Kolesnick, R. (2001) Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem*, 276: 23954-23961.
- Crighton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P. R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T. and Ryan, K. M. (2006) Dram, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*, 126: 121-134.
- Crompton, M., Virji, S., Doyle, V., Johnson, N. and Ward, J. M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp*, 66: 167-179.
- Cuervo, A. M. (2004) Autophagy: In sickness and in health. *Trends Cell Biol*, 14: 70-77.
- Culmsee, C., Zhu, C., Landshamer, S., Becattini, B., Wagner, E., Pellecchia, M., Blomgren, K. and Plesnila, N. (2005) Apoptosis-inducing factor triggered by poly(adp-ribose) polymerase and bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 25: 10262-10272.
- Czapski, G. A., Cakala, M., Gajkowska, B. and Strosznajder, J. B. (2006) Poly(adp-ribose) polymerase-1 inhibition protects the brain against systemic inflammation. *Neurochem Int*, 49: 751-755.
- D**
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. and Poirier, G. G. (1999) Poly(adp-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J*, 342 (Pt 2): 249-268.
- Dai, Y., Dent, P. and Grant, S. (2003) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (trail) promotes mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by 7-hydroxystaurosporine and mitogen-activated protein kinase kinase inhibitors in human leukemia cells that ectopically express bcl-2 and bcl-xl. *Mol Pharmacol*, 64: 1402-1409.
- Dai, Y., Pei, X. Y., Rahmani, M., Conrad, D. H., Dent, P. and Grant, S. (2004) Interruption of the nf-kappab pathway by bay 11-7082 promotes ucn-01-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood*, 103: 2761-2770.
- Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: Critical control points. *Cell*, 116: 205-219.
- Darmon, A. J., Ley, T. J., Nicholson, D. W. and Bleackley, R. C. (1996) Cleavage of cpp32 by granzyme b represents a critical role for granzyme b in the induction of target cell DNA fragmentation. *J Biol Chem*, 271: 21709-21712.
- Dasmahapatra, G. P., Didolkar, P., Alley, M. C., Ghosh, S., Sausville, E. A. and Roy, K. K. (2004) In vitro combination treatment with perifosine and ucn-01 demonstrates synergism against prostate (pc-3) and lung (a549) epithelial adenocarcinoma cell lines. *Clin Cancer Res*, 10: 5242-5252.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M. E. (1997) Akt phosphorylation of bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91: 231-241.
- Daugaard, M., Rohde, M. and Jaattela, M. (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*, 581: 3702-3710.
- de Graaf, A. O., van den Heuvel, L. P., Dijkman, H. B., de Abreu, R. A., Birkenkamp, K. U., de Witte, T., van der Reijden, B. A., Smeitink, J. A. and Jansen, J. H. (2004) Bcl-2 prevents loss of mitochondria in cccp-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 299: 533-540.
- de la Motte Rouge, T., Pautier, P., Hamy, A. S., Duvillard, P., Bruna, A., Castaigne, D., Morice, P., Haie-Meder, C. and Lhomme, C. (2006) [medical treatment of metastatic or recurrent cancer of the cervix]. *Bull Cancer*, 93: 263-270.
- Déciron-Bartod, A.Z., Bosset, M., Marchini, A., Plissonnier, M.L., Nicolier, M., Launay, S., Pretet, J.L., Rommelaere, J., Mougin, C. (en préparation) Enhancement of anti-tumor activity of histone deacetylase inhibitors in vitro and in vitro by protein kinase inhibitors in uterine cervix derived-cancer cells.
- Degli Esposti, M., Ferry, G., Masdehors, P., Boutin, J. A., Hickman, J. A. and Dive, C. (2003) Post-translational modification of bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem*, 278: 15749-15757.
- Degtarev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A. and Yuan, J. (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*, 1: 112-119.
- Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S., Guo, L., Hughes, C., Teijido, O., Ducret, T., Ichas, F., Korsmeyer, S. J., Antonsson, B., Jonas, E. A. and Kinnally, K. W. (2005) Oligomeric bax is a component of the putative cytochrome c release channel mac, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell*, 16: 2424-2432.

- Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S. and Kinnally, K. W. (2006) Is mac the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis? *Cell Death Differ*, 13: 1387-1395.
- Delbart, C. (2000). Les mitochondries, biologie et incidences physiologiques, *Editions TEC&DOC, Paris et Editions Médicales Internationales, Cachan*.
- DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W. and Old, L. J. (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 2420-2424.
- Demonty, G., Bernard-Marty, C., Puglisi, F., Mancini, I. and Piccart, M. (2007) Progress and new standards of care in the management of her-2 positive breast cancer. *Eur J Cancer*, 43: 497-509.
- Denecker, G., Vercammen, D., Declercq, W. and Vandenaabeele, P. (2001) Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci*, 58: 356-370.
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y. and Wu, X. (2003) A jnk-dependent pathway is required for tnfa-induced apoptosis. *Cell*, 115: 61-70.
- Dini, L., Lentini, A., Diez, G. D., Rocha, M., Falasca, L., Serafino, L. and Vidal-Vanaclocha, F. (1995) Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci*, 108 (Pt 3): 967-973.
- Dohrman, A., Russell, J. Q., Cuenin, S., Fortner, K., Tschopp, J. and Budd, R. C. (2005) Cellular flip long form augments caspase activity and death of t cells through heterodimerization with and activation of caspase-8. *J Immunol*, 175: 311-318.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S. and Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356: 215-221.
- Dong, W., Yu, N. and Bai, B. (1997) [total hip replacement in patients with steroid-induced femoral head necrosis]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 11: 161-163.
- Dornish, J. M., Pettersen, E. O. and Oftebro, R. (1987) Synergistic cell inactivation by cis-dichlorodiammineplatinum in combination with 1-propargyl-5-chloropyrimidin-2-one. *Br J Cancer*, 56: 273-278.
- Droin, N., Beauchemin, M., Solary, E. and Bertrand, R. (2000) Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade. *Cancer Res*, 60: 7039-7047.
- Droin, N., Dubrez, L., Eymin, B., Renvoize, C., Breard, J., Dimanche-Boitrel, M. T. and Solary, E. (1998) Upregulation of casp genes in human tumor cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Oncogene*, 16: 2885-2894.
- Droin, N., Rebe, C., Bichat, F., Hammann, A., Bertrand, R. and Solary, E. (2001) Modulation of apoptosis by procaspase-2 short isoform: Selective inhibition of chromatin condensation, apoptotic body formation and phosphatidylserine externalization. *Oncogene*, 20: 260-269.
- Du, L., Zhang, X., Han, Y. Y., Burke, N. A., Kochanek, P. M., Watkins, S. C., Graham, S. H., Carcillo, J. A., Szabo, C. and Clark, R. S. (2003) Intra-mitochondrial poly(adp-ribosylation) contributes to nad⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *J Biol Chem*, 278: 18426-18433.
- Duan, H. and Dixit, V. M. (1997) Raidd is a new 'death' adaptor molecule. *Nature*, 385: 86-89.
- Dubreux-Daloz, L., Dupoux, A. and Cartier, J. (2008) IAPs : More than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*, 7: 1036-1046.
- Duda, D. G., Batchelor, T. T., Willett, C. G. and Jain, R. K. (2007a) Vegf-targeted cancer therapy strategies: Current progress, hurdles and future prospects. *Trends Mol Med*, 13: 223-230.
- Duda, D. G., Jain, R. K. and Willett, C. G. (2007b) Antiangiogenics: The potential role of integrating this novel treatment modality with chemoradiation for solid cancers. *J Clin Oncol*, 25: 4033-4042.
- Dumont, C., Durrbach, A., Bidere, N., Rouleau, M., Kroemer, G., Bernard, G., Hirsch, F., Charpentier, B., Susin, S. A. and Senik, A. (2000) Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood t lymphocytes: Reversibility at low apoptotic insult. *Blood*, 96: 1030-1038.
- Dumont, P., Leu, J. I., Della Pietra, A. C., 3rd, George, D. L. and Murphy, M. (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*, 33: 357-365.
- Duneau, M., Boyer-Guittaut, M., Gonzalez, P., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J. and Legrand, A. (2005) Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release. *Exp Cell Res*, 302: 194-205.
- Duvall, E. and Wyllie, A. H. (1986) Death and the cell. *Immunol Today*, 7: 115-119.

E

- Eastman, A. (1986) Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(ii) with DNA. *Biochemistry*, 25: 3912-3915.
- El Fitori, J., Su, Y., Buchler, P., Ludwig, R., Giese, N. A., Buchler, M. W., Quentmeier, H., Hines, O. J., Herr, I. and Friess, H. (2007) Pkc 412 small-molecule tyrosine kinase inhibitor: Single-compound therapy for pancreatic cancer. *Cancer*, 110: 1457-1468.
- Eliasson, M. J., Sampei, K., Mandir, A. S., Hurn, P. D., Traystman, R. J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z. Q., Dawson, T. M., Snyder, S. H. and Dawson, V. L. (1997) Poly(adp-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med*, 3: 1089-1095.
- Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44: 817-829.
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C. and Young, P. R. (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand trail. *J Biol Chem*, 273: 14363-14367.
- Emoto, K., Toyama-Sorimachi, N., Karasuyama, H., Inoue, K. and Umeda, M. (1997) Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp Cell Res*, 232: 430-434.
- Enari, M., Hug, H. and Nagata, S. (1995) Involvement of an ice-like protease in fas-mediated apoptosis. *Nature*, 375: 78-81.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-activated dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor icad. *Nature*, 391: 43-50.
- Erster, S., Mihara, M., Kim, R. H., Petrenko, O. and Moll, U. M. (2004) In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol*, 24: 6728-6741.
- Erster, S. and Moll, U. M. (2004) Stress-induced p53 runs a direct mitochondrial death program: Its role in physiologic and pathophysiologic stress responses in vivo. *Cell Cycle*, 3: 1492-1495.
- Erster, S. and Moll, U. M. (2005) Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun*, 331: 843-850.
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A. and Martinou, J. C. (1998) Bax-induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on mg²⁺ ions. *J Cell Biol*, 143: 217-224.
- Espinoza-Fonseca, L. M. (2005) Targeting mdm2 by the small molecule rita: Towards the development of new multi-target drugs against cancer. *Theor Biol Med Model*, 2: 38.
- Esposti, M. D. (1998) Apoptosis: Who was first? *Cell Death Differ*, 5: 719.
- Esquela-Kerscher, A. and Slack, F. J. (2006) Oncomirs - micrnas with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6: 259-269.
- Evan, G. and Littlewood, T. (1998) A matter of life and cell death. *Science*, 281: 1317-1322.

E

- Fadeel, B., Ottosson, A. and Pervaiz, S. (2008) Big wheel keeps on turning: Apoptosome regulation and its role in chemoresistance. *Cell Death Differ*, 15: 443-452.
- Fahrer, J., Kranaster, R., Altmeyer, M., Marx, A. and Burkle, A. (2007) Quantitative analysis of the binding affinity of poly(adp-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. *Nucleic Acids Res*, 35: e143.
- Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B. and Walczak, H. (2007) Trail signalling: Decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 1462-1475.
- Fang, X., Yu, S., Eder, A., Mao, M., Bast, R. C., Jr., Boyd, D. and Mills, G. B. (1999) Regulation of bad phosphorylation at serine 112 by the ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene*, 18: 6635-6640.
- Feldmann, G., Haouzi, D., Moreau, A., Durand-Schneider, A. M., Bringuier, A., Berson, A., Mansouri, A., Fau, D. and Pessayre, D. (2000) Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology*, 31: 674-683.
- Fergelot, P., Rioux-Leclercq, N. and Patard, J. J. (2005) [molecular pathways of tumour angiogenesis and new targeted therapeutic approaches in renal cancer]. *Prog Urol*, 15: 1021-1029.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. and Parkin, D. M. (2001) Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. Lyon: IARC Scientific Publications.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R. C., Krebs, J., Srinivasula, S. M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L. C., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G. and Alnemri, E. S. (1996) In vitro

- activation of cyp32 and mch3 by mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two fadd-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 7464-7469.
- Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. and Alnemri, E. S. (1995a) Mch2, a new member of the apoptotic ced-3/ice cysteine protease gene family. *Cancer Res*, 55: 2737-2742.
- Fernandes-Alnemri, T., Takahashi, A., Armstrong, R., Krebs, J., Fritz, L., Tomaselli, K. J., Wang, L., Yu, Z., Croce, C. M., Salveson, G. and et al. (1995b) Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to cyp32. *Cancer Res*, 55: 6045-6052.
- Ferrari, D., Stepczynska, A., Los, M., Wesselborg, S. and Schulze-Osthoff, K. (1998) Differential regulation and atp requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during cd95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J Exp Med*, 188: 979-984.
- Ferraro, E. and Cecconi, F. (2007) Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, 462: 210-219.
- Fesik, S. W. (2000) Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell*, 103: 273-282.
- Fesik, S. W. and Shi, Y. (2001) Structural biology. Controlling the caspases. *Science*, 294: 1477-1478.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T. and Vandenabeele, P. (2006) Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*, 1757: 1371-1387.
- Fichtinger-Schepman, A. M., van der Veer, J. L., den Hartog, J. H., Lohman, P. H. and Reedijk, J. (1985) Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(ii) with DNA: Formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*, 24: 707-713.
- Finzer, P., Krueger, A., Stohr, M., Brenner, D., Soto, U., Kuntzen, C., Krammer, P. H. and Rosl, F. (2004) Hdac inhibitors trigger apoptosis in hpv-positive cells by inducing the e2f-p73 pathway. *Oncogene*, 23: 4807-4817.
- Finzer, P., Kuntzen, C., Soto, U., zur Hausen, H. and Rosl, F. (2001) Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. *Oncogene*, 20: 4768-4776.
- Fleischer, A., Ghadiri, A., Dessauge, F., Duhamel, M., Cayla, X., Garcia, A. and Rebollo, A. (2004) Bad-dependent rafts alteration is a consequence of an early intracellular signal triggered by interleukin-4 deprivation. *Mol Cancer Res*, 2: 674-684.
- Fleischer, A., Ghadiri, A., Dessauge, F., Duhamel, M., Rebollo, M. P., Alvarez-Franco, F. and Rebollo, A. (2006) Modulating apoptosis as a target for effective therapy. *Mol Immunol*, 43: 1065-1079.
- Flemming, W. (1885) Über die bildung von richtungsfiguren in säugethiereiern beim untergang graaf'scher follikel. *Arch Anat EntwGesch*, 221-244.
- Fong, W. G., Liston, P., Rajcan-Separovic, E., St Jean, M., Craig, C. and Korneluk, R. G. (2000) Expression and genetic analysis of xiap-associated factor 1 (xaf1) in cancer cell lines. *Genomics*, 70: 113-122.
- Franklin, M. C., Carey, K. D., Vajdos, F. F., Leahy, D. J., de Vos, A. M. and Sliwkowski, M. X. (2004) Insights into erbb signaling from the structure of the erbb2-pertuzumab complex. *Cancer Cell*, 5: 317-328.
- Fraival, H. N. and Roberts, J. J. (1979) G1 phase chinese hamster v79-379a cells are inherently more sensitive to platinum bound to their DNA than mid s phase or asynchronously treated cells. *Biochem Pharmacol*, 28: 1575-1580.
- Frese, S., Pirnia, F., Miescher, D., Krajewski, S., Borner, M. M., Reed, J. C. and Schmid, R. A. (2003) Pg490-mediated sensitization of lung cancer cells to apo2l/trail-induced apoptosis requires activation of erk2. *Oncogene*, 22: 5427-5435.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R. S., Danial, N. N., De Strooper, B. and Scorrano, L. (2006) Opa1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, 126: 177-189.
- Frisch, S. M. and Screaton, R. A. (2001) Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 13: 555-562.
- Fu, K. K. (1985) Biological basis for the interaction of chemotherapeutic agents and radiation therapy. *Cancer*, 55: 2123-2130.
- Fujita, N., Nagahashi, A., Nagashima, K., Rokudai, S. and Tsuruo, T. (1998) Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of bcl-xl protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene*, 17: 1295-1304.
- Fulda, S., Kufer, M. U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B. and Debatin, K. M. (2001) Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene*, 20: 5865-5877.

- Fulda, S., Meyer, E. and Debatin, K. M. (2002) Inhibition of trail-induced apoptosis by bcl-2 overexpression. *Oncogene*, 21: 2283-2294.
- Fuster, J. J., Sanz-Gonzalez, S. M., Moll, U. M. and Andres, V. (2007) Classic and novel roles of p53: Prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med*, 13: 192-199.
- FUTUREII (2007) Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med*, 356: 1915-1927.

G

- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2007) Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 14: 1237-1243.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. (1998) Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem*, 273: 32608-32613.
- Garland, S. M., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Harper, D. M., Leodolter, S., Tang, G. W., Ferris, D. G., Steben, M., Bryan, J., Taddeo, F. J., Railkar, R., Esser, M. T., Sings, H. L., Nelson, M., Boslego, J., Sattler, C., Barr, E. and Koutsky, L. A. (2007) Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med*, 356: 1928-1943.
- Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E. and Kroemer, G. (2006a) Heat shock proteins 27 and 70: Anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*, 5: 2592-2601.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C. and Kroemer, G. (2006b) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 13: 1423-1433.
- Gartenhaus, R. B., Wang, P. and Hoffmann, P. (1996) Induction of the waf1/cip1 protein and apoptosis in human t-cell leukemia virus type i-transformed lymphocytes after treatment with adriamycin by using a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 265-268.
- Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 4: 891-899.
- Germain, M., Mathai, J. P., McBride, H. M. and Shore, G. C. (2005) Endoplasmic reticulum bcl-2 initiates drp1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J*, 24: 1546-1556.
- Gescher, A. (2000) Staurosporine analogues - pharmacological toys or useful antitumour agents? *Crit Rev Oncol Hematol*, 34: 127-135.
- Giannini, S. L., Hanon, E., Moris, P., Van Mechelen, M., Morel, S., Dessy, F., Fourneau, M. A., Colau, B., Suzich, J., Losonksy, G., Martin, M. T., Dubin, G. and Wettendorff, M. A. (2006) Enhanced humoral and memory b cell immunity using hpv16/18 l1 vlp vaccine formulated with the mpl/aluminium salt combination (as04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*, 24: 5937-5949.
- Gillick, K. and Crompton, M. (2008) Evaluating cytochrome c diffusion in the intermembrane spaces of mitochondria during cytochrome c release. *J Cell Sci*, 121: 618-626.
- Gilman, A. (1963) The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg*, 105: 574-578.
- Gogvadze, V., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (2006) Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1757: 639-647.
- Goldstein, J. C., Kluck, R. M. and Green, D. R. (2000a) A single cell analysis of apoptosis. Ordering the apoptotic phenotype. *Ann N Y Acad Sci*, 926: 132-141.
- Goldstein, J. C., Munoz-Pinedo, C., Ricci, J. E., Adams, S. R., Kelekar, A., Schuler, M., Tsien, R. Y. and Green, D. R. (2005) Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ*, 12: 453-462.
- Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. and Green, D. R. (2000b) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*, 2: 156-162.
- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H. and Lavrik, I. N. (2005) C-flipr, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 280: 14507-14513.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. (2003) The calpain system. *Physiol Rev*, 83: 731-801.
- Golstein, P., Aubry, L. and Levraud, J. P. (2003) Cell-death alternative model organisms: Why and which? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 798-807.
- Golstein, P. and Kroemer, G. (2005) Redundant cell death mechanisms as relics and backups. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2: 1490-1496.
- Golstein, P. and Kroemer, G. (2007a) Cell death by necrosis: Towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32: 37-43.
- Golstein, P. and Kroemer, G. (2007b) A multiplicity of cell death pathways. Symposium on apoptotic and non-apoptotic cell death pathways. *EMBO Rep*, 8: 829-833.

- Gonzalez-Polo, R. A., Boya, P., Pauleau, A. L., Jalil, A., Larochette, N., Souquere, S., Eskelinen, E. L., Pierron, G., Saftig, P. and Kroemer, G. (2005) The apoptosis/autophagy paradox: Autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci*, 118: 3091-3102.
- Gonzalez, P., Duneau, M., Charpentier, S., Normand, T., Mollet, L., Dubois, M. and Legrand, A. (2007) Destabilization of membranes containing cardiolipin or its precursors by peptides derived from mitogaligin, a cell death protein. *Biochemistry*, 46: 7374-7382.
- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C. and Perez, J. M. (2001) Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol*, 59: 657-663.
- Gozuacik, D. and Kimchi, A. (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23: 2891-2906.
- Gräper, L. (1914) Eine neue anschauung über physiologische zellausschaltung. *Arch Zellforsch*, 373-394.
- Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. F. (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol*, 2: REVIEWS1018.
- Green, D. and Kroemer, G. (1998) The central executioners of apoptosis: Caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol*, 8: 267-271.
- Green, D. R. (2005) Apoptotic pathways: Ten minutes to dead. *Cell*, 121: 671-674.
- Green, D. R. and Evan, G. I. (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell*, 1: 19-30.
- Green, D. R. and Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305: 626-629.
- Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Korsmeyer, S. J. (1999) Caspase cleaved bid targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while bcl-xl prevents this release but not tumor necrosis factor-r1/fas death. *J Biol Chem*, 274: 1156-1163.
- Grossman, D., Kim, P. J., Blanc-Brude, O. P., Brash, D. E., Tognin, S., Marchisio, P. C. and Altieri, D. C. (2001) Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts uvb-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest*, 108: 991-999.
- Grunhagen, D. J., de Wilt, J. H., ten Hagen, T. L. and Eggermont, A. M. (2006) Technology insight: Utility of tnf-alpha-based isolated limb perfusion to avoid amputation of irresectable tumors of the extremities. *Nat Clin Pract Oncol*, 3: 94-103.
- Gullo, J. J., Litterst, C. L., Maguire, P. J., Sikic, B. I., Hoth, D. F. and Woolley, P. V. (1980) Pharmacokinetics and protein binding of cis-dichlorodiammine platinum (ii) administered as a one hour or as a twenty hour infusion. *Cancer Chemother Pharmacol*, 5: 21-26.
- ## H
- Hahn, M., Li, W., Yu, C., Rahmani, M., Dent, P. and Grant, S. (2005) Rapamycin and ucn-01 synergistically induce apoptosis in human leukemia cells through a process that is regulated by the raf-1/mek/erk, akt, and jnk signal transduction pathways. *Mol Cancer Ther*, 4: 457-470.
- Haince, J. F., Rouleau, M., Hendzel, M. J., Masson, J. Y. and Poirier, G. G. (2005) Targeting poly(adp-ribosyl)ation: A promising approach in cancer therapy. *Trends Mol Med*, 11: 456-463.
- Haldar, S., Jena, N. and Croce, C. M. (1995) Inactivation of bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 4507-4511.
- Halestrap, A. P. and Brennerb, C. (2003) The adenine nucleotide translocase: A central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem*, 10: 1507-1525.
- Halestrap, A. P., Connern, C. P., Griffiths, E. J. and Kerr, P. M. (1997) Cyclosporin a binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*, 174: 167-172.
- Hall, S. E., Savill, J. S., Henson, P. M. and Haslett, C. (1994) Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol*, 153: 3218-3227.
- Hampton, M. B. and Orrenius, S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: Implications for apoptosis. *FEBS Lett*, 414: 552-556.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- Hanson, C. J., Bootman, M. D., Distelhorst, C. W., Wojcikiewicz, R. J. and Roderick, H. L. (2008) Bcl-2 suppresses ca(2+) release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and inhibits ca(2+) uptake by mitochondria without affecting er calcium store content. *Cell Calcium*, 44: 324-338.
- Hantz, S., Alain, S. and Denis, F. (2006) [human papillomavirus prophylactic vaccines: Stakes

- and perspectives]. *Gynecol Obstet Fertil*, 34: 647-655.
- Hao, Z., Duncan, G. S., Chang, C. C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., Yeh, W. C., Ohashi, P., Wang, X. and Mak, T. W. (2005) Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome c reveals a differential requirement for cytochrome c and apaf-1 in apoptosis. *Cell*, 121: 579-591.
- Haouzi, D., Lekehal, M., Tinel, M., Vadrot, N., Caussanel, L., Letteron, P., Moreau, A., Feldmann, G., Fau, D. and Pessayre, D. (2001) Prolonged, but not acute, glutathione depletion promotes fas-mediated mitochondrial permeability transition and apoptosis in mice. *Hepatology*, 33: 1181-1188.
- Harper, N., Hughes, M. A., Farrow, S. N., Cohen, G. M. and MacFarlane, M. (2003) Protein kinase c modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling. *J Biol Chem*, 278: 44338-44347.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387: 296-299.
- Hawkins, C. J., Yoo, S. J., Peterson, E. P., Wang, S. L., Vernooy, S. Y. and Hay, B. A. (2000) The drosophila caspase dronc cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by diap1, hid, and grim. *J Biol Chem*, 275: 27084-27093.
- He, L., He, X., Lim, L. P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A. L., Linsley, P. S., Chen, C., Lowe, S. W., Cleary, M. A. and Hannon, G. J. (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447: 1130-1134.
- He, L. and Lemasters, J. J. (2002) Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: A new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett*, 512: 1-7.
- Heald, R., McLoughlin, M. and McKeon, F. (1993) Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated cdc2 kinase. *Cell*, 74: 463-474.
- Heeres, J. T. and Hergenrother, P. J. (2007) Poly(adp-ribose) makes a date with death. *Curr Opin Chem Biol*, 11: 644-653.
- Heiskanen, K. M., Bhat, M. B., Wang, H. W., Ma, J. and Nieminen, A. L. (1999) Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in pc6 cells. *J Biol Chem*, 274: 5654-5658.
- Hemstrom, T. H., Joseph, B., Schulte, G., Lewensohn, R. and Zhivotovsky, B. (2005) Pkc 412 sensitizes u1810 non-small cell lung cancer cells to DNA damage. *Exp Cell Res*, 305: 200-213.
- Hengartner, M. O., Ellis, R. E. and Horvitz, H. R. (1992) *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature*, 356: 494-499.
- Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R. (1994a) Activation of c. *Elegans* cell death protein ced-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in bcl-2. *Nature*, 369: 318-320.
- Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R. (1994b) Programmed cell death in *caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev*, 4: 581-586.
- Henry-Mowatt, J., Dive, C., Martinou, J. C. and James, D. (2004) Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene*, 23: 2850-2860.
- Hernandez, L. D., Pypaert, M., Flavell, R. A. and Galan, J. E. (2003) A salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy. *J Cell Biol*, 163: 1123-1131.
- Higuchi, Y. (2003) Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol*, 66: 1527-1535.
- Hildesheim, A., Herrero, R., Wacholder, S., Rodriguez, A. C., Solomon, D., Bratti, M. C., Schiller, J. T., Gonzalez, P., Dubin, G., Porras, C., Jimenez, S. E. and Lowy, D. R. (2007) Effect of human papillomavirus 16/18 I1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: A randomized trial. *Jama*, 298: 743-753.
- Hill, J. M. and Speer, R. J. (1982) Organoplatinum complexes as antitumor agents (review). *Anticancer Res*, 2: 173-186.
- Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M. and Martin, S. J. (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native apaf-1 apoptosomes. *Embo J*, 23: 2134-2145.
- Hill, M. M., Andjelkovic, M., Brazil, D. P., Ferrari, S., Fabbro, D. and Hemmings, B. A. (2001) Insulin-stimulated protein kinase b phosphorylation on ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *J Biol Chem*, 276: 25643-25646.
- Holbro, T., Civenni, G. and Hynes, N. E. (2003) The erbb receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*, 284: 99-110.

- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B. and Tschopp, J. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase rip as effector molecule. *Nat Immunol*, 1: 489-495.
- Holmgren, L., Bergsmedh, A. and Spetz, A. L. (2002) Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Vox Sang*, 83 Suppl 1: 305-306.
- Hong, S. J., Dawson, T. M. and Dawson, V. L. (2004) Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: Parp-1 and aif signaling. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 259-264.
- Hougardy, B. M., van der Zee, A. G., van den Heuvel, F. A., Timmer, T., de Vries, E. G. and de Jong, S. (2005) Sensitivity to fas-mediated apoptosis in high-risk hpv-positive human cervical cancer cells: Relationship with fas, caspase-8, and bid. *Gynecol Oncol*, 97: 353-364.
- Houseweart, M. K., Vilaythong, A., Yin, X. M., Turk, B., Noebels, J. L. and Myers, R. M. (2003) Apoptosis caused by cathepsins does not require bid signaling in an in vivo model of progressive myoclonus epilepsy (epm1). *Cell Death Differ*, 10: 1329-1335.
- Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D. V. (1995) The tnfr receptor 1-associated protein tradd signals cell death and nf-kappa b activation. *Cell*, 81: 495-504.
- Hsueh, C. T., Kelsen, D. and Schwartz, G. K. (1998) Ucn-01 suppresses thymidylate synthase gene expression and enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in a sequence-dependent manner. *Clin Cancer Res*, 4: 2201-2206.
- Huang, Y. and Sheikh, M. S. (2007) Trail death receptors and cancer therapeutics. *Toxicol Appl Pharmacol*, 224: 284-289.
- Huang, Y., Shin, N. H., Sun, Y. and Wang, K. K. (2001) Molecular cloning and characterization of a novel caspase-3 variant that attenuates apoptosis induced by proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 762-769.
- Hubert, P. (2007) [growth factors of the egf family and their receptors]. *Bull Cancer*, 94: F137-145.
- Hunter, D. R., Haworth, R. A. and Southard, J. H. (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem*, 251: 5069-5077.
- Husain, A., Yan, X. J., Rosales, N., Aghajanian, C., Schwartz, G. K. and Spriggs, D. R. (1997) Ucn-01 in ovary cancer cells: Effective as a single agent and in combination with cis-diamminedichloroplatinum(ii) independent of p53 status. *Clin Cancer Res*, 3: 2089-2097.
- Huser, J., Rechenmacher, C. E. and Blatter, L. A. (1998) Imaging the permeability pore transition in single mitochondria. *Biophys J*, 74: 2129-2137.
- lanzini, F. and Mackey, M. A. (1997) Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic catastrophe following irradiation of hela s3 cells. *Int J Radiat Biol*, 72: 409-421.
- Ichase, F. and Mazat, J. P. (1998) From calcium signaling to cell death: Two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta*, 1366: 33-50.
- Igney, F. H. and Krammer, P. H. (2002) Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2: 277-288.
- Illmer, T. and Ehninger, G. (2007) Flt3 kinase inhibitors in the management of acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma*, 8 Suppl 1: S24-34.
- Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S. and Yamamoto, T. (2000) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (traf) family: Adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res*, 254: 14-24.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. and Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular flip. *Nature*, 388: 190-195.
- Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoeve, L. G., Masucci, M., Pramanik, A. and Selivanova, G. (2004) Small molecule rita binds to p53, blocks p53-hdm-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med*, 10: 1321-1328.
- Italiano, A., Besse, B., Planchard, D. and Soria, J. C. (2007) [targeting epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer: Current advances and perspectives]. *Bull Cancer*, 94: F177-188.
- Ito, T., Deng, X., Carr, B. and May, W. S. (1997) Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem*, 272: 11671-11673.

- Jackson, J. R., Gilmartin, A., Imburgia, C., Winkler, J. D., Marshall, L. A. and Roshak, A. (2000) An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage. *Cancer Res*, 60: 566-572.
- Jacobson, M. D., Weil, M. and Raff, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347-354.
- Jamieson, E. R. and Lippard, S. J. (1999) Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev*, 99: 2467-2498.
- Jane, E. P., Premkumar, D. R. and Pollack, I. F. (2007) Ag490 influences ucn-01-induced cytotoxicity in glioma cells in a p53-dependent fashion, correlating with effects on bax cleavage and bad phosphorylation. *Cancer Lett*, 257: 36-46.
- Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K. H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J. N., McKinnon, P. J., Cleveland, J. L. and Zambetti, G. P. (2003) Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, 4: 321-328.
- Jiang, X., Kim, H. E., Shu, H., Zhao, Y., Zhang, H., Kofron, J., Donnelly, J., Burns, D., Ng, S. C., Rosenberg, S. and Wang, X. (2003) Distinctive roles of p53 proteins and prothymosin- α in a death regulatory pathway. *Science*, 299: 223-226.
- Jiang, X. and Wang, X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to apaf-1. *J Biol Chem*, 275: 31199-31203.
- Jimeno, A., Rudek, M. A., Purcell, T., Laheru, D. A., Messersmith, W. A., Dancey, J., Carducci, M. A., Baker, S. D., Hidalgo, M. and Donehower, R. C. (2008) Phase I and pharmacokinetic study of ucn-01 in combination with irinotecan in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 61: 423-433.
- Jin, Z., Gao, F., Flagg, T. and Deng, X. (2004) Nicotine induces multi-site phosphorylation of bad in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem*, 279: 23837-23844.
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D. and Slack, F. J. (2005) Ras is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120: 635-647.
- Jones, C. B., Clements, M. K., Wasi, S. and Daoud, S. S. (2000) Enhancement of camptothecin-induced cytotoxicity with ucn-01 in breast cancer cells: Abrogation of s/g(2) arrest. *Cancer Chemother Pharmacol*, 45: 252-258.
- Jonson, A. L., Rogers, L. M., Ramakrishnan, S. and Downs, L. S., Jr. (2008) Gene silencing with siRNA targeting e6/e7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer. *Gynecol Oncol*.
- Joza, N., Oudit, G. Y., Brown, D., Benit, P., Kassiri, Z., Vahsen, N., Benoit, L., Patel, M. M., Nowikovsky, K., Vassault, A., Backx, P. H., Wada, T., Kroemer, G., Rustin, P. and Penninger, J. M. (2005) Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biol*, 25: 10261-10272.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G. and Penninger, J. M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410: 549-554.

K

- Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Potapovich, A. I., Kini, V., Amoscato, A. A. and Fujii, Y. (2004) Oxidative lipidomics of apoptosis: Redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radic Biol Med*, 37: 1963-1985.
- Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., Osipov, A. N., Belikova, N. A., Kapralov, A. A., Kini, V., Vlasova, I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D. A., Kurnikov, I. V. and Borisenko, G. G. (2005) Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol*, 1: 223-232.
- Kagedal, K., Johansson, A. C., Johansson, U., Heimlich, G., Roberg, K., Wang, N. S., Jurgensmeier, J. M. and Ollinger, K. (2005) Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis—Involvement of bax? *Int J Exp Pathol*, 86: 309-321.
- Kaji, A., Zhang, Y., Nomura, M., Bode, A. M., Ma, W. Y., She, Q. B. and Dong, Z. (2003) Pifithrin- α promotes p53-mediated apoptosis in j6 cells. *Mol Carcinog*, 37: 138-148.
- Kamer, I., Sarig, R., Zaltsman, Y., Niv, H., Oberkovitz, G., Regev, L., Haimovich, G., Lerenthal, Y., Marcellus, R. C. and Gross, A. (2005) Proapoptotic bid is an atm effector in

- the DNA-damage response. *Cell*, 122: 593-603.
- Kanai, M., Hanashiro, K., Kim, S. H., Hanai, S., Boulares, A. H., Miwa, M. and Fukasawa, K. (2007) Inhibition of crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribose)ylation. *Nat Cell Biol*, 9: 1175-1183.
- Karpinich, N. O., Tafani, M., Schneider, T., Russo, M. A. and Farber, J. L. (2006) The course of etoposide-induced apoptosis in jurkat cells lacking p53 and bax. *J Cell Physiol*, 208: 55-63.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. and Yagita, H. (1995) Metalloproteinase-mediated release of human fas ligand. *J Exp Med*, 182: 1777-1783.
- Keilin, D. (1930) Cytochrome and intracellular oxidase. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 106: 418-444.
- Kerr, J. F. (1971) Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J Pathol*, 105: 13-20.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257.
- Khodjakov, A., Rieder, C., Mannella, C. A. and Kinnally, K. W. (2004) Laser micro-irradiation of mitochondria: Is there an amplified mitochondrial death signal in neural cells? *Mitochondrion*, 3: 217-227.
- Kidd, V. J., Lahti, J. M. and Teitz, T. (2000) Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*, 11: 191-201.
- Kim, J. M., Luo, L. and Zirkin, B. R. (2000) Caspase-3 activation is required for leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. *Endocrinology*, 141: 1846-1853.
- Kimberley, F. C. and Sreaton, G. R. (2004) Following a trail: Update on a ligand and its five receptors. *Cell Res*, 14: 359-372.
- Kjaer, S. K., van den Brule, A. J., Bock, J. E., Poll, P. A., Engholm, G., Sherman, M. E., Walboomers, J. M. and Meijer, C. J. (1996) Human papillomavirus—the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, 65: 601-606.
- Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., Seburn, K. L., Hurd, R. E., Frankel, W. N., Bronson, R. T. and Ackerman, S. L. (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*, 419: 367-374.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. and Ohsumi, Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, 5: 539-545.
- Kohler, C., Gahm, A., Noma, T., Nakazawa, A., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (1999) Release of adenylate kinase 2 from the mitochondrial intermembrane space during apoptosis. *FEBS Lett*, 447: 10-12.
- Komarov, P. G., Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Christov-Tselkov, K., Coon, J. S., Chernov, M. V. and Gudkov, A. V. (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*, 285: 1733-1737.
- Komarova, E. A. and Gudkov, A. V. (2000) Suppression of p53: A new approach to overcome side effects of antitumor therapy. *Biochemistry (Mosc)*, 65: 41-48.
- Komarova, E. A. and Gudkov, A. V. (2001) Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: Potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 62: 657-667.
- Komiyama, T., Ray, C. A., Pickup, D. J., Howard, A. D., Thornberry, N. A., Peterson, E. P. and Salvesen, G. (1994) Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin crma. An example of cross-class inhibition. *J Biol Chem*, 269: 19331-19337.
- Kops, G. J., Weaver, B. A. and Cleveland, D. W. (2005) On the road to cancer: Aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*, 5: 773-785.
- Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J. and Schlesinger, P. H. (2000) Pro-apoptotic cascade activates bid, which oligomerizes bak or bax into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*, 7: 1166-1173.
- Kovacovics, M., Martinon, F., Micheau, O., Bodmer, J. L., Hofmann, K. and Tschopp, J. (2002) Overexpression of helicard, a card-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Curr Biol*, 12: 838-843.
- Krajewska, M., Wang, H. G., Krajewski, S., Zapata, J. M., Shabaik, A., Gascoyne, R. and Reed, J. C. (1997) Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of cyp32 (caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res*, 57: 1605-1613.
- Krammer, P. H. (2000) Cd95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407: 789-795.
- Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S. and Quirion, R. (2007) Apoptosis-inducing factor: A matter of neuron life and death. *Prog Neurobiol*, 81: 179-196.

- Kroemer, G., Dallaporta, B. and Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 619-642.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S. and Melino, G. (2005) Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2: 1463-1467.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87: 99-163.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. and Melino, G. (2009) Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ*, 16: 3-11.
- Kroemer, G. and Jaattela, M. (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer*, 5: 886-897.
- Kroemer, G. and Martin, S. J. (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med*, 11: 725-730.
- Kroemer, G., Zamzami, N. and Susin, S. A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, 18: 44-51.
- Kruyt, F. A. (2008) Trail and cancer therapy. *Cancer Lett*, 263: 14-25.
- Krysko, D. V., Denecker, G., Festjens, N., Gabriels, S., Parthoens, E., D'Herde, K. and Vandenabeele, P. (2006) Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ*, 13: 2011-2022.
- Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K. and Vandenabeele, P. (2008) Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44: 205-221.
- Kulms, D., Dussmann, H., Poppelmann, B., Stander, S., Schwarz, A. and Schwarz, T. (2002) Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of cd95 (fas/apo-1). *Cell Death Differ*, 9: 598-608.
- Kumar, S. (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 14: 32-43.
- Kumar, S. and Colussi, P. A. (1999) Prodomains--adaptors--oligomerization: The pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci*, 24: 1-4.
- Kuo, M. L., Shen, S. C., Yang, C. H., Chuang, S. E., Cheng, A. L. and Huang, T. S. (1998) Bcl-2 prevents topoisomerase ii inhibitor gl331-induced apoptosis is mediated by down-regulation of poly(adp-ribose)polymerase activity. *Oncogene*, 17: 2225-2234.
- Kutuk, O. and Letai, A. (2008) Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by abt-737. *Cancer Res*, 68: 7985-7994.
- Lab, V., Grespi, F., Baumgartner, F. and Villunger, A. (2008) Targeting the bcl-2-regulated apoptosis pathway by bh3 mimetics: A breakthrough in anticancer therapy? *Cell Death Differ*, 15: 977-987.
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G. A., Jr., Booth, C. J., Mehal, W. Z., Inayat, I. and Flavell, R. A. (2006) Caspases 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 311: 847-851.
- Lassus, P., Opitz-Araya, X. and Lazebnik, Y. (2002) Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*, 297: 1352-1354.
- LeBlanc, H., Lawrence, D., Varfolomeev, E., Totpal, K., Morlan, J., Schow, P., Fong, S., Schwall, R., Sinicropi, D. and Ashkenazi, A. (2002) Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic bcl-2 homolog bax. *Nat Med*, 8: 274-281.
- LeBlanc, H. N. and Ashkenazi, A. (2003) Apo2l/trail and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ*, 10: 66-75.
- Lee, C. Y. and Baehrecke, E. H. (2001) Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development*, 128: 1443-1455.
- Lee, Y. S. and Dutta, A. (2007) The tumor suppressor microrna let-7 represses the hmga2 oncogene. *Genes Dev*, 21: 1025-1030.
- Lehman, T. A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennett, W. P., Welsh, J. A., Metcalf, R. A., Stampfer, M. R., Fusenig, N., Rogan, E. M. and et al. (1993) P53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, 14: 833-839.
- Leist, M. and Jaattela, M. (2001) Four deaths and a funeral: From caspases to alternative

- mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 589-598.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kuhnle, S. and Nicotera, P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (atp) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*, 185: 1481-1486.
- Lens, S. M., Wolthuis, R. M., Klompmaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G. and Medema, R. H. (2003) Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *Embo J*, 22: 2934-2947.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S. and Korsmeyer, S. J. (2002) Distinct bh3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2: 183-192.
- Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E. and George, D. L. (2004) Mitochondrial p53 activates bak and causes disruption of a bak-mcl1 complex. *Nat Cell Biol*, 6: 443-450.
- Levesque, A. A. and Eastman, A. (2007) P53-based cancer therapies: Is defective p53 the achilles heel of the tumor? *Carcinogenesis*, 28: 13-20.
- Levine, A. J. (1997) P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323-331.
- Levine, B. and Yuan, J. (2005) Autophagy in cell death: An innocent convict? *J Clin Invest*, 115: 2679-2688.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94: 491-501.
- Li, K., Li, Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Spencer, E., Chen, Z. J., Wang, X. and Williams, R. S. (2000) Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*, 101: 389-399.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X. (1997) Cytochrome c and datp-dependent formation of apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91: 479-489.
- Li, S., Zhao, Y., He, X., Kim, T. H., Kuharsky, D. K., Rabinowich, H., Chen, J., Du, C. and Yin, X. M. (2002) Relief of extrinsic pathway inhibition by the bid-dependent mitochondrial release of smac in fas-mediated hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem*, 277: 26912-26920.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. and Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402: 672-676.
- Liang, X. H., Kleeman, L. K., Jiang, H. H., Gordon, G., Goldman, J. E., Berry, G., Herman, B. and Levine, B. (1998) Protection against fatal sindbis virus encephalitis by beclin, a novel bcl-2-interacting protein. *J Virol*, 72: 8586-8596.
- Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y. H., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C. and Zhang, X. K. (2004) Conversion of bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor nur77/tr3. *Cell*, 116: 527-540.
- Lindsten, T. and Thompson, C. B. (2006) Cell death in the absence of bax and bak. *Cell Death Differ*, 13: 1272-1276.
- Liston, P., Fong, W. G., Kelly, N. L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C. G., McBurney, M. W. and Korneluk, R. G. (2001) Identification of xaf1 as an antagonist of xiap anti-caspase activity. *Nat Cell Biol*, 3: 128-133.
- Liston, P., Fong, W. G. and Korneluk, R. G. (2003) The inhibitors of apoptosis: There is more to life than bcl2. *Oncogene*, 22: 8568-8580.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for datp and cytochrome c. *Cell*, 86: 147-157.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T. and Wang, X. (1998) The 40-kda subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 8461-8466.
- Liu, X., Luo, X., Shi, Y., Zhu, G. D., Penning, T., Giranda, V. L. and Luo, Y. (2008) Poly (adp-ribose) polymerase activity regulates apoptosis in hela cells after alkylating DNA damage. *Cancer Biol Ther*, 7: 934-941.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1997) Dff, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89: 175-184.
- Lockshin, R. A. and Zakeri, Z. (2001) Programmed cell death and apoptosis: Origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 545-550.
- Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J. (2001) The tnf and tnf receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*, 104: 487-501.
- Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Metivier, D., Nieminen, A. L., Brothers, G., Penninger, J. M. and Kroemer, G. (2001)

- Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *Faseb J*, 15: 758-767.
- Longthorne, V. L. and Williams, G. T. (1997) Caspase activity is required for commitment to fas-mediated apoptosis. *Embo J*, 16: 3805-3812.
- Lorenzo, H. K. and Susin, S. A. (2007) Therapeutic potential of aif-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist Updat*, 10: 235-255.
- Lorin, S., Codogno, P. and Djavaheri-Mergny, M. (2008) [autophagy: A new concept in cancer research]. *Bull Cancer*, 95: 43-50.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94: 481-490.
- Luthi, A. U. and Martin, S. J. (2007) The casbah: A searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 14: 641-650.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X. and Wang, X. (2000) Cardiolipin provides specificity for targeting of bcl2 to mitochondria. *Nat Cell Biol*, 2: 754-761.
- Ly, J. D., Grubb, D. R. and Lawen, A. (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8: 115-128.
- M**
- Mackey, M. A., Morgan, W. F. and Dewey, W. C. (1988) Nuclear fragmentation and premature chromosome condensation induced by heat shock in s-phase chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*, 48: 6478-6483.
- Madden, D. T., Egger, L. and Bredesen, D. E. (2007) A calpain-like protease inhibits autophagic cell death. *Autophagy*, 3: 519-522.
- Magistretti, P. J. and Pellerin, L. (1999) Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354: 1155-1163.
- Magrini, R., Russo, D., Ottaggio, L., Fronza, G., Inga, A. and Menichini, P. (2008) Prima-1 synergizes with adriamycin to induce cell death in non-small cell lung cancer cells. *J Cell Biochem*, 104: 2363-2373.
- Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J. A., Geneste, O. and Kroemer, G. (2007a) Functional and physical interaction between bcl-x(l) and a bh3-like domain in beclin-1. *Embo J*, 26: 2527-2539.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. and Kroemer, G. (2007b) Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 741-752.
- Majno, G. and Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146: 3-15.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2001) To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*, 1: 222-231.
- Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciola-Rosen, L. A. and Rosen, A. (1998) The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: Implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol*, 140: 1485-1495.
- Mandal, M., Adam, L. and Kumar, R. (1999) Redistribution of activated caspase-3 to the nucleus during butyric acid-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 260: 775-780.
- Maragos, W. F., Rockich, K. T., Dean, J. J. and Young, K. L. (2003) Pre- or post-treatment with the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates striatal quinolinate lesions. *Brain Res*, 966: 312-316.
- Marchenko, N. D. and Moll, U. M. (2007) The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53. *Cell Cycle*, 6: 1718-1723.
- Marchenko, N. D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K. and Moll, U. M. (2007) Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *Embo J*, 26: 923-934.
- Marchenko, N. D., Zaika, A. and Moll, U. M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*, 275: 16202-16212.
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeflner, A., Hirsch, F., Geuskens, M. and Kroemer, G. (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*, 184: 1155-1160.
- Mariani, S. M. and Krammer, P. H. (1998) Surface expression of trail/apo-2 ligand in activated mouse t and b cells. *Eur J Immunol*, 28: 1492-1498.
- Marini, P. (2006) Drug evaluation: Lexatumumab, an intravenous human agonistic mab targeting trail receptor 2. *Curr Opin Mol Ther*, 8: 539-546.
- Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L. and Lenardo, M. J. (1998) Membrane oligomerization and cleavage activates the

- caspase-8 (fllice/machalpha1) death signal. *J Biol Chem*, 273: 4345-4349.
- Martinez-Caballero, S., Dejean, L. M., Jonas, E. A. and Kinnally, K. W. (2005) The role of the mitochondrial apoptosis induced channel mac in cytochrome c release. *J Bioenerg Biomembr*, 37: 155-164.
- Martinou, J. C., Desagher, S. and Antonsson, B. (2000) Cytochrome c release from mitochondria: All or nothing. *Nat Cell Biol*, 2: E41-43.
- Martinou, J. C. and Youle, R. J. (2006) Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ*, 13: 1291-1295.
- Martins, L. M. (2002) The serine protease omi/htra2: A second mammalian protein with a reaper-like function. *Cell Death Differ*, 9: 699-701.
- Mashima, T. and Tsuruo, T. (2005) Defects of the apoptotic pathway as therapeutic target against cancer. *Drug Resist Updat*, 8: 339-343.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. and White, E. (2007) Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 7: 961-967.
- Matsumori, Y., Hong, S. M., Aoyama, K., Fan, Y., Kayama, T., Sheldon, R. A., Vexler, Z. S., Ferriero, D. M., Weinstein, P. R. and Liu, J. (2005) Hsp70 overexpression sequesters aif and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25: 899-910.
- Mattson, M. P. (2004) Pathways towards and away from alzheimer's disease. *Nature*, 430: 631-639.
- Maudrell, K., Antonsson, B., Magnenat, E., Camps, M., Muda, M., Chabert, C., Gillieron, C., Boschert, U., Vial-Knecht, E., Martinou, J. C. and Arkinstall, S. (1997) Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-jun n-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active gtp-binding protein rac1. *J Biol Chem*, 272: 25238-25242.
- Mauro, M. J., O'Dwyer, M., Heinrich, M. C. and Druker, B. J. (2002) Sti571: A paradigm of new agents for cancer therapeutics. *J Clin Oncol*, 20: 325-334.
- McStay, G. P., Salvesen, G. S. and Green, D. R. (2008) Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: Implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ*, 15: 322-331.
- Médicament, C. N. H. d. I. s. I. (2008). Anticancéreux : Utilisation pratique, 6ème édition, *Revue d'évaluation sur le médicament* 5-6,
- Meijer, L. (2006) Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Bull Cancer*, 93 (n° hors série): 41-53.
- Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E. and Micheau, O. (2006) Differential inhibition of trail-mediated dr5-disc formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol*, 26: 7046-7055.
- Metivier, D., Dallaporta, B., Zamzami, N., Larochette, N., Susin, S. A., Marzo, I. and Kroemer, G. (1998) Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early cd95/fas/apo-1-triggered apoptosis of jurkat t lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunol Lett*, 61: 157-163.
- Metzstein, M. M., Stanfield, G. M. and Horvitz, H. R. (1998) Genetics of programmed cell death in c. Elegans: Past, present and future. *Trends Genet*, 14: 410-416.
- Meurice, F. (2007). Vaccination prophylactique contre les hpv : Que savons-nous déjà et quelles sont les principales questions en suspens?, *Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus - J.Monsonogo*.
- Micheau, O. and Tschopp, J. (2003) Induction of tnfr receptor i-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114: 181-190.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U. M. (2003) P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, 11: 577-590.
- Mihara, M. and Moll, U. M. (2003) Detection of mitochondrial localization of p53. *Methods Mol Biol*, 234: 203-209.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Degenhardt, K., Venkatachalam, M. A., White, E. and Saikumar, P. (2003) Association of bax and bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem*, 278: 5367-5376.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D. J., Dong, Z., Venkatachalam, M. A. and Saikumar, P. (2001) Bcl-2 prevents bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, 276: 18361-18374.
- Miller, L. K. (1999) An exegesis of iaps: Salvation and surprises from bir motifs. *Trends Cell Biol*, 9: 323-328.
- Miramar, M. D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L. M., Haouzi, D., Brothers, G., Penninger, J. M., Peleato, M. L., Kroemer, G. and Susin, S. A. (2001) Nadh oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*, 276: 16391-16398.

- Mitamura, S., Ikawa, H., Mizuno, N., Kaziro, Y. and Itoh, H. (1998) Cytosolic nuclease activated by caspase-3 and inhibited by dff-45. *Biochem Biophys Res Commun*, 243: 480-484.
- Mitchell, P. and Moyle, J. (1965a) Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature*, 208: 1205-1206.
- Mitchell, P. and Moyle, J. (1965b) Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria. *Nature*, 208: 147-151.
- Mizushima, N. (2005) The pleiotropic role of autophagy: From protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2: 1535-1541.
- Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F. and Kroemer, G. (2006) Apoptosis-inducing factor: Vital and lethal. *Trends Cell Biol*, 16: 264-272.
- Mongiat, M., Ligresti, G., Marastoni, S., Lorenzon, E., Doliana, R. and Colombatti, A. (2007) Regulation of the extrinsic apoptotic pathway by the extracellular matrix glycoprotein emilin2. *Mol Cell Biol*, 27: 7176-7187.
- Moubarak, R. S., Yuste, V. J., Artus, C., Bouharrour, A., Greer, P. A., Menissier-de Murcia, J. and Susin, S. A. (2007) Sequential activation of poly(adp-ribose) polymerase 1, calpains, and bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol*, 27: 4844-4862.
- Mougin, C., Aubin, F. and Pretet, J. L. (2003). Papillomavirus humains, biologie et pathologie tumorale, *Editions TEC&DOC, Paris et Editions Médicales Internationales, Cachan*.
- Mowat, M., Cheng, A., Kimura, N., Bernstein, A. and Benchimol, S. (1985) Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by friend virus. *Nature*, 314: 633-636.
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L. and Fesik, S. W. (1996) X-ray and nmr structure of human bcl-xl, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381: 335-341.
- Mullauer, L., Gruber, P., Sebinger, D., Buch, J., Wohlfart, S. and Chott, A. (2001) Mutations in apoptosis genes: A pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res*, 488: 211-231.
- Munoz-Gamez, J. A., Martin-Oliva, D., Aguilar-Quesada, R., Canuelo, A., Nunez, M. I., Valenzuela, M. T., Ruiz de Almodovar, J. M., De Murcia, G. and Oliver, F. J. (2005) Parp inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem J*, 386: 119-125.
- Munoz-Pinedo, C., Guio-Carrion, A., Goldstein, J. C., Fitzgerald, P., Newmeyer, D. D. and Green, D. R. (2006) Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 11573-11578.
- Munoz, N. (2000) Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence. *J Clin Virol*, 19: 1-5.
- Munoz, N., Bosch, F. X., Castellsague, X., Diaz, M., de Sanjose, S., Hammouda, D., Shah, K. V. and Meijer, C. J. (2004) Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*, 111: 278-285.

N

- Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365.
- Nagata, S. and Golstein, P. (1995) The fas death factor. *Science*, 267: 1449-1456.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T. and Tsujimoto, Y. (2005) Cyclophilin d-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, 434: 652-658.
- Nakagawa, Y. (2004) Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci*, 1011: 177-184.
- Nakagawara, A., Nakamura, Y., Ikeda, H., Hiwasa, T., Kuida, K., Su, M. S., Zhao, H., Cnaan, A. and Sakiyama, S. (1997) High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 beta converting enzyme (ice) and cpp32 in favorable human neuroblastomas. *Cancer Res*, 57: 4578-4584.
- Nakano, K. and Vousden, K. H. (2001) Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7: 683-694.
- Nechushtan, A., Smith, C. L., Lamensdorf, I., Yoon, S. H. and Youle, R. J. (2001) Bax and bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol*, 153: 1265-1276.

- Neise, D., Graupner, V., Gillissen, B. F., Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K., Janicke, R. U. and Essmann, F. (2007) Activation of the mitochondrial death pathway is commonly mediated by a preferential engagement of bak. *Oncogene*.
- Nicolier, M., Decrion-Barthod, A. Z., Launay, S., Pretet, J. L. and Mouglin, C. (2009) Spatiotemporal activation of caspase-dependent and -independent pathways in staurosporine-induced apoptosis of p53wt and p53mt human cervical carcinoma cells. *Biol Cell*, in press.
- Nicotera, P., Leist, M. and Ferrando-May, E. (1999) Apoptosis and necrosis: Different execution of the same death. *Biochem Soc Symp*, 66: 69-73.
- Nicotera, P. and Melino, G. (2004) Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 23: 2757-2765.
- Nieminen, A. I., Partanen, J. I. and Klefstrom, J. (2007) C-myc blazing a trail of death: Coupling of the mitochondrial and death receptor apoptosis pathways by c-myc. *Cell Cycle*, 6: 2464-2472.
- Niikura, Y., Dixit, A., Scott, R., Perkins, G. and Kitagawa, K. (2007) Bub1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate. *J Cell Biol*, 178: 283-296.
- Nishikawa, A. and Hayashi, H. (1995) Spatial, temporal and hormonal regulation of programmed muscle cell death during metamorphosis of the frog *xenopus laevis*. *Differentiation*, 59: 207-214.
- Nissen, F. (1886) Über das Verhalten der Kerne in den Milchdrüsenzellen bei der Absonderung. *Arch Mikroskop Anat*, 337-342.
- O**
- Oakes, S. A., Scorrano, L., Opferman, J. T., Bassik, M. C., Nishino, M., Pozzan, T. and Korsmeyer, S. J. (2005) Proapoptotic bax and bak regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 105-110.
- Oberstein, A., Jeffrey, P. D. and Shi, Y. (2007) Crystal structure of the bcl-xl-beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel bh3-only protein. *J Biol Chem*, 282: 13123-13132.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N. (2000) Noxa, a bh3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288: 1053-1058.
- Ogawa, O., Zhu, X., Lee, H. G., Raina, A., Obrenovich, M. E., Bowser, R., Ghanbari, H. A., Castellani, R. J., Perry, G. and Smith, M. A. (2003) Ectopic localization of phosphorylated histone h3 in alzheimer's disease: A mitotic catastrophe? *Acta Neuropathol*, 105: 524-528.
- Oh, K. J., Barbuto, S., Meyer, N., Kim, R. S., Collier, R. J. and Korsmeyer, S. J. (2005) Conformational changes in bid, a proapoptotic bcl-2 family member, upon membrane binding. A site-directed spin labeling study. *J Biol Chem*, 280: 753-767.
- Ohashi, M., Sugikawa, E. and Nakanishi, N. (1995) Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: A possible anticancer mechanism. *Jpn J Cancer Res*, 86: 819-827.
- Ohsumi, Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 211-216.
- Ohsumi, Y. and Mizushima, N. (2004) Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Semin Cell Dev Biol*, 15: 231-236.
- Okada, H. and Mak, T. W. (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 4: 592-603.
- Oliver, F. J., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G. (1999) Poly(adp-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease. *Am J Hum Genet*, 64: 1282-1288.
- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C. and Hainaut, P. (2002) The iarc tp53 database: New online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*, 19: 607-614.
- Olsson, S. E., Villa, L. L., Costa, R. L., Petta, C. A., Andrade, R. P., Malm, C., Iversen, O. E., Høye, J., Steinwall, M., Riis-Johannessen, G., Andersson-Ellstrom, A., Elfgren, K., von Krogh, G., Lehtinen, M., Paavonen, J., Tamms, G. M., Giacoletti, K., Lupinacci, L., Esser, M. T., Vuocolo, S. C., Saah, A. J. and Barr, E. (2007) Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (hpv) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (vlp) vaccine. *Vaccine*, 25: 4931-4939.
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y. and Masuma, R. (1977) A new alkaloid am-2282 of streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, 30: 275-282.

- Opferman, J. T. and Korsmeyer, S. J. (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*, 4: 410-415.
- Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (2005) Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. *Nat Chem Biol*, 1: 188-189.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. and Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 552-565.
- Otera, H., Ohsakaya, S., Nagaura, Z., Ishihara, N. and Mihara, K. (2005) Export of mitochondrial aif in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *Embo J*, 24: 1375-1386.
- Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (2002) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 1259-1263.
- Ottlie, S., Wang, Y., Banks, S., Chang, J., Vigna, N. J., Weeks, S., Armstrong, R. C., Fritz, L. C. and Oltersdorf, T. (1997) Mutational analysis of the interacting cell death regulators ced-9 and ced-4. *Cell Death Differ*, 4: 526-533.
- Overholtzer, M., Mailleux, A. A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S. J., King, R. W., Cibas, E. S. and Brugge, J. S. (2007) A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, 131: 966-979.
- Ow, Y. L., Green, D. R., Hao, Z. and Mak, T. W. (2008) Cytochrome c: Functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 532-542.
- Ozoren, N. and El-Deiry, W. S. (2002) Defining characteristics of types i and ii apoptotic cells in response to trail. *Neoplasia*, 4: 551-557.
- P**
- Paavonen, J., Jenkins, D., Bosch, F. X., Naud, P., Salmeron, J., Wheeler, C. M., Chow, S. N., Apter, D. L., Kitchener, H. C., Castellsague, X., de Carvalho, N. S., Skinner, S. R., Harper, D. M., Hedrick, J. A., Jaisamrarn, U., Limson, G. A., Dionne, M., Quint, W., Spiessens, B., Peeters, P., Struyf, F., Wieting, S. L., Lehtinen, M. O. and Dubin, G. (2007) Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent I1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: An interim analysis of a phase iii double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 369: 2161-2170.
- Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Domingo, D. and Yahalom, J. (2001) A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*, 61: 439-444.
- Pandey, P., Farber, R., Nakazawa, A., Kumar, S., Bharti, A., Nalin, C., Weichselbaum, R., Kufe, D. and Kharbanda, S. (2000a) Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene*, 19: 1975-1981.
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S. M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E. S., Kufe, D. and Kharbanda, S. (2000b) Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J*, 19: 4310-4322.
- Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., Solary, E. and Garrido, C. (2003) Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 505-512.
- Park, M. S., Kim, B. S. and Devarajan, P. (2007) Hypoxia/re-oxygenation injury induces apoptosis of llc-pk1 cells by activation of caspase-2. *Pediatr Nephrol*, 22: 202-208.
- Parkin, D. M., Bray, F. I. (2006) Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 24 Suppl 3: S3/11-25.
- Parkin, D. M., Bray, F. I. and Devesa, S. S. (2001) Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 8: S4-66.
- Parrado, A., Robledo, M., Moya-Quiles, M. R., Marin, L. A., Chomienne, C., Padua, R. A. and Alvarez-Lopez, M. R. (2004) The promyelocytic leukemia zinc finger protein down-regulates apoptosis and expression of the proapoptotic bid protein in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1898-1903.
- Pastorino, J. G., Shulga, N. and Hoek, J. B. (2002) Mitochondrial binding of hexokinase ii inhibits bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, 277: 7610-7618.
- Pastorino, J. G., Tafani, M., Rothman, R. J., Marcinkeviciute, A., Hoek, J. B. and Farber, J. L. (1999) Functional consequences of the sustained or transient activation by bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 274: 31734-31739.
- Patel, V., Lahusen, T., Leethanakul, C., Igishi, T., Kremer, M., Quintanilla-Martinez, L., Ensley, J. F., Sausville, E. A., Gutkind, J. S. and Senderowicz, A. M. (2002) Antitumor activity of ucn-01 in carcinomas of the head and neck is associated with altered expression of cyclin d3 and p27(kip1). *Clin Cancer Res*, 8: 3549-3560.

- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. and Levine, B. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122: 927-939.
- Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viot, S. and Arrigo, A. P. (2002) Hsp27 as a negative regulator of cytochrome c release. *Mol Cell Biol*, 22: 816-834.
- Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S. J., Mannella, C. A. and Kinnally, K. W. (2001) A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and bax expression in yeast. *J Cell Biol*, 155: 725-731.
- Penninger, J. M. and Kroemer, G. (2003) Mitochondria, aif and caspases--rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol*, 5: 97-99.
- Perfettini, J. L., Roumier, T., Castedo, M., Larochette, N., Boya, P., Raynal, B., Lazar, V., Ciccocanti, F., Nardacci, R., Penninger, J., Piacentini, M. and Kroemer, G. (2004) Nf-kappab and p53 are the dominant apoptosis-inducing transcription factors elicited by the hiv-1 envelope. *J Exp Med*, 199: 629-640.
- Perfettini, J. L., Roumier, T. and Kroemer, G. (2005) Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 15: 179-183.
- Perier, C., Tieu, K., Guegan, C., Caspersen, C., Jackson-Lewis, V., Carelli, V., Martinuzzi, A., Hirano, M., Przedborski, S. and Vila, M. (2005) Complex i deficiency primes bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 19126-19131.
- Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P. and Di Lisa, F. (1999) Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J*, 76: 725-734.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F. A., van Dyk, L. F., Ho, C. K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B. D., Rice, C. M., Simon, V., Ho, D. D., Zavolan, M. and Tuschl, T. (2005) Identification of micrnas of the herpesvirus family. *Nat Methods*, 2: 269-276.
- Pinedo, H. M. and Peters, G. F. (1988) Fluorouracil: Biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol*, 6: 1653-1664.
- Pinkoski, M. J., Waterhouse, N. J., Heibein, J. A., Wolf, B. B., Kuwana, T., Goldstein, J. C., Newmeyer, D. D., Bleackley, R. C. and Green, D. R. (2001) Granzyme b-mediated apoptosis proceeds predominantly through a bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem*, 276: 12060-12067.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A. and Ashkenazi, A. (1996) Induction of apoptosis by apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 271: 12687-12690.
- Polster, B. M., Basanez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J. M. and Nicholls, D. G. (2005) Calpain i induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem*, 280: 6447-6454.
- Pretet, J. L., Alvarez, E., Monnier-Benoit, S. and Touze, A. (2006) [vaccination against human papillomavirus infections]. *Rev Prat*, 56: 1914-1918.
- Pretet, J. L., Jacquard, A. C., Carcopino, X., Charlot, J. F., Bouhour, D., Kantelip, B., Soubeyrand, B., Leocmach, Y., Mouglin, C. and Riethmuller, D. (2008a) Human papillomavirus (hvp) genotype distribution in invasive cervical cancers in france: Edith study. *Int J Cancer*, 122: 428-432.
- Pretet, J. L., Jacquard, A. C., Carcopino, X., Monnier-Benoit, S., Averous, G., Soubeyrand, B., Leocmach, Y., Mouglin, C. and Riethmuller, D. (2008b) Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (cin 2/3) in france: Edith study. *Int J Cancer*, 122: 424-427.
- Puthalakath, H. and Strasser, A. (2002) Keeping killers on a tight leash: Transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of bh3-only proteins. *Cell Death Differ*, 9: 505-512.
- Q**
- Qin, Z. H., Wang, Y., Kikly, K. K., Sapp, E., Kegel, K. B., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2001) Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem*, 276: 8079-8086.
- R**
- Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B. F., Peterson, E. P., Thornberry, N. A., Huang, J., MacPherson, D. P., Black, S. C., Hornung, F., Lenardo, M. J., Hayden, M. R., Roy, S. and Nicholson, D. W. (1998) Cell death attenuation by 'usurpin', a mammalian ded-

- caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the cd-95 (fas, apo-1) receptor complex. *Cell Death Differ*, 5: 271-288.
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J. M., Garrido, C. and Kroemer, G. (2001) Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*, 3: 839-843.
- Ravagnan, L., Roumier, T. and Kroemer, G. (2002) Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol*, 192: 131-137.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J. and Rubinsztein, D. C. (2004) Inhibition of mtor induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of huntington disease. *Nat Genet*, 36: 585-595.
- Reed, J. C. (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*, 17: 2941-2953.
- Reed, J. C. and Tomaselli, K. J. (2000) Drug discovery opportunities from apoptosis research. *Curr Opin Biotechnol*, 11: 586-592.
- Reggiori, F. and Klionsky, D. J. (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell*, 1: 11-21.
- Rehman, A., Chahal, M. S., Tang, X., Bruce, J. E., Pommier, Y. and Daoud, S. S. (2005) Proteomic identification of heat shock protein 90 as a candidate target for p53 mutation reactivation by prima-1 in breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 7: R765-774.
- Resbeut, M., Fondrinier, E., Fervers, B., Haie-Meder, C., Bataillard, A., Lhomme, C., Asselain, B., Basuyau, J. P., Bremond, A., Castaigne, D., Dubois, J. B., Houvenaeghel, G., Lartigau, E., Leblanc, E., Sastre-Garau, X., Sarradet, A., Guastalla, J. P. and Chauvergne, J. (2003) [standards, options and recommendations for the management of invasive cervical cancer patients (non metastatic)]. *Bull Cancer*, 90: 333-346.
- Ricci, J. E., Gottlieb, R. A. and Green, D. R. (2003) Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol*, 160: 65-75.
- Ricci, J. E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G. A., Yadava, N., Scheffler, I. E., Ellisman, M. H. and Green, D. R. (2004a) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex i of the electron transport chain. *Cell*, 117: 773-786.
- Ricci, M. S., Jin, Z., Dews, M., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., Dicker, D. T. and El-Deiry, W. S. (2004b) Direct repression of flip expression by c-myc is a major determinant of trail sensitivity. *Mol Cell Biol*, 24: 8541-8555.
- Ricci, M. S., Kim, S. H., Ogi, K., Plataras, J. P., Ling, J., Wang, W., Jin, Z., Liu, Y. Y., Dicker, D. T., Chiao, P. J., Flaherty, K. T., Smith, C. D. and El-Deiry, W. S. (2007) Reduction of trail-induced mcl-1 and ciap2 by c-myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to trail-induced death. *Cancer Cell*, 12: 66-80.
- Riedl, S. J. and Salvesen, G. S. (2007) The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 405-413.
- Roach, H. I. and Clarke, N. M. (2000) Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br*, 82: 601-613.
- Roberr, J. and Hoerni, B. (2001). Thérapeutique des cancers : Chimiothérapie. In : Hoerni b., ed. Cancérologie pour la praticien, paris, massp,,
- Robert, J. (2005). Pharmacologie des médicaments anticancéreux., In : Lacave CJ, Tobert J, eds Cancérologie fondamentale Montrouge, John Libbery Eurotext.
- Robert, J. (2006) De la chimiothérapie classique à la chimiothérapie ciblées : Les mécanismes de l'oncogenèse aux niveaux cellulaire et moléculaire. *Bull Cancer*, hors série : 5-16:
- Robert, J. (2007) [what is a targeted therapy? The view of the biologist]. *Bull Cancer*, 94: F101-110.
- Robertson, J. D., Gogvadze, V., Kropotov, A., Vakifahmetoglu, H., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (2004) Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Rep*, 5: 643-648.
- Rodriguez-Enriquez, S., He, L. and Lemasters, J. J. (2004) Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 2463-2472.
- Rodriguez-Enriquez, S., Kim, I., Currin, R. T. and Lemasters, J. J. (2006) Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy*, 2: 39-46.
- Roninson, I. B., Broude, E. V. and Chang, B. D. (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*, 4: 303-313.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Grimley, E. B. and Thomson, A. J. (1967) The inhibition of

- growth or cell division in escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes. *J Biol Chem*, 242: 1347-1352.
- Rosenberg, B., Vancamp, L. and Krigas, T. (1965) Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205: 698-699.
- Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E. and Mansour, V. H. (1969) Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222: 385-386.
- Roshal, M., Zhu, Y. and Planelles, V. (2001) Apoptosis in aids. *Apoptosis*, 6: 103-116.
- Rostovtseva, T. K., Tan, W. and Colombini, M. (2005) On the role of vDAC in apoptosis: Fact and fiction. *J Bioenerg Biomembr*, 37: 129-142.
- Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A. and Becker, J. W. (1996) The three-dimensional structure of apopain/cpp32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*, 3: 619-625.
- Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B. and Martinou, J. C. (2002a) Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J*, 368: 915-921.
- Roucou, X., Rostovtseva, T., Montessuit, S., Martinou, J. C. and Antonsson, B. (2002b) Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes. *Biochem J*, 363: 547-552.
- Roumier, T., Castedo, M., Perfettini, J. L., Andraeu, K., Metivier, D., Zamzami, N. and Kroemer, G. (2003) Mitochondrion-dependent caspase activation by the HIV-1 envelope. *Biochem Pharmacol*, 66: 1321-1329.
- Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O. and Klionsky, D. J. (2007) Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*, 6: 304-312.
- Rudner, J., Jendrossek, V., Lauber, K., Daniel, P. T., Wesselborg, S. and Belka, C. (2005) Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies. *Oncogene*, 24: 130-140.
- Rupinder, S. K., Gurpreet, A. K. and Manjeet, S. (2007) Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol*, 46: 383-393.
- Rusch, S. L. and Kendall, D. A. (1995) Protein transport via amino-terminal targeting sequences: Common themes in diverse systems. *Mol Membr Biol*, 12: 295-307.
- Russell, P. and Nurse, P. (1986) Cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, 45: 145-153.
- ## S
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. and Vandennebeele, P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23: 2861-2874.
- Saez, M. E., Ramirez-Lorca, R., Moron, F. J. and Ruiz, A. (2006) The therapeutic potential of the calpain family: New aspects. *Drug Discov Today*, 11: 917-923.
- Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. (1999) Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*, 401: 168-173.
- Saito, M., Korsmeyer, S. J. and Schlesinger, P. H. (2000) Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol*, 2: 553-555.
- Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998) Cleavage of caspase inhibitor in caspase activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391: 96-99.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Balkir, L., Robbins, P. D. and Alnemri, E. S. (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by hsp70. *Nat Cell Biol*, 2: 476-483.
- Salles, B., Butour, J. L., Lesca, C. and Macquet, J. P. (1983) Cis-pt(nh3)2cl2 and trans-pt(nh3)2cl2 inhibit DNA synthesis in cultured I1210 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 112: 555-563.
- Salvesen, G. S. and Abrams, J. M. (2004) Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene*, 23: 2774-2784.
- Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1999) Caspase activation: The induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 10964-10967.
- Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D. P. and Orrenius, S. (1999) Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, hsp60 and hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *Embo J*, 18: 2040-2048.
- Samejima, K. and Earnshaw, W. C. (2005) Trashing the genome: The role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 677-688.
- Santin, A. D., Bellone, S., Gokden, M., Cannon, M. J. and Parham, G. P. (2002) Vaccination with HPV-18 E7-pulsed dendritic cells in a patient with metastatic cervical cancer. *N Engl J Med*, 346: 1752-1753.

- Sardao, V. A., Oliveira, P. J., Holy, J., Oliveira, C. R. and Wallace, K. B. (2009) Doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction is secondary to nuclear p53 activation in h9c2 cardiomyoblasts. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Sathasivam, S., Ince, P. G. and Shaw, P. J. (2001) Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: A review of the evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27: 257-274.
- Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. (2000) Modulation of akt kinase activity by binding to hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 10832-10837.
- Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. (2002) Interference with pdk1-akt survival signaling pathway by ucn-01 (7-hydroxystaurosporine). *Oncogene*, 21: 1727-1738.
- Sawada, M., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Boothman, D. A. and Matsuyama, S. (2003) Ku70 suppresses the apoptotic translocation of bax to mitochondria. *Nat Cell Biol*, 5: 320-329.
- Sax, J. K., Fei, P., Murphy, M. E., Bernhard, E., Korsmeyer, S. J. and El-Deiry, W. S. (2002) Bid regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*, 4: 842-849.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1998) Two cd95 (apo-1/fas) signaling pathways. *Embo J*, 17: 1675-1687.
- Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Ghidoni, R. and Codogno, P. (2004) Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase b and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem*, 279: 18384-18391.
- Schatz, G. and Dobberstein, B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 271: 1519-1526.
- Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J. C. and Howley, P. M. (1991) The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 5523-5527.
- Schendel, S. L., Montal, M. and Reed, J. C. (1998) Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ*, 5: 372-380.
- Schickel, R., Boyerinas, B., Park, S. M. and Peter, M. E. (2008) Micrnas: Key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*, 27: 5959-5974.
- Schinzel, A., Kaufmann, T. and Borner, C. (2004) Bcl-2 family members: Integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim Biophys Acta*, 1644: 95-105.
- Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G. and Korsmeyer, S. J. (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic bax and antiapoptotic bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 11357-11362.
- Schuler, M. and Green, D. R. (2005) Transcription, apoptosis and p53: Catch-22. *Trends Genet*, 21: 182-187.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A. and Korsmeyer, S. J. (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*, 2: 55-67.
- Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T. and Korsmeyer, S. J. (2003) Bax and bak regulation of endoplasmic reticulum ca2+: A control point for apoptosis. *Science*, 300: 135-139.
- Senderowicz, A. M. (2000) Small molecule modulators of cyclin-dependent kinases for cancer therapy. *Oncogene*, 19: 6600-6606.
- Senderowicz, A. M. (2003) Novel direct and indirect cyclin-dependent kinase modulators for the prevention and treatment of human neoplasms. *Cancer Chemother Pharmacol*, 52 Suppl 1: S61-73.
- Seo, Y. W., Shin, J. N., Ko, K. H., Cha, J. H., Park, J. Y., Lee, B. R., Yun, C. W., Kim, Y. M., Seol, D. W., Kim, D. W., Yin, X. M. and Kim, T. H. (2003) The molecular mechanism of noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death. *J Biol Chem*, 278: 48292-48299.
- Seol, D. W. and Billiar, T. R. (1999) A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem*, 274: 2072-2076.
- Seth, R., Yang, C., Kaushal, V., Shah, S. V. and Kaushal, G. P. (2005) P53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *J Biol Chem*, 280: 31230-31239.
- Shall, S. and de Murcia, G. (2000) Poly(adp-ribose) polymerase-1: What have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res*, 460: 1-15.
- Shankar, S. L., Krupski, M., Parashar, B., Okwuaka, C., O'Guin, K., Mani, S. and Shafit-Zagardo, B. (2004) Ucn-01 alters phosphorylation of akt and gsk3beta and induces apoptosis in six independent human

- neuroblastoma cell lines. *J Neurochem*, 90: 702-711.
- Shao, R. G., Cao, C. X., Shimizu, T., O'Connor, P. M., Kohn, K. W. and Pommier, Y. (1997) Abrogation of an s-phase checkpoint and potentiation of camptothecin cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (ucn-01) in human cancer cell lines, possibly influenced by p53 function. *Cancer Res*, 57: 4029-4035.
- Shao, R. G., Cao, C. X., Zhang, H., Kohn, K. W., Wold, M. S. and Pommier, Y. (1999) Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of rpa by DNA-dependent protein kinase and dissociates rpa:DNA-pk complexes. *Embo J*, 18: 1397-1406.
- Sharonov, G. V., Feofanov, A. V., Bocharova, O. V., Astapova, M. V., Dedukhova, V. I., Chernyak, B. V., Dolgikh, D. A., Arseniev, A. S., Skulachev, V. P. and Kirpichnikov, M. P. (2005) Comparative analysis of proapoptotic activity of cytochrome c mutants in living cells. *Apoptosis*, 10: 797-808.
- Shawgo, M. E., Shelton, S. N. and Robertson, J. D. (2008) Caspase-mediated bak activation and cytochrome c release during intrinsic apoptotic cell death in jurkat cells. *J Biol Chem*,
- Shen, J., Vakifahmetoglu, H., Stridh, H., Zhivotovsky, B. and Wiman, K. G. (2008) Prima-1(met) induces mitochondrial apoptosis through activation of caspase-2. *Oncogene*, 27: 6571-6580.
- Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 9: 459-470.
- Shimizu, E., Zhao, M. R., Nakanishi, H., Yamamoto, A., Yoshida, S., Takada, M., Ogura, T. and Sone, S. (1996) Differing effects of staurosporine and ucn-01 on rb protein phosphorylation and expression of lung cancer cell lines. *Oncology*, 53: 494-504.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B. and Tsujimoto, Y. (2004) Role of bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 6: 1221-1228.
- Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T. and Tsujimoto, Y. (2000) Bh4 domain of antiapoptotic bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 3100-3105.
- Shintani, T. and Klionsky, D. J. (2004) Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science*, 306: 990-995.
- Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R. and Shi, Y. (2003) Mechanism of xiap-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*, 11: 519-527.
- Simbulan-Rosenthal, C. M., Rosenthal, D. S., Iyer, S., Boulares, H. and Smulson, M. E. (1999) Involvement of parp and poly(adp-ribosylation) in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol Cell Biochem*, 193: 137-148.
- Simonen, M., Keller, H. and Heim, J. (1997) The bh3 domain of bax is sufficient for interaction of bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur J Biochem*, 249: 85-91.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 31-39.
- Skommer, J., Wlodkowic, D. and Deptala, A. (2007) Larger than life: Mitochondria and the bcl-2 family. *Leuk Res*, 31: 277-286.
- Sleath, P. R., Hendrickson, R. C., Kronheim, S. R., March, C. J. and Black, R. A. (1990) Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1 beta. *J Biol Chem*, 265: 14526-14528.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R. and Martin, S. J. (1999) 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*, 144: 281-292.
- Slee, E. A., Keogh, S. A. and Martin, S. J. (2000) Cleavage of bid during cytotoxic drug and uv radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: A potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ*, 7: 556-565.
- Smulson, M. E., Simbulan-Rosenthal, C. M., Boulares, A. H., Yakovlev, A., Stoica, B., Iyer, S., Luo, R., Haddad, B., Wang, Z. Q., Pang, T., Jung, M., Dritschilo, A. and Rosenthal, D. S. (2000) Roles of poly(adp-ribosylation) and parp in apoptosis, DNA repair, genomic stability and functions of p53 and e2f-1. *Adv Enzyme Regul*, 40: 183-215.
- Sohn, D., Graupner, V., Neise, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R. U. (2009) Pifithrin-alpha protects against DNA damage-

- induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell Death Differ*,
- Son, Y. O., Choi, K. C., Lee, J. C., Kook, S. H., Lee, H. J., Jeon, Y. M., Kim, J. G., Kim, J., Lee, W. K. and Jang, Y. S. (2006) Involvement of caspase activation and mitochondrial stress in trichostatin a-induced apoptosis of burkitt's lymphoma cell line, akata. *J Cell Biochem*, 99: 1420-1430.
- Song, J. H., Tse, M. C., Bellail, A., Phuphanich, S., Khuri, F., Kneteman, N. M. and Hao, C. (2007) Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res*, 67: 6946-6955.
- Soussi, T., Dehouche, K. and Beroud, C. (2000) P53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: Forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat*, 15: 105-113.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Guo, Y., Zhan, Y., Lazebnik, Y., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E. S. (1999) Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Res*, 59: 999-1002.
- Srinivasula, S. M., Datta, P., Kobayashi, M., Wu, J. W., Fujioka, M., Hegde, R., Zhang, Z., Mukattash, R., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., Jaynes, J. B. and Alnemri, E. S. (2002) Sickie, a novel drosophila death gene in the reaper/hid/grim region, encodes an iap-inhibitory protein. *Curr Biol*, 12: 125-130.
- Stambolsky, P., Weisz, L., Shats, I., Klein, Y., Goldfinger, N., Oren, M. and Rotter, V. (2006) Regulation of aif expression by p53. *Cell Death Differ*, 13: 2140-2149.
- Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267: 1445-1449.
- Stepczynska, A., Lauber, K., Engels, I. H., Janssen, O., Kabelitz, D., Wesselborg, S. and Schulze-Osthoff, K. (2001) Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene*, 20: 1193-1202.
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S. L., Kim, T. H., Cirman, T., Snipas, S. J., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J. C., Yin, X. M., Turk, V. and Salvesen, G. S. (2001) Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem*, 276: 3149-3157.
- Stone, R. M., DeAngelo, D. J., Klimek, V., Galinsky, I., Estey, E., Nimer, S. D., Grandin, W., Lebwohl, D., Wang, Y., Cohen, P., Fox, E. A., Neuberg, D., Clark, J., Gilliland, D. G. and Griffin, J. D. (2005) Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in flt3 respond to a small-molecule flt3 tyrosine kinase inhibitor, ptk412. *Blood*, 105: 54-60.
- Strom, E., Sathe, S., Komarov, P. G., Chernova, O. B., Pavlovska, I., Shyshynova, I., Bosykh, D. A., Burdelya, L. G., Macklis, R. M., Skaliter, R., Komarova, E. A. and Gudkov, A. V. (2006) Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol*, 2: 474-479.
- Sugiyama, K., Shimizu, M., Akiyama, T., Tamaoki, T., Yamaguchi, K., Takahashi, R., Eastman, A. and Akinaga, S. (2000) Ucn-01 selectively enhances mitomycin c cytotoxicity in p53 defective cells which is mediated through s and/or g(2) checkpoint abrogation. *Int J Cancer*, 85: 703-709.
- Sulston, J. E. and Horvitz, H. R. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, caenorhabditis elegans. *Dev Biol*, 56: 110-156.
- Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., Brothers, G., Mak, T. W., Penninger, J., Earnshaw, W. C. and Kroemer, G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 192: 571-580.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M. and Kroemer, G. (1999a) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med*, 189: 381-394.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. and Kroemer, G. (1999b) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397: 441-446.
- Sutton, V. R., Davis, J. E., Cancilla, M., Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Sedelies, K., Browne, K. A. and Trapani, J. A. (2000) Initiation of apoptosis by granzyme b requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme b-mediated caspase activation. *J Exp Med*, 192: 1403-1414.

I

- Takada, S., Kelkar, A. and Theurkauf, W. E. (2003) Drosophila checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. *Cell*, 113: 87-99.
- Tamaoki, T. (1991) Use and specificity of staurosporine, ucn-01, and calphostin c as protein kinase inhibitors. *Methods Enzymol*, 201: 340-347.
- Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R., Brown, D. and Tatton, N. (2003) Apoptosis in parkinson's disease: Signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3: S61-70; discussion S70-62.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M. B., Vanin, E. F., Grenet, J., Valentine, V. A., Behm, F. G., Look, A. T., Lahti, J. M. and Kidd, V. J. (2000) Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of mycn. *Nat Med*, 6: 529-535.
- Temkin, V., Huang, Q., Liu, H., Osada, H. and Pope, R. M. (2006) Inhibition of adp/atp exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis. *Mol Cell Biol*, 26: 2215-2225.
- Terauchi, S., Yamamoto, T., Yamashita, K., Kataoka, M., Terada, H. and Shinohara, Y. (2005) Molecular basis of morphological changes in mitochondrial membrane accompanying induction of permeability transition, as revealed by immuno-electron microscopy. *Mitochondrion*, 5: 248-254.
- Testa, J. R. and Bellacosa, A. (2001) Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10983-10985.
- Tewari, M. and Dixit, V. M. (1995) Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crma gene product. *J Biol Chem*, 270: 3255-3260.
- Thakkar, H., Chen, X., Tyan, F., Gim, S., Robinson, H., Lee, C., Pandey, S. K., Nwokorie, C., Onwudiwe, N. and Srivastava, R. K. (2001) Pro-survival function of akt/protein kinase b in prostate cancer cells. Relationship with trail resistance. *J Biol Chem*, 276: 38361-38369.
- Thome, M. and Tschopp, J. (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by flip. *Nat Rev Immunol*, 1: 50-58.
- Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-1462.
- Thon, L., Mohlig, H., Mathieu, S., Lange, A., Bulanova, E., Winoto-Morbach, S., Schutze, S., Bulfone-Paus, S. and Adam, D. (2005) Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *Faseb J*, 19: 1945-1956.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J. and et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356: 768-774.
- Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: Enemies within. *Science*, 281: 1312-1316.
- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. and Nicholson, D. W. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme b. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*, 272: 17907-17911.
- Timmer, J. C. and Salvesen, G. S. (2007) Caspase substrates. *Cell Death Differ*, 14: 66-72.
- Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajerova, A., Dehner, A., Klein, C., Pan, H., Kessler, H., Pancoska, P. and Moll, U. M. (2006) Wt p53, but not tumor-derived mutants, bind to bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem*, 281: 8600-8606.
- Toyota, H., Yanase, N., Yoshimoto, T., Moriyama, M., Sudo, T. and Mizuguchi, J. (2003) Calpain-induced bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type bax. *Cancer Lett*, 189: 221-230.
- Trapani, J. A. (2001) Granzymes: A family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol*, 2: REVIEWS3014.
- Tschopp, J., Martinon, F. and Burns, K. (2003) Nalps: A novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 95-104.
- Tse, A. N., Carvajal, R. and Schwartz, G. K. (2007) Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*, 13: 1955-1960.
- Tsujimoto, Y. (2002) Bcl-2 family of proteins: Life-or-death switch in mitochondria. *Biosci Rep*, 22: 47-58.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. and Croce, C. M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228: 1440-1443.
- Turk, B., Turk, D. and Turk, V. (2000) Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochim Biophys Acta*, 1477: 98-111.

U

- Urbano, A., Lakshmanan, U., Choo, P. H., Kwan, J. C., Ng, P. Y., Guo, K., Dhakshinamoorthy, S. and Porter, A. (2005) Aif suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. *Embo J*, 24: 2815-2826.
- Uren, R. T., Dewson, G., Bonzon, C., Lithgow, T., Newmeyer, D. D. and Kluck, R. M. (2005) Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: Electrostatic interactions can hold cytochrome c but not smac/diablo to mitochondrial membranes. *J Biol Chem*, 280: 2266-2274.

V

- Vahsen, N., Cande, C., Briere, J. J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P. G., Pequignot, M. O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J. M., Schagger, H., Rustin, P. and Kroemer, G. (2004) Aif deficiency compromises oxidative phosphorylation. *Embo J*, 23: 4679-4689.
- Vahsen, N., Cande, C., Dupaigne, P., Giordanetto, F., Kroemer, R. T., Herker, E., Scholz, S., Modjtahedi, N., Madeo, F., Le Cam, E. and Kroemer, G. (2006) Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and rna. *Oncogene*, 25: 1763-1774.
- Vakkila, J. and Lotze, M. T. (2004) Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol*, 4: 641-648.
- van Wijk, S. J. and Hageman, G. J. (2005) Poly(adp-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 39: 81-90.
- Vanden Berghe, T., Kalai, M., Denecker, G., Meeus, A., Saelens, X. and Vandenabeele, P. (2006) Necrosis is associated with il-6 production but apoptosis is not. *Cell Signal*, 18: 328-335.
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Li, X. X., Schumacker, P. T., Colombini, M. and Thompson, C. B. (2000) Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 4666-4671.
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Schumacker, P. T. and Thompson, C. B. (1999) Bcl-xl prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial atp/adp exchange. *Mol Cell*, 3: 159-167.

- Vander Heiden, M. G., Li, X. X., Gottlieb, E., Hill, R. B., Thompson, C. B. and Colombini, M. (2001) Bcl-xl promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 276: 19414-19419.
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N. and Liu, E. A. (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of mdm2. *Science*, 303: 844-848.
- Venturini, F., Braspenning, J., Homann, M., Gissmann, L. and Sczakiel, G. (1999) Kinetic selection of hpv 16 e6/e7-directed antisense nucleic acids: Anti-proliferative effects on hpv 16-transformed cells. *Nucleic Acids Res*, 27: 1585-1592.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N. (2005) Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol*, 84: 627-639.
- Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M. and Strasser, A. (2003) P53- and drug-induced apoptotic responses mediated by bh3-only proteins puma and noxa. *Science*, 302: 1036-1038.
- Virag, L. and Szabo, C. (2002) The therapeutic potential of poly(adp-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 54: 375-429.
- Vitale, I., Senovilla, L., Galluzzi, L., Criollo, A., Vivet, S., Castedo, M. and Kroemer, G. (2008) Chk1 inhibition activates p53 through p38 mapk in tetraploid cancer cells. *Cell Cycle*, 7: 1956-1961.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1992) P53 function and dysfunction. *Cell*, 70: 523-526.
- Vogler, M., Dinsdale, D., Dyer, M. J. and Cohen, G. M. (2009) Bcl-2 inhibitors: Small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death Differ*, 16: 360-367.

W

- Wada, T., Pippin, J. W., Nangaku, M. and Shankland, S. J. (2008) Dexamethasone's prosurvival benefits in podocytes require extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Nephron Exp Nephrol*, 109: e8-19.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J. and Munoz, N. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189: 12-19.

- Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferez, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D. and et al. (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: A (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*, 78: 343-352.
- Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J. (1996a) Bid: A novel bh3 domain-only death agonist. *Genes Dev*, 10: 2859-2869.
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. and Yuan, J. (1994) Ich-1, an ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell*, 78: 739-750.
- Wang, Q., Fan, S., Eastman, A., Worland, P. J., Sausville, E. A. and O'Connor, P. M. (1996b) Ucn-01: A potent abrogator of g2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J Natl Cancer Inst*, 88: 956-965.
- Wang, W. and El-Deiry, W. S. (2008) Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr Opin Oncol*, 20: 90-96.
- Wang, W., Kim, S. H. and El-Deiry, W. S. (2006) Small-molecule modulators of p53 family signaling and antitumor effects in p53-deficient human colon tumor xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 11003-11008.
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y. and Xue, D. (2002) Mechanisms of aif-mediated apoptotic DNA degradation in caenorhabditis elegans. *Science*, 298: 1587-1592.
- Wang, Y., Engels, I. H., Knee, D. A., Nasoff, M., Deveraux, Q. L. and Quon, K. C. (2004) Synthetic lethal targeting of myc by activation of the dr5 death receptor pathway. *Cancer Cell*, 5: 501-512.
- Wang, Y., Yin, O. Q., Graf, P., Kisicki, J. C. and Schran, H. (2008) Dose- and time-dependent pharmacokinetics of midostaurin in patients with diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol*, 48: 763-775.
- Waterhouse, N. J., Goldstein, J. C., von Ahsen, O., Schuler, M., Newmeyer, D. D. and Green, D. R. (2001) Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and atp generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol*, 153: 319-328.
- Waterhouse, N. J., Ricci, J. E. and Green, D. R. (2002) And all of a sudden it's over: Mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie*, 84: 113-121.
- Weber, R. (1964) Ultrastructural changes in regressing tail muscles of xenopus larvae at metamorphosis. *J Cell Biol*, 22: 481-487.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. and Korsmeyer, S. J. (2001) Proapoptotic bax and bak: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292: 727-730.
- Weil, M., Raff, M. C. and Braga, V. M. (1999) Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol*, 9: 361-364.
- Weinmann, L., Wischhusen, J., Demma, M. J., Naumann, U., Roth, P., Dasmahapatra, B. and Weller, M. (2008) A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to apo2l/trail-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 15: 718-729.
- Welch, S., Hirte, H. W., Carey, M. S., Hotte, S. J., Tsao, M. S., Brown, S., Pond, G. R., Dancey, J. E. and Oza, A. M. (2007) Ucn-01 in combination with topotecan in patients with advanced recurrent ovarian cancer: A study of the princess margaret hospital phase ii consortium. *Gynecol Oncol*, 106: 305-310.
- Wesselborg, S., Engels, I. H., Rossmann, E., Los, M. and Schulze-Osthoff, K. (1999) Anticancer drugs induce caspase-8/fllice activation and apoptosis in the absence of cd95 receptor/ligand interaction. *Blood*, 93: 3053-3063.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A. and et al. (1995) Identification and characterization of a new member of the tnf family that induces apoptosis. *Immunity*, 3: 673-682.
- Willingham, S. B., Bergstralh, D. T., O'Connor, W., Morrison, A. C., Taxman, D. J., Duncan, J. A., Barnoy, S., Venkatesan, M. M., Flavell, R. A., Deshmukh, M., Hoffman, H. M. and Ting, J. P. (2007) Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components cias1/cryopyrin/nlrp3 and asc. *Cell Host Microbe*, 2: 147-159.
- Willis, S. N. and Adams, J. M. (2005) Life in the balance: How bh3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 617-625.
- Wischhusen, J., Naumann, U., Ohgaki, H., Rastinejad, F. and Weller, M. (2003) Cp-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death. *Oncogene*, 22: 8233-8245.

- Wohlrab, H. (2005) The human mitochondrial transport protein family: Identification and protein regions significant for transport function and substrate specificity. *Biochim Biophys Acta*, 1709: 157-168.
- Wolff, A. C., Hammond, M. E., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P. L., Hanna, W. M., Langer, A., McShane, L. M., Paik, S., Pegram, M. D., Perez, E. A., Press, M. F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S. E., Tubbs, R., Vance, G. H., van de Vijver, M., Wheeler, T. M. and Hayes, D. F. (2007) American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*, 25: 118-145.
- Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G. and Youle, R. J. (1997) Movement of bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, 139: 1281-1292.
- Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R. A., Mckercher, S. R. and Martin, P. (2000) Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless pu.1 null mouse embryos. *Development*, 127: 5245-5252.
- Wu, J., Liu, T., Xie, J., Xin, F. and Guo, L. (2006) Mitochondria and calpains mediate caspase-dependent apoptosis induced by doxycycline in hela cells. *Cell Mol Life Sci*, 63: 949-957.
- Wyllie, A. H. and Golstein, P. (2001) More than one way to go. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 11-13.
- X**
- Xiao, C., Yang, B. F., Asadi, N., Beguinot, F. and Hao, C. (2002) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-flip and ped/pea-15 in glioma cells. *J Biol Chem*, 277: 25020-25025.
- Xu, Y., Huang, S., Liu, Z. G. and Han, J. (2006) Poly(adp-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires rip1/traf2-mediated jnk1 activation. *J Biol Chem*, 281: 8788-8795.
- Xue, D. and Horvitz, H. R. (1997) Caenorhabditis elegans ced-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature*, 390: 305-308.
- Y**
- Yacoub, A., Park, M. A., Hanna, D., Hong, Y., Mitchell, C., Pandya, A. P., Harada, H., Powis, G., Chen, C. S., Koumenis, C., Grant, S. and Dent, P. (2006) Osu-03012 promotes caspase-independent but perk-, cathepsin b-, bid-, and aif-dependent killing of transformed cells. *Mol Pharmacol*, 70: 589-603.
- Yamamoto, K., Ichijo, H. and Korsmeyer, S. J. (1999) Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ask1/jun n-terminal protein kinase pathway normally activated at g(2)/m. *Mol Cell Biol*, 19: 8469-8478.
- Yamato, K., Yamada, T., Kizaki, M., Ui-Tei, K., Natori, Y., Fujino, M., Nishihara, T., Ikeda, Y., Nasu, Y., Saigo, K. and Yoshinouchi, M. (2008) New highly potent and specific e6 and e7 sirnas for treatment of hpv16 positive cervical cancer. *Cancer Gene Ther*, 15: 140-153.
- Yang, M. Y., Chuang, H., Chen, R. F. and Yang, K. D. (2002) Reversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to membrane perturbation but not DNA strand breaks. *J Leukoc Biol*, 71: 231-237.
- Yang, W. and Tiffany-Castiglioni, E. (2008) Paraquat-induced apoptosis in human neuroblastoma sh-sy5y cells: Involvement of p53 and mitochondria. *J Toxicol Environ Health A*, 71: 289-299.
- Yang, Y., Li, C. C. and Weissman, A. M. (2004) Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene*, 23: 2096-2106.
- Yang, Y. P., Liang, Z. Q., Gu, Z. L. and Qin, Z. H. (2005) Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin*, 26: 1421-1434.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) Untangling the erbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 127-137.
- Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G. and Wu, H. (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*, 9: 680-684.
- Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C. C., Schlegel, R. and Howley, P. M. (1985) Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol*, 119: 361-366.
- Yee, K. S. and Vousden, K. H. (2005) Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis*, 26: 1317-1322.
- Yeh, W. C., Itie, A., Elia, A. J., Ng, M., Shu, H. B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D. V. and Mak, T. W. (2000) Requirement for casper (c-flip) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, 12: 633-642.

- Yeh, W. C., Pompa, J. L., McCurrach, M. E., Shu, H. B., Elia, A. J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W. S., Lowe, S. W., Goeddel, D. V. and Mak, T. W. (1998) Fadd: Essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, 279: 1954-1958.
- Yeow, W. S., Ziauddin, M. F., Maxhimer, J. B., Shamimi-Noori, S., Baras, A., Chua, A., Schrupp, D. S. and Nguyen, D. M. (2006) Potentiation of the anticancer effect of valproic acid, an antiepileptic agent with histone deacetylase inhibitory activity, by the kinase inhibitor staurosporine or its clinically relevant analogue ucn-01. *Br J Cancer*, 94: 1436-1445.
- Yin, X. M. (2006) Bid, a bh3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene*, 369: 7-19.
- Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J. (2005) Autophagy: Molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2: 1542-1552.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. and Beppu, T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin a. *J Biol Chem*, 265: 17174-17179.
- Youle, R. J. and Karbowski, M. (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 657-663.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T. and Simon, H. U. (2006) Calpain-mediated cleavage of atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*, 8: 1124-1132.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H. and Lenardo, M. J. (2004) Regulation of an atg7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 304: 1500-1502.
- Yu, L., Orlandi, L., Wang, P., Orr, M. S., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Silvestrini, R., Watanabe, N., Piwnicka-Worms, H. and O'Connor, P. M. (1998) Ucn-01 abrogates g2 arrest through a cdc2-dependent pathway that is associated with inactivation of the wee1hu kinase and activation of the cdc25c phosphatase. *J Biol Chem*, 273: 33455-33464.
- Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Baehrecke, E. H. and Lenardo, M. (2006a) Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 4952-4957.
- Yu, S. W., Andrabi, S. A., Wang, H., Kim, N. S., Poirier, G. G., Dawson, T. M. and Dawson, V. L. (2006b) Apoptosis-inducing factor mediates poly(adp-ribose) (par) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 18314-18319.
- Yu, S. W., Wang, H., Dawson, T. M. and Dawson, V. L. (2003) Poly(adp-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis*, 14: 303-317.
- Yu, S. W., Wang, H., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M. and Dawson, V. L. (2002) Mediation of poly(adp-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 297: 259-263.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1993) The c. Elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75: 641-652.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. and Heintz, N. (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 15077-15082.
- Yuste, V. J., Moubarak, R. S., Delettre, C., Bras, M., Sancho, P., Robert, N., d'Alayer, J. and Susin, S. A. (2005) Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (aif) release. *Cell Death Differ*, 12: 1445-1448.
- Z**
- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A. and Kroemer, G. (1998) Subcellular and submitochondrial mode of action of bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, 16: 2265-2282.
- Zamzami, N., El Hamel, C., Maise, C., Brenner, C., Munoz-Pinedo, C., Belzacq, A. S., Costantini, P., Vieira, H., Loeffler, M., Molle, G. and Kroemer, G. (2000) Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene*, 19: 6342-6350.
- Zamzami, N. and Kroemer, G. (2003) Apoptosis: Mitochondrial membrane permeabilization--the (w)hole story? *Curr Biol*, 13: R71-73.
- Zamzami, N., Larochette, N. and Kroemer, G. (2005) Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2: 1478-1480.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Masse, B. and Kroemer, G. (1996) Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett*, 384: 53-57.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J. L., Petit, P. X. and Kroemer, G.

- (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med*, 181: 1661-1672.
- Zeng, X., Yan, T., Schupp, J. E., Seo, Y. and Kinsella, T. J. (2007) DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine--induced autophagy through p53 activation in human tumor cells. *Clin Cancer Res*, 13: 1315-1321.
- Zha, H., Aime-Sempe, C., Sato, T. and Reed, J. C. (1996) Proapoptotic protein bax heterodimerizes with bcl-2 and homodimerizes with bax via a novel domain (bh3) distinct from bh1 and bh2. *J Biol Chem*, 271: 7440-7444.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C. and Korsmeyer, S. J. (2000) Posttranslational n-myristoylation of bid as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*, 290: 1761-1765.
- Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R. and Greene, M. I. (2007) ErbB receptors: From oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest*, 117: 2051-2058.
- Zhang, X. D., Gillespie, S. K. and Hersey, P. (2004) Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther*, 3: 187-197.
- Zhao, Y., Chaiswing, L., Velez, J. M., Batinic-Haberle, I., Colburn, N. H., Oberley, T. D. and St Clair, D. K. (2005) P53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*, 65: 3745-3750.
- Zhao, Y., Ding, W. X., Qian, T., Watkins, S., Lemasters, J. J. and Yin, X. M. (2003) Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement. *Gastroenterology*, 125: 854-867.
- Zheng, H., Fink, D. and Howell, S. B. (1997) Pharmacological basis for a novel therapeutic strategy based on the use of aquated cisplatin. *Clin Cancer Res*, 3: 1157-1165.
- Zheng, T. S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D. W., Lazebnik, Y. and Flavell, R. A. (2000) Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med*, 6: 1241-1247.
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O. T. and Doskeland, S. O. (1998) Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature*, 391: 449-450.
- Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A. and Orrenius, S. (1999) Caspases: Their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ*, 6: 644-651.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M. and Salvesen, G. S. (1997) Target protease specificity of the viral serpin crma. Analysis of five caspases. *J Biol Chem*, 272: 7797-7800.
- Zhu, C., Qiu, L., Wang, X., Hallin, U., Cande, C., Kroemer, G., Hagberg, H. and Blomgren, K. (2003) Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem*, 86: 306-317.
- Zhu, C., Wang, X., Deinum, J., Huang, Z., Gao, J., Modjtahedi, N., Neagu, M. R., Nilsson, M., Eriksson, P. S., Hagberg, H., Luban, J., Kroemer, G. and Blomgren, K. (2007) Cyclophilin a participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia. *J Exp Med*, 204: 1741-1748.
- Zhu, Y., Xu, H. and Huang, K. (2002) Mitochondrial permeability transition and cytochrome c release induced by selenite. *J Inorg Biochem*, 90: 43-50.
- Zinkel, S. S., Hurov, K. E., Ong, C., Abtahi, F. M., Gross, A. and Korsmeyer, S. J. (2005) A role for proapoptotic bid in the DNA-damage response. *Cell*, 122: 579-591.
- Zoratti, M. and Szabo, I. (1994) Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*, 26: 543-553.
- Zoratti, M. and Szabo, I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*, 1241: 139-176.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to c. Elegans ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90: 405-413.
- zur Hausen, H. (1999) Viruses in human cancers. *Eur J Cancer*, 35: 1174-1181.

ANNEXES

Mécanismes de la carcinogenèse associée aux papillomavirus

C. Mougín, M.Nicolier, L.Z. Mo

La revue du Praticien, vol 56, 15 novembre 2006

PMID : 17243386

Mécanismes de la carcinogenèse associée aux papillomavirus

Christiane Mougin, Magali Nicolier, Lingzhao Mo[†]

PAPILLOMAVIRUS : ASPECTS VIROLOGIQUES

Structure des HPV

Les papillomavirus (*human papillomavirus* [HPV]) appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*. À ce jour, une centaine de génotypes de papillomavirus infectant l'espèce humaine sont caractérisés. Le génome des HPV est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire circulaire de 8 000 paires de base et un seul des deux brins est codant. Le génome est divisé en trois régions: une région non codante (LCR) et deux régions codantes, E (*Early*) et L (*Late*). Les protéines de capsid L1 et L2 sont exprimées seulement dans les cellules bien différenciées lors d'infections productives. Les protéines E1 et E2 sont impliquées dans la réplication du génome viral et la régulation de la transcription. Le produit du gène E4 intervient dans la maturation des particules virales. La protéine E5 du papillomavirus bovin 5 (mais pas des HPV) est une protéine capable de transformer des fibroblastes. Les protéines E6 et E7 d'HPV à haut risque sont responsables de l'immortalisation et de la transformation cellulaires, elles neutralisent en particulier deux anti-oncogènes cellulaires, respectivement p53 et pRb (protéine du rétinoblastome) et sont constitutivement exprimées dans les cancers.¹

Classification

Les HPV infectent spécifiquement les épithéliums pluristratifiés; ils sont classés en trois sous-familles: les HPV associés à des lésions muqueuses ano-génitales représentent la sous-famille A, alors que la sous-famille B regroupe les HPV infectant préférentiellement le tissu cutané. Les HPV 1, 41 et 63 constituent la sous-famille E, récemment identifiée. En plus de ces sous-familles, des genres ont été définis à partir des caractéristiques communes des virus, comme le

potentiel oncogénique. Ainsi, on distingue d'une part les HPV dits à haut risque impliqués dans le développement de lésions précancéreuses et cancéreuses, comme les HPV 16 et 18, responsables de dysplasies et de cancers du col utérin, et les HPV cutanés 5 et 8, associés à l'épidermodysplasie verruciforme, et d'autre part les HPV dits à bas risque responsables de verrues génitales (condylomes acuminés) ou cutanées, comme les HPV muqueux 6 et 11 et les HPV cutanés 1 et 2.

Cycle viral

Le cycle répliatif des HPV est étroitement lié à la différenciation des kératinocytes. Le site primaire d'infection correspond aux cellules basales de l'épithélium, suite à la pénétration du virus au niveau de micro-lésions. Le cycle viral peut être divisé en deux phases distinctes: 1. une phase non productive dans les cellules basales et para-

basales, avec réplication de l'ADN viral (sous forme d'épisome*) au rythme des divisions cellulaires; au cours de cette phase, seules les protéines précoces sont exprimées; 2. une phase productive dans les cellules superficielles différenciées, avec amplification de l'ADN viral; au cours de cette phase, les protéines tardives sont exprimées et permettent la formation de virions qui sont libérés lors de la desquamation cellulaire (fig. 1).

MÉCANISMES DE LA CARCINOGENÈSE ASSOCIÉE AUX HPV

Intégration de l'ADN viral

La majorité des cancers invasifs comporte des séquences d'ADN d'HPV intégrées au génome de la cellule hôte. L'intégration est une étape importante dans la progres-

* Molécule circulaire d'ADN non intégrée à l'ADN chromosomique de la cellule hôte.

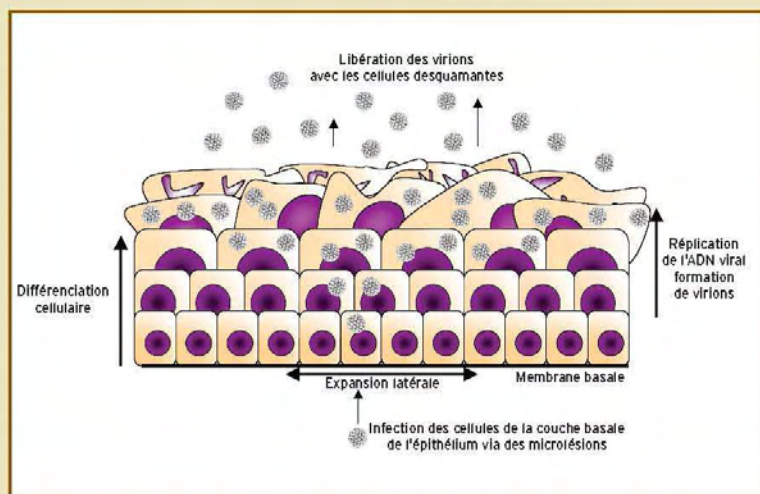


Figure 1 Cycle répliatif des papillomavirus. L'ADN viral reste sous forme d'épisome, et des virions complets sont produits dans les couches superficielles différenciées de l'épithélium.

[†] EA 3181, IFR 133, université de Franche-Comté, laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, CHU Jean-Minjoz, 25030 Besançon Cedex. Courriel: christiane.mougin@univ-fcomte.fr

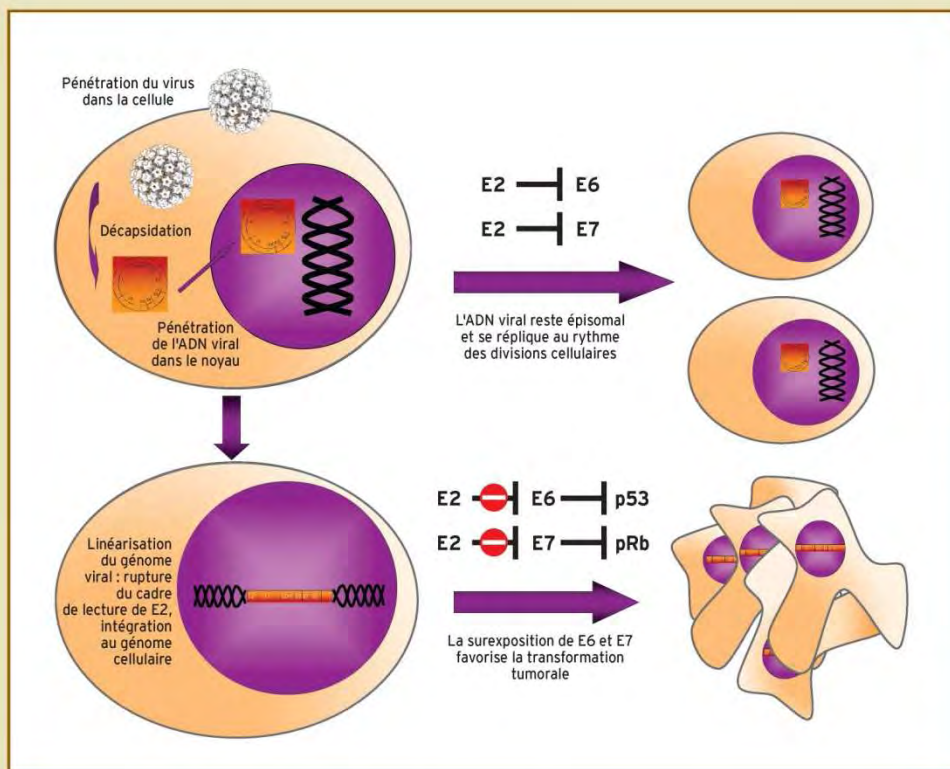


Figure 2 Intégration de l'ADN viral des papillomavirus. L'ADN viral peut rester sous forme d'épisome, en particulier lors d'infections productives. Il peut s'intégrer au génome de la cellule hôte. Cette intégration conduit à une surexpression des oncoprotéines virales E6 et E7 qui sont à l'origine de l'immortalisation et de la transformation tumorale.

sion vers le cancer. Elle ne concerne que les HPV à haut risque ; elle peut survenir aux stades précancéreux. L'intégration se produit au niveau de la phase ouverte de lecture E1/E2. Il s'ensuit une perte d'expression de la protéine E2 qui n'inhibe plus l'expression de E6 et E7. La production exagérée non contrôlée des protéines E6 et E7 dans les cellules basales et parabasales entraîne une instabilité génomique qui se manifeste par des anomalies du nombre et de la structure des chromosomes.² Les sites d'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire sont distribués de façon aléatoire, avec toutefois une préférence pour des sites fragiles. L'insertion de séquences d'ADN à proximité de gènes cellulaires concerne essentiellement les gènes *myc* et le gène *APM-1* (fig. 2).³

Oncoprotéines virales

Les protéines E6 et E7 interfèrent avec de nombreuses protéines clés impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la surveillance immu-

Protéine E6. Cette protéine est composée d'environ cent cinquante acides aminés. La protéine E6 des HPV à haut risque lie avec une très forte affinité la protéine suppresseur de tumeur p53 et favorise sa dégradation dans le protéasome, après association avec une ubiquitine ligase dénommée E6-AP (*E6-associated protein*).⁴ La demi-vie de p53 est réduite de 3 heures à 20 minutes et les niveaux de p53 sont abaissés dans les cellules exprimant E6, comparés aux tissus sains. La dégradation de p53 entraîne une perte de contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, pouvant conduire la cellule vers un phénotype malin. La plupart des protéines E6 des HPV à bas risque ont une faible affinité pour p53 et ne permettent pas sa protéolyse. D'autres protéines pro-apoptotiques comme Bak et Bax sont sujettes à la dégradation médiée par E6 des HPV 16 et 18 mais aussi des HPV cutanés comme HPV 5.⁵ La voie apoptotique des récepteurs de mort est elle aussi perturbée par l'expression de E6.

La réparation de l'ADN est altérée lorsque les cellules expriment E6. Cette protéine virale peut former un complexe avec les protéines cellulaires E6-AP et MGMT (O6-méthylguanine-ADN-méthyltransférase) et favoriser la dégradation de MGMT (normalement MGMT participe à la réparation de l'ADN et empêche les mutations de gènes importants, comme celui codant p53). E6 inhibe aussi l'activité réparatrice de la protéine XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing 1*). L'inhibition des systèmes de réparation de l'ADN, associée à la dérégulation de la réplication de l'ADN via la dégradation de MCM7 (*multicopy maintenance protein 7*) induite par E6, augmente la susceptibilité au développement tumoral en instaurant une instabilité chromosomique et l'accumulation de mutations.

De plus, la protéine E6 favorise l'immortalisation cellulaire en induisant la transcription du gène *hTERT* (*human telomerase reverse transcriptase*) codant une sous-unité catalytique de la télomérase impli-

quée dans le maintien de la stabilité des télomères.⁶ L'expression de hTERT est surtout retrouvée dans les lésions de haut grade et les cancers invasifs du col utérin. Cela suggère que l'immortalisation et l'acquisition d'un phénotype malin sont des phénomènes étroitement liés.

La protéine E6 diminue l'expression des interférons en se liant à l'IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*), ce qui facilite l'échappement de la cellule à la réponse immunitaire antivirale, antitumorale.

Protéine E7. Constituée d'environ cent acides aminés, cette protéine est essentiellement localisée dans le noyau. Parmi les activités transformantes de E7, l'inactivation de la protéine pRb est la mieux connue. En effet, la protéine E7 des HPV à haut risque a une forte affinité pour la forme active hypophosphorylée de la protéine pRb et induit sa dégradation.⁷ Dès lors, les facteurs de transcription E2F (normalement séquestrés par la pRb) sont libérés. Les complexes *cycline dependent kinase* (CDK) sont activés et la transcription des gènes cibles de E2F, codant des protéines nécessaires à l'entrée en phase S et à la réplication de l'ADN (*cycline A*, *CDC25A*, *ADN polymérase-alpha*, *thymidine kinase*, *ribonucléotide réductase*, *proliferating cell nuclear antigen* [PCNA] ...), n'est plus réprimée, ce qui permet à la cellule de progresser dans le cycle, favorisant ainsi la prolifération cellulaire. La protéine E7 codée par les HPV à bas risque (6, 11) a une faible affinité pour la protéine pRb.

Dans les cellules infectées par des HPV à haut risque, l'inactivation de pRb s'accompagne d'une expression augmentée de la protéine p16 (un inhibiteur de CDK). Cette protéine p16 peut aisément être détectée par immunohistochimie sur cellules de frottis ou sur biopsies; elle peut servir de biomarqueur de dysplasie. L'activité de p21 et p27, autres protéines inhibitrices de CDK, est neutralisée par liaison à la protéine E7. Dès lors, la duplication des centrosomes n'est plus synchronisée. Il en résulte des mitoses anormales, dites multipolaires, qui peuvent être considérées comme marqueurs des lésions associées aux HPV à haut risque.⁸

En pratique

- L'ADN des HPV est majoritairement sous forme d'épisme dans les lésions bénignes.
- L'ADN des HPV est le plus souvent intégré dans les cellules cancéreuses.
- Les principales oncoprotéines virales sont les protéines E6 et E7.
- Le potentiel oncogénique de E6 et E7 est associé à leur capacité de lier et favoriser la dégradation de protéines suppresseurs de tumeurs, p53 et pRb respectivement.

Par ailleurs, Thierry et al. ont mis en évidence des gènes mitotiques activés par E7 comme *Pik* ou *Aurora* qui contribuent à l'induction de l'instabilité génomique.⁹

La protéine E7, comme la protéine E6, permet d'échapper à la surveillance immunitaire. Elle diminue l'expression de l'IRF-1 qui normalement coopère avec p53 en réponse à des dommages à l'ADN.

Coopération E6-E7. Le nombre de protéines cellulaires partenaires ou cibles de E6-E7 est grandissant. Il s'agit de protéines d'adhérence cellulaire, du cytosquelette, de transduction du signal... Si les deux protéines E6 et E7 ont des activités indépendantes, leur présence simultanée semble indispensable pour immortaliser et transformer de façon efficace les cellules. En effet, la réactivation de p53 par inactivation de E6 dans des cellules dérivées de cancer du col utérin peut conduire à la mort cellulaire.¹⁰

CONCLUSION

Les HPV sont des petits virus à ADN double brin, qui infectent les épithéliums cutanés et muqueux; certains types d'HPV sont responsables du cancer du col utérin. Les HPV se répliquent dans les cellules épithéliales en voie de différenciation. Ils court-circuitent les mécanismes de contrôle de la machinerie cellulaire pour produire des virions complets. Deux protéines virales E6 et E7 jouent un rôle clé dans la dérégulation de la prolifération, de la différenciation, de l'apoptose, de la surveillance immunitaire et de la durée de vie des cellules. Ces protéines peuvent aussi contribuer à la transformation cellulaire.

1. **Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R.** The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989;63:4417-21.
2. **Duensing S, Munger K.** The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 2002;62:7075-82.
3. **Sastre-Garau X, Favre M, Couturier J, Orth G.** Distinct patterns of alteration of myc genes associated with integration of human papillomavirus type 16 or type 45 DNA in two genital tumours. *J Gen Virol* 2000;81:1983-93.
4. **Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM.** The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993;75:495-505.
5. **Jackson S, Storey A.** E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000;19:592-8.
6. **Gewin L, Galloway DA.** E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol* 2001;75:198-201.
7. **Jones DL, Munger K.** Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 1997;71:2905-12.
8. **Duensing S, Munger K.** Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004;109:157-62.
9. **Thierry F, Benotmane MA, Demeret C, Mori M, Teissier S, Desaintes C.** A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis. *Cancer Res* 2004;64:895-903.
10. **Charlot JF, Nicolier M, Pretet JL, Mongin C.** Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin-alpha on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* 2006;11:813-27.

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts.

HPV et cancers : mécanismes de l'oncogénèse

C. Mougin, M.Nicolier, A.Z. Décron-Barthod

Revue Francophone des Laboratoires, septembre-octobre 2008, n°405

HPV et cancers : mécanismes de l'oncogenèse

Christiane Mougin^{a,*}, Magali Nicolier^a, Anne-Zélie Decrion-Barthod^a

RÉSUMÉ

Des génotypes spécifiques de papillomavirus humains dits « à haut risque » sont responsables du cancer du col utérin, le deuxième cancer au monde chez la femme. La transformation cellulaire et le maintien du phénotype malin sont liés en particulier à l'expression de deux protéines virales E6 et E7. Ces protéines interfèrent avec de nombreuses protéines cellulaires impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, le contrôle de l'apoptose, la réparation de l'ADN, la formation du fuseau mitotique, l'adhérence intercellulaire et à la matrice extracellulaire, la motilité cellulaire et les voies de transduction des signaux mitogènes.

Papillomavirus – HPV – E5, E6, E7 – oncogenèse – cancer.

SUMMARY

HPV and cancer: mechanisms of oncogenesis

Specific genotypes of high risk human papillomaviruses are responsible of cervical cancer, the second tumor in women worldwide. Cellular transformation and maintenance of the malignant phenotype are mainly linked to the expression of the viral E6 and E7 proteins. These oncoproteins target many cellular proteins involved in cell cycle regulation, apoptosis control, DNA repair, spindle formation, intercellular and cell-extracellular matrix adhesion, cell motility and mitogenic signal transduction pathways.

Papillomaviruses – HPV – E5, E6, E7 – oncogenesis – cancer.

1. Introduction

Les propriétés carcinogènes des papillomavirus humains à haut risque (HPV HR) ont été fortement suspectées dans les années 1980, plusieurs auteurs ayant identifié de l'ADN viral dans des biopsies de cancer du col utérin ou de lésions précurseurs [21, 38]. Le pouvoir transformant de ces HPV a alors été attribué aux protéines virales E6 et E7 [31]. Toutefois, la protéine E5 est, elle aussi, considérée comme une protéine transformante. Son activité de stimulation de la prolifération cellulaire est complémentaire de celle de E7 [48]. Parallèlement aux données obtenues en laboratoire, les premières études épidémiologiques ont suggéré, elles aussi, un lien étroit entre l'infection à HPV HR et le cancer du col de l'utérus. Il a fallu attendre les années 1990 pour confirmer l'association « HPV-cancer du col de l'utérus » [6, 18]. Les HPV HR 16 et 18, actuellement considérés comme des agents carcinogènes, sont les plus fréquemment observés dans les lésions intraépithéliales de haut grade et les cancers [40, 41], alors que les HPV à bas risque de type 6 et 11 sont présents dans près de 90 % des condylomes [3].

^a Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire – EA 3181 – IFR 133
Centre hospitalier universitaire Jean-Minjoz
Boulevard Fleming
25030 Besançon cedex

* Correspondance
christiane.mougin@univ-fcomte.fr

article reçu le 6 mai, accepté le 13 mai 2008.
© 2008 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Grâce aux informations concernant l'organisation du génome viral, la régulation de l'expression des gènes et la caractérisation des protéines virales, les mécanismes de carcinogenèse induite par ces virus sont aujourd'hui mieux compris. Les défenses antivirales et les différents régulateurs de la réponse immune ne seront pas abordés dans cette revue.

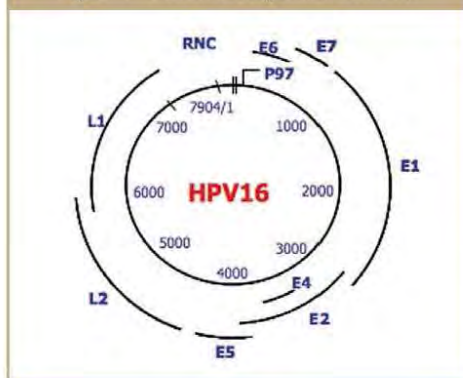
2. Structure générale et principales fonctions des papillomavirus

Les papillomavirus sont des virus de petite taille (de 45 à 55 nm de diamètre), non enveloppés, dont la capside à symétrie icosaédrique est constituée de 72 capsomères. Cette capside abrite un ADN bicaténaire circulaire d'environ 8 000 paires de bases, dont un seul brin est codant, avec des phases ouvertes de lecture (POL) qui se chevauchent. Le génome est divisé en trois régions (*figure 1*).

2.1. La région non codante (RNC) de 400 à 1 000 nucléotides, très variable, contient les promoteurs des gènes précoces (P97 pour HPV16 et P105 pour HPV18). En amont des promoteurs, elle comporte des séquences de régulation de la réplication et de la transcription (pour revue, voir [29]).

Dossier scientifique

Figure 1 – Structure du génome d'HPV16.



2.2. Une région E (Early) codant les protéines précoces E1 à E8.

- La protéine E1, de 600 à 650 acides aminés, est la mieux conservée des protéines virales. Elle possède une fonction hélicase et une activité ATPase essentielles à la réplication de l'ADN viral [53].
- La protéine E2, de 400 acides aminés environ, bien conservée entre les différents papillomavirus est un facteur de transcription. Elle intervient à la fois dans la réplication et la modulation de la transcription virale. L'activation de la réplication implique une interaction synergique avec la protéine E1. La protéine E2 se comporte aussi comme un facteur trans-inhibiteur. Elle se lie à des sites situés à proximité de la boîte TATA des promoteurs P97 d'HPV16 et P105 d'HPV18, provoquant un encombrement stérique au site d'initiation de la transcription et limitant par conséquent l'expression de E6 et de E7 (pour revue, voir [29]).
- La protéine E3 n'est présente que dans de très rares HPV et sa fonction n'est pas connue.
- La protéine E4 est codée par une des régions les plus variables du génome. La principale protéine E4 est traduite par un ARNm E1^E4. Cette protéine, bien que codée par un gène précoce, est exprimée tardivement et en abondance. Son expression précède toutefois celle des protéines de capsid L1 et L2, mais elle a lieu en même temps que l'amplification du génome viral. Puis la protéine E1^E4 est clivée en structures multimériques qui lient les cytokératines et favorisent la destruction du cytosquelette.
- La protéine E5 est une petite protéine (environ 80 acides aminés pour HPV16) hydrophobe, localisée au niveau des systèmes endomembranaires. Elle est surtout exprimée par les HPV haut risque. La plupart des HPV bas risque ne possèdent pas de POL E5 ou de codon d'initiation de la transcription [42]. Ses fonctions sont mal connues. La protéine E5 d'HPV16 se lie à une sous-unité de l'ATPase vacuolaire qui interfère avec l'acidité des endosomes [15] et par conséquent augmente le recyclage à la membrane plasmique du récepteur à l'EGF et son activité. La protéine E5 interagit aussi avec la chaîne lourde du CMH I dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et réduit son expression à la surface de la cellule de 50 % [2].

• Les protéines E6 et E7 des HPV haut risque sont les seules protéines constamment exprimées dans les cancers du col utérin [43]. Elles sont impliquées dans l'immortalisation et la transformation cellulaires, et le maintien du phénotype malin.

- La protéine E6, de 150 acides aminés environ, contient deux domaines en doigt de zinc (quatre motifs Cys-X-X-Cys) qui lui permettent d'être dirigée vers le noyau. La principale cible de la protéine E6 des HPV haut risque est la protéine « gardien du génome » p53 qui est dégradée dans le protéasome suite à une ubiquitinylation par l'ubiquitine ligase cellulaire E6AP (*E6 associated protein*). Cette protéine virale est aussi caractérisée par sa capacité à activer la télomérase. Par ailleurs, le domaine carboxy-terminal est capable d'interagir avec les protéines à domaine PDZ, ce qui n'est pas le cas de la protéine E6 des HPV bas risque [30].

- La protéine E7, de 100 acides aminés environ, comporte deux régions principales. La région amino-terminale (AA 1-38) contient deux domaines très conservés CDI et CDII. Le domaine CDII lie la protéine p105^{md} au niveau des sites LxCxE et les protéines à poche p107 et p130. Il possède aussi un site de phosphorylation par la caséine kinase II [4]. La région carboxy-terminale contient un domaine en doigt de zinc (deux motifs Cys-X-X-Cys) impliqué dans la dimérisation/multimérisation de la protéine E7 et son activité [30].

• Une protéine de fusion E8^E2 a été décrite. Elle serait impliquée dans la latence virale observée dans les cellules basales des épithéliums infectés [45].

2.3. Une région L (Late) codant les protéines tardives de capsid L1 et L2.

- La protéine L1 est la protéine majeure de capsid. Hautement conservée entre les papillomavirus, elle porte les antigènes spécifiques de genre et certains antigènes spécifiques de type.
- La protéine L2, en association avec la protéine L1, permet l'assemblage du virus et la stabilisation de la capsid.

3. Phylogénie et cibles des papillomavirus

Les papillomavirus, dont plus d'une centaine de génotypes a été complètement séquencée, appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*. Cette famille, dont la classification repose sur des identités de séquences nucléotidiques codant la protéine de capsid L1, est composée de 16 genres (moins de 60 % d'identité) désignés par une lettre grecque (alpha à pi); ces genres sont subdivisés en espèces (60 à 70 % d'identité) numérotées avec un chiffre arabe; ces espèces comprennent différents types (71 à 89 % d'identité) qui eux-mêmes peuvent être subdivisés en sous-types (différence de 2 à 10 % par rapport au type) et en variants (différence inférieure à 1 à 2 %) [14] (figure 2).

Les papillomavirus sont spécifiques d'espèces; il n'y a pas de transmission virale inter-espèce. L'Homme ne sera donc potentiellement infecté que par des papillomavirus humains (HPV) qui sont strictement épithéliotropes.

Les HPV du genre alpha infectent préférentiellement les muqueuses et certains génotypes dits « à haut risque » sont

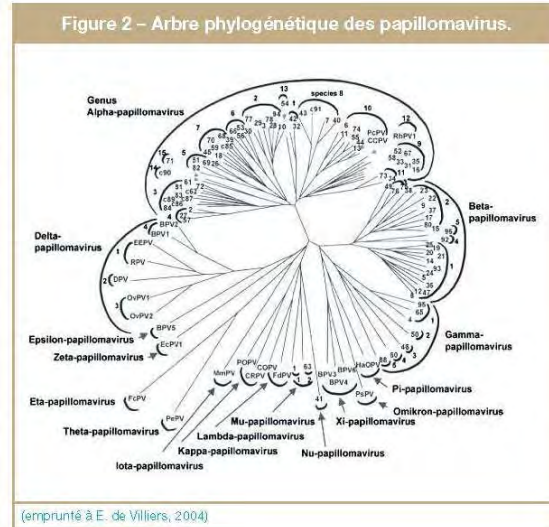
impliqués dans la genèse du cancer du col de l'utérus. En effet, 99,7 % des cancers abritent des séquences d'ADN d'HPV [51]. Les HPV16 et 18 sont à eux seuls responsables de plus de 75 % des cancers du col utérin [40]. Ils sont aussi détectés dans 50 % à 65 % des lésions cervicales intraépithéliales de haut grade (CIN2/3) [5, 37, 41, 51], 70 % des cancers de l'anus, 30 à 70 % des lésions anales intraépithéliales de haut grade (AIN2/3), 75 % des lésions vaginales intraépithéliales de haut grade (VaIN2/3), 70 % des lésions vulvaires intraépithéliales de haut grade (VIN2/3) et dans une proportion importante de lésions des voies aérodigestives supérieures. D'autres HPV haut risque, comme les types 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 contribuent au quart des cancers du col de l'utérus à travers le monde [32].

Des génotypes d'HPV du genre alpha sont dits à « bas risque », comme les HPV6 et 11. Ce sont les agents infectieux responsables de 90 % des condylomes acuminés [8]. Ces lésions, volontiers multifocales, s'observent au niveau de la vulve, du vagin, du canal anal et de la marge anale. Les HPV6 et 11 sont aussi responsables de 90 % des papillomatoses laryngées.

Les HPV du genre bêta infectent préférentiellement la peau. Certains sont responsables de lésions bénignes comme l'HPV49 alors que d'autres génotypes (HPV5 et 8) sont constamment trouvés dans les cancers non mélaniques de la peau, chez des patients atteints d'une épidermodysplasie verruciforme. Des types des genres alpha (HPV2), gamma (HPV4) et mu (HPV1) sont aussi impliqués dans le développement de verrues cutanées.

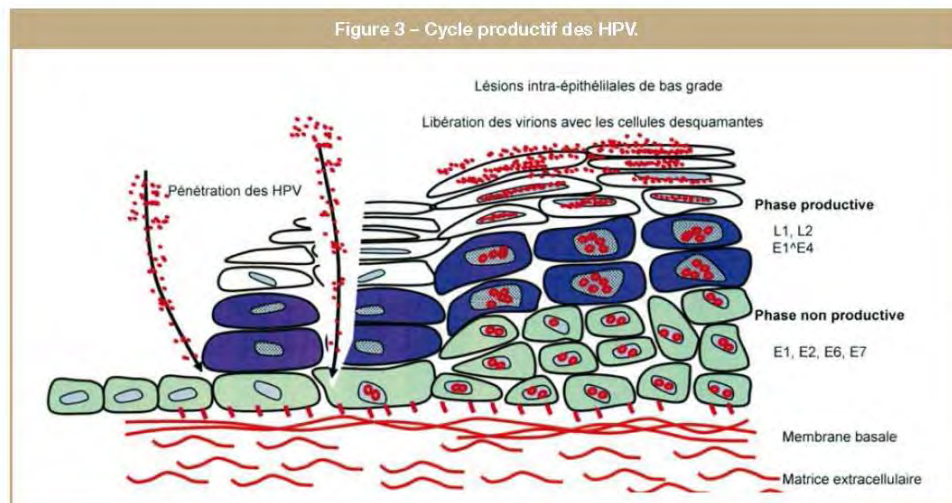
4. Réplication des HPV

Si la majorité des infections à HPV sont asymptomatiques, certaines peuvent conduire à une prolifération cellulaire localisée, qui se manifeste par des verrues cutanées (liées



à HPV1, 2, 3, 4, 10...) ou des verrues anogénitales (condylomes acuminés liés à HPV6 et 11).

Les HPV pénètrent dans les cellules basales de l'épithélium du col utérin à travers une microlésion. L'adsorption des virions sur les cellules se fait par l'intermédiaire des héparanes sulfates et l'entrée dans la cellule se fait par endocytose médiée par les vésicules à clathrine ou par les cavéoles. Après décapsidation, le génome viral est transporté jusqu'au noyau [7]. Le cycle viral complet est étroitement dépendant de la différenciation des cellules épithéliales (figure 3). Au cours d'une première phase, seules les protéines



Dossier scientifique

précoces sont exprimées et permettent la réplication de l'ADN viral dans les cellules basales et suprabasales. Dans les cellules basales en cycle, la réplication a lieu au cours de la phase S et nécessite l'action des protéines virales E1 et E2 et des protéines cellulaires. Le génome viral se multiplie sous forme d'épisomes à raison de 50 à 100 copies par cellule. Les cellules filles migrent ensuite vers la couche suprabasale et amorcent le programme de différenciation. Des kératinocytes normaux non infectés par HPV ne sont plus en cycle après avoir quitté la couche basale, alors que des cellules infectées par HPV entrent à nouveau en cycle pour permettre la poursuite de la réplication de l'ADN viral. Ce phénomène est essentiellement dû à la protéine E7 qui lie et inactive les protéines à poche de la famille Rb : p105^{Rb}, p107 et p130. Ces protéines libèrent les complexes E2F/DP, indépendamment des complexes CDK/cycline. Les facteurs de transcription E2F, en association avec leurs partenaires les protéines DP, activent alors l'expression des protéines permettant l'entrée et la progression dans la phase S, bénéfique au cycle viral productif. Dans une seconde phase, l'activation du promoteur tardif permet l'expression des protéines de capsid L1 et L2 mais aussi l'expression de E1^{E4} et de E5. La réplication de l'ADN viral qui semble utiliser un mécanisme en « cercle roulant » permet une amplification importante du génome viral (de 1 à 2 log). Dans les couches superficielles les plus différenciées, les protéines L1 et L2 vont empaqueter l'ADN viral ; des virions complets sont formés et libérés avec les cellules desquamantes. L'infection virale productive se traduit par un effet cytopathogène caractéristique, la koilocytose, lié à la réplication extrachromosomique complète du génome viral et à la synthèse de protéines de capsid. Cette infection virale ne suffit pas à induire la conversion maligne des cellules infectées. Des étapes supplémentaires, et en particulier l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte, sont nécessaires. Cette intégration qui concerne uniquement les HPV haut risque comme les HPV16 et 18, fait suite à une rupture de la

POL E2 et conduit à la production d'une protéine E2 mutée, déletée, qui n'est plus capable de limiter l'expression des protéines E6 et E7. Ces protéines virales produites en excès interfèrent avec de nombreuses protéines cellulaires et peuvent provoquer une immortalisation, une instabilité génétique, une croissance cellulaire anormale et une dissémination métastatique. L'intégration de l'ADN viral est observée dans la plupart des cancers invasifs et dans la grande majorité des lésions de haut grade. Toutefois, elle peut être observée dans des dysplasies légères, suggérant qu'il peut s'agir d'un événement précoce dans le processus de carcinogénèse.

5. Rôle des protéines E7 et E6 dans le processus tumoral

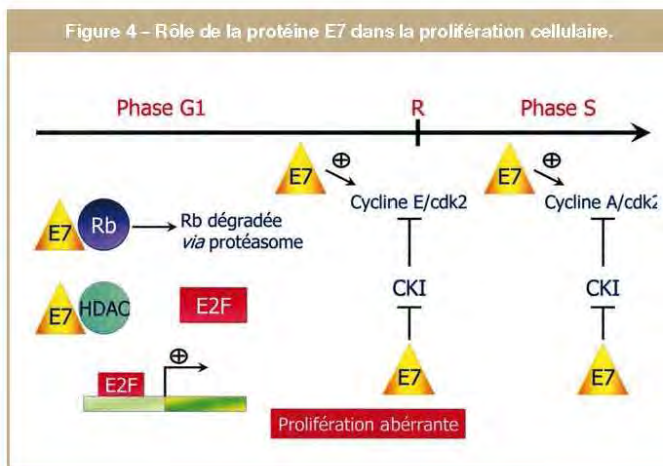
5.1. Dérégulation de la prolifération cellulaire

La protéine E7 des HPV haut risque lie avec une forte affinité la protéine p105^{Rb} et facilite sa dégradation via le protéasome. La protéine E7 est aussi capable de séquestrer la p107 sans toutefois influencer sa stabilité [30]. Peu de données sont disponibles sur l'interaction E7-p130. Ces interactions de la protéine E7 avec les protéines à poche permettent de détourner la machinerie cellulaire en libérant les facteurs de transcription E2F/DP qui stimulent l'entrée en phase S du cycle cellulaire. La protéine E7 est aussi capable d'activer les complexes cycline E/CDK2 (impliqués dans le passage du point de restriction R du cycle cellulaire et la phase G1 tardive) et les complexes cycline A/CDK2 (impliqués dans la transition G1/S et la progression dans S). Par ailleurs, la protéine E7 est capable de lier et d'inactiver les CKI (inhibiteurs de CDK) p21^{WAF1} et p27^{KIP1}, qui ne peuvent plus inhiber l'activité des complexes cycline/CDK. Enfin, E7 s'associe avec les protéines HDAC (histones désacétylase) qui sont normalement liées à pRb. Il s'ensuit une inactivation des HDAC, ce qui permet alors l'acétylation des histones, conduisant à une

déstabilisation de la structure nucléosomale et à un remodelage de la chromatine favorable à la transcription génique (figure 4). Par ailleurs, E7 d'HPV16 s'associe avec des co-activateurs à activité histone acétyltransférase (HAT), p300, CBP (CREB binding protein) et p/CAF (facteur associé à p300/CBP), qui contribuent à l'activation de la transcription médiée par E2F (pour revue, voir [19]). Il s'ensuit une prolifération aberrante.

La réactivation de la réplication de l'ADN cellulaire dans une cellule en cours de différenciation constitue un stress pour la cellule qui tente de réagir en activant l'expression de la protéine p53, afin d'induire l'apoptose. Mais la protéine E6 des HPV haut risque en particulier va lier avec une forte affinité la protéine p53 et favoriser son hydrolyse dans le protéasome. La dégradation de p53 a de multiples conséquences sur la vie de la cellule. La division cellulaire va se poursuivre car l'expression des protéines

Figure 4 – Rôle de la protéine E7 dans la prolifération cellulaire.



cibles de p53, impliquées dans l'arrêt en G1 (comme la p21^{CIP1}) ou induisant l'apoptose (comme Bax et Bak), est réprimée. Des travaux récents ont montré que la protéine E6 d'HPV16 peut inhiber l'apoptose par un second mécanisme. En effet, E6 induit la dégradation de FADD (*fas associated death domain*), un domaine de mort impliqué dans la transduction du signal Fas [17] et la voie extrinsèque de l'apoptose. Par ailleurs, les lésions de l'ADN ne sont plus réparées car les enzymes de réparation ne sont plus exprimées. Les mutations vont s'accumuler. Il s'ensuit une prolifération accrue (figure 5).

5.2. Immortalisation cellulaire

Les télomères consistent en des répétitions TTAGGG localisées aux extrémités des chromosomes. Dans une cellule somatique, l'activité télomérase est faible, voire inexistante et les télomères sont raccourcis à chaque division cellulaire pour atteindre une taille critique qui conduit à la sénescence rélicative. En revanche, dans la plupart des tumeurs, les télomères sont maintenus. La protéine E6 des HPV haut risque, en association avec la protéine E6AP, est capable d'activer la télomérase en augmentant l'expression de la sous-unité catalytique de cette enzyme (*hTERT*: *human telomerase reverse transcriptase*). Ceci permet le maintien de la longueur des télomères au cours des divisions successives [30]. L'activation de cette enzyme, qui nécessite la protéine Myc [35], est une étape importante dans l'immortalisation qui prédispose à l'infection chronique à HPV et à la transformation cellulaire. Les cellules immortalisées par HPV16 ou 18 montrent aussi des anomalies (perte ou excès de matériel génétique) portant sur les chromosomes 3, 10, 11, 18... avec en particulier des pertes alléliques en 3p et 10p à l'acmé de l'activité télomérase.

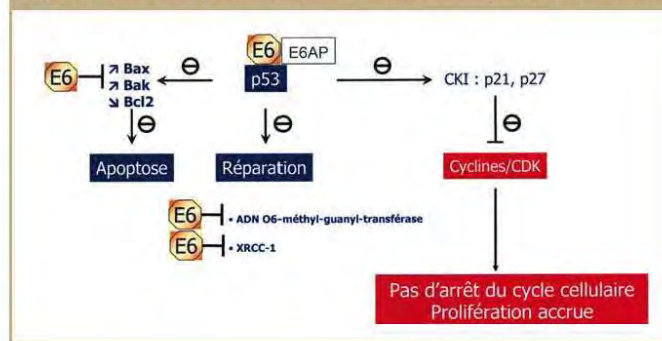
5.3. Transformation cellulaire

La protéine E6 des HPV haut risque lie et déstabilise l'enzyme ADN O(6)-méthylguanine méthyltransférase, impliqué dans le processus d'excision/réparation des bases. Elle inhibe aussi l'activité de la protéine XRCC1 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*) impliquée dans la réparation des cassures simple brin (figure 5). Les anomalies de réparation de l'ADN qui en résultent favorisent l'instabilité génique.

La protéine E7 contribue, elle aussi, à l'instabilité génétique en favorisant la synthèse anormale des centrioles avec pour conséquence une ségrégation anormale des chromosomes qui se traduit par une aneuploidie [16]. De plus, la protéine E7 active des gènes mitotiques comme Plk (*polo-like kinase*) et Aurora qui contribuent à l'induction de cette instabilité génomique [47]. Les cellules génétiquement instables accumulent des mutations supplémentaires favorisant la transformation cellulaire.

L'établissement et le maintien de la polarité des cellules épithéliales dépendent de complexes protéiques comprenant des molécules de surface, des protéines cytoplasmiques et des enzymes connectés au cytosquelette d'actine.

Figure 5 - Rôle de la protéine E6 dans l'inactivation de p53 et de ses cibles.



Lors de la transformation cellulaire, ces complexes sont déstabilisés, conduisant à une modification de l'architecture cellulaire et tissulaire. Parmi les acteurs de la polarité des cellules épithéliales, deux protéines à domaine PDZ jouent un rôle important (l'abréviation PDZ dérive des 3 premières protéines dans lesquelles ces domaines ont été trouvés : PSD95, une protéine de signalisation de 95kDa, Dlg, la protéine Disc large de la drosophile et ZO1, la protéine *Zonula occludens 1* qui entre dans la constitution des jonctions serrées). Il s'agit de hScrib (homologue humain de la protéine Scribble de la drosophile) et de hDlg (homologue humain de Disc large). Ces deux protéines interagissent avec la protéine E6 des HPV haut risque qui stimule leur dégradation [26, 33]. Il s'ensuit une perte des contacts intercellulaires via les jonctions serrées (mais aussi les jonctions adhérentes) et une perte de la polarité cellulaire. La disparition de ces jonctions peut ultérieurement favoriser la migration cellulaire et la dissémination métastatique.

L'adhérence de la cellule épithéliale à la matrice extracellulaire se fait entre autre via des complexes d'adhérence focale. Ces structures sont composées de très nombreuses protéines en relation très étroite avec la paxilline et le cytosquelette d'actine. La paxilline est une cible privilégiée de la protéine E6 des HPV haut risque qui favorise sa dégradation et par conséquent, altère la cyto-architecture. Il a été montré par ailleurs que la protéine FAK (*focal adhesion kinase*) est activée dans des cellules immortalisées par E6/E7 d'HPV18 et la phosphorylation de son substrat la paxilline est très augmentée, suggérant que la voie de signalisation FAK peut être impliquée dans la carcinogenèse du col utérin [28].

5.4. Croissance tumorale et dissémination métastatique

La cellule cancéreuse est capable de proliférer au delà des limites fixées par le renouvellement naturel du tissu auquel elle appartient. Mais pour que la croissance puisse se poursuivre, le tissu doit être irrigué afin de suppléer les demandes en oxygène et en nutriments. Ainsi, les cellules tumorales sont capables de produire des facteurs angiogéniques comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*)

qui permettent la création de nouveaux vaisseaux sanguins (néo-angiogenèse). Le VEGF est surexprimé dans les lésions de haut grade et les cancers invasifs du col de l'utérus [11]. Nous avons récemment montré dans notre laboratoire que l'expression du VEGF dans des cellules HeLa dérivées de cancer du col utérin, était régulée par la protéine E6 d'HPV18 et ce, indépendamment de p53 [12].

Les micro-ARN (miARN), petits ARNs non codants transcrits dans le noyau, se lient à des séquences complémentaires à l'extrémité 3'UTR des ARNm. Ils bloquent alors la traduction ou favorisent la dégradation des ARNm [24]. Calin et Croce ont récemment démontré que l'expression de certains miARN est associée avec de nombreux cancers [10]. Martinez *et al.* ont ainsi démontré en 2008 que des lignées cellulaires, des lésions cervicales et des cancers du col de l'utérus infectés par HPV16 sous-expriment les micro-ARN-218 [27]. L'introduction de miARN-218 dans des cellules SiHa diminue le taux d'ARNm et de protéine LAMB3, suggérant que les miARN-218 peuvent réguler l'expression de LAMB3 [27]. Cette protéine correspond à la chaîne bêta-3 de la laminine-5, laquelle est un marqueur d'invasion des cellules tumorales [44]. La LAMB3 elle-même augmente la migration de cellules cancéreuses de prostate [9]. La dérégulation des miARN-218 par la protéine E6 d'HPV16 et par conséquent l'hyperexpression de LAMB3 contribuent vraisemblablement au processus de dissémination métastatique.

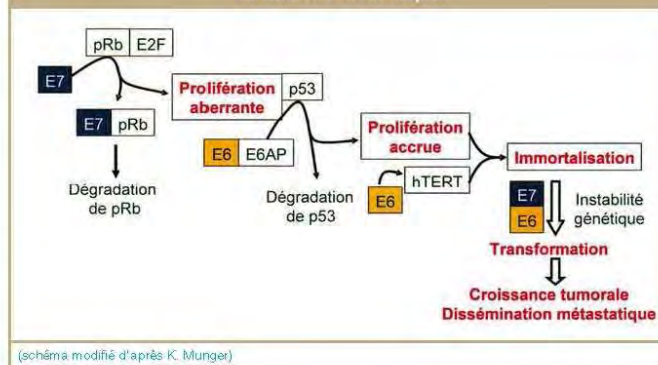
L'invasion et la dissémination métastatique ne peuvent avoir lieu que si les cellules tumorales sont capables de traverser la membrane basale et de dégrader la matrice extracellulaire sous-jacente. La migration des cellules est rendue possible par la perte des connexions intercellulaires et à la matrice extracellulaire et par la synthèse d'enzymes lytiques comme les métalloprotéases de la matrice (MMP) qui peuvent être synthétisées par les cellules tumorales. Peu de données sont à ce jour disponibles concernant l'expression des MMP par les cellules cancéreuses du col utérin. Il a toutefois été montré que l'expression de deux gélatinases-collagénases de type IV, la MMP-2 (gélatinase A) et la MMP-9 (gélatinase B), était augmentée dans les cancers du col de l'utérus [34].

Ces différentes étapes de la carcinogenèse sont résumées dans la *figure 6*.

6. Rôle de la protéine E5 dans le processus tumoral

La protéine E5 d'HPV16 induit la transformation de fibroblastes de rongeurs et de kératinocytes. Elle augmente l'activité transformante d'oncogènes comme Ras ou E7

Figure 6 – Principales étapes de la carcinogenèse associée à E7 et E6 des HPV haut risque.



d'HPV haut risque. Les mécanismes de cette transformation sont en grande partie liés au recyclage du récepteur à l'EGF, suite à un défaut de dégradation dans les lysosomes et à sa phosphorylation au niveau des tyrosines, ce qui prolonge le signal mitogénique. Par ailleurs, la protéine E5 d'HPV16 empêche la fixation de c-Cbl, une E3 ubiquitine ligase, sur le récepteur activé et par conséquent, inhibe sa dégradation dans le protéasome [54]. Enfin, il a été montré très récemment que les gangliosides GM1 sont considérablement augmentés dans les radeaux lipidiques (de 20 à 40 fois) en présence de la protéine E5 d'HPV16. Ces gangliosides sont connus pour activer le signal de prolifération du récepteur à l'EGF [46].

La protéine E5 d'HPV16 protège les cellules de l'apoptose induite par les rayonnements UV ou par le ligand de Fas ou par TRAIL (*tumor necrosis-related apoptosis inducing ligand*) dans des cultures de kératinocytes [23]. Kivi *et al.* ont récemment montré, en utilisant une puce à ADNc, que la protéine E5 d'HPV16 modifie l'expression de 179 gènes dans des cellules épithéliales. Certains de ces gènes codent des protéines impliquées dans l'adhérence et la motilité cellulaires ainsi que des signaux mitogènes. Ces modifications peuvent inhiber l'apoptose et favoriser la chronicité de l'infection virale [25].

La protéine E5 d'HPV16 inhibe aussi les jonctions communicantes (ou gaps), suite à une diminution d'expression de la connexine 43, un phénomène fréquemment observé dans les cellules transformées. L'inhibition de la communication intercellulaire *via* les gaps pourrait être expliquée par une augmentation de l'expression de la PKC-delta qui phosphoryle les connexines [25].

La protéine E5 altère le trafic des molécules du CMH I, ce qui favorise l'échappement au système immunitaire des cellules infectées par HPV, qui ne sont pas reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques. Une autre cause à l'échappement pourrait être la grande quantité de gangliosides présents dans les radeaux lipidiques de cellules exprimant E5 d'HPV16 ; les gangliosides sont connus pour inhiber les lymphocytes T cytotoxiques et bloquer la formation de synapses immunes [46].

Enfin, la protéine E5 pourrait participer au processus d'angiogenèse en activant Akt qui à son tour augmente l'expression du VEGF.

7. Les oncoprotéines virales : de nouvelles cibles thérapeutiques

Les relations très étroites entre les HPV haut risque et la carcinogenèse du col utérin ont conduit au développement de nouvelles thérapies ciblant les oncogènes viraux E6 et E7 en particulier. À côté des vaccins thérapeutiques en cours d'essai, des oligodésoxynucléotides antisens, des ribozymes et des siRNA dirigés contre E6 et E7 se sont avérés efficaces pour inhiber la croissance de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* [1, 50, 52]. Des aptamères qui lient E6 ou E7 d'HPV16 induisent l'apoptose de cellules CaSki (HPV16 positives). Plus récemment, le ciblage de E6 d'HPV16, dans des cellules dérivées de cancer du col utérin, grâce à un anticorps sélectionné par phage display, conduit à l'induction de p53 et à la mort des cellules [22]. Enfin, des miARN sont dérégulés dans des cellules de cancer du col de l'utérus. Certains pourraient être impliqués dans les mécanismes de la carcinogenèse et pourraient être de nouvelles cibles pharmacologiques.

8. Conclusion

Les génotypes d'HPV sont classés en fonction des différences observées dans la séquence d'ADN qui code la protéine de capsid L1. Les HPV haut risque comme les HPV16 et 18 sont susceptibles de conduire au développement d'un cancer du col de l'utérus. Les protéines E6 et E7 de ces virus sont à ce jour qualifiées d'oncoprotéines. Leur potentiel oncogène est en particulier dû à leur capacité de lier les protéines suppresseurs de tumeurs, p53 et p105^{Rb} respectivement, et de les dégrader. L'expression continue des protéines E6 et E7 est nécessaire au maintien du phénotype malin. C'est pourquoi des vaccins thérapeutiques, utilisant comme antigènes ces protéines précoces, ont été développés et testés dans des essais cliniques [13, 49]. Ils visent à induire la production de lymphocytes T cytotoxiques capables de détruire les cellules tumorales infectées (pour revue, voir [39]).

Les vaccins prophylactiques quant à eux visent à induire une immunité humorale. Les antigènes vaccinaux utilisés sont dérivés de la protéine de capsid L1, nécessaire à l'entrée des HPV dans la cellule. Les vaccins actuels sont très immunogènes ; ils induisent la production d'anticorps neutralisants efficaces sur l'infection persistante à HPV16 et 18 et sur l'apparition de lésions précancéreuses [20, 36].

Références

- [1] Alvarez-Salas L.M., Cullinan A.E., Siwkowski A., Hampel A., DiPaolo J.A., Inhibition of HPV-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (3) (1998) 1189-1194.
- [2] Ashrafi G.H., Haghshenas M., Marchetti B., Campo M.S., E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain, *Int. J. Cancer* 119 (8) (2006) 2105-2112.
- [3] Aubin F., Pretet J.L., Jacquard A.C., Saunier M., Carcopino X., Jaroud F., Pradat P., Soubeyrand B., Leocmach Y., Mougou C., Riethmuller D., Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata. A large French national study (EDITH IV), *Clin. Infect. Dis.* (sous presse) (2008).
- [4] Barbosa M.S., Edmonds C., Fisher C., Schiller J.T., Lowy D.R., Vousden K.H., The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation, *EMBO J.* 9 (1) (1990) 153-160.
- [5] Bosch F.X., Manos M.M., Muñoz N., Sherman M., Jansen A.M., Peto J., Schiffman M.H., Moreno V., Kurman R., Shah K.V., Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (11) (1995) 796-802.
- [6] Bosch F.X., Muñoz N., Human papillomavirus and cervical neoplasia, in: Muñoz N., Bosch F.X. and Jensen O.M. (Eds), *Human papillomavirus and cervical cancer*, IARC Scientific Publications, 1989, pp. 135-151.
- [7] Bousarghin L., Touze A., Sizaret P.Y., Coursaget P., Fixation, internalisation et trafic cellulaire des papillomavirus, in: Aubin F., Mougou C. and Pretet J.L. (Eds), *Papillomavirus humains : biologie et pathologie tumorale*, Lavoisier, 2003, pp. 25-34.
- [8] Brown D.R., Schroeder J.M., Bryan J.T., Stoler M.H., Fife K.H., Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients, *J. Clin. Microbiol.* 37 (10) (1999) 3316-3322.
- [9] Calaluze R., Bearss D.J., Barrera J., Zhao Y., Han H., Beck S.K., McDaniel K., Nagle R.B., Laminin-5 beta3A expression in LNCaP human prostate carcinoma cells increases cell migration and tumorigenicity, *Neoplasia* 6 (5) (2004) 468-479.
- [10] Calin G.A., Croce C.M., MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale, *Cancer Res.* 66 (15) (2006) 7390-7394.
- [11] Cheng W.F., Chen C.A., Lee C.N., Wei L.H., Hsieh C.Y., Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma, *Obstet. Gynecol.* 96 (5 Pt 1) (2000) 721-726.
- [12] Clere N., Belmont L., Fauconnet S., Lascombe I., Saunier M., Vettorelli L., Plissonnier M.L., Mougou C., The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism, *Exp. Cell Res.* 313 (15) (2007) 3239-3250.
- [13] Davidson E.J., Boswell C.M., Sehr P., Pawlita M., Tomlinson A.E., McVey R.J., Dobson J., Roberts J.S., Hickling J., Kitchener H.C., Stern P.L., Immunological and clinical responses in women with vulval intraepithelial neoplasia vaccinated with a vaccinia virus encoding human papillomavirus 16/18 oncoproteins, *Cancer Res.* 63 (18) (2003) 6032-6041.
- [14] de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H., Classification of papillomaviruses, *Virology* 324 (1) (2004) 17-27.
- [15] Disbrow G.L., Hanover J.A., Schlegel R., Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH, *J. Virol.* 79 (9) (2005) 5839-5846.
- [16] Duensing S., Munger K., Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability, *Oncogene* 21 (40) (2002) 6241-6248.
- [17] Filippova M., Parkhurst L., Duerksen-Hughes P.J., The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis, *J. Biol. Chem.* 279 (24) (2004) 25729-25744.
- [18] Franco E.L., The sexually transmitted disease model for cervical cancer: incoherent epidemiologic findings and the role of misclassification of human papillomavirus infection, *Epidemiology* 2 (2) (1991) 98-106.

Dossier scientifique

- [19] Frolow M.V., Dyson N.J., Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression, *J. Cell. Sci.* 117 (Pt 11) (2004) 2173-2181.
- [20] Future-II., Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions, *N. Engl. J. Med.* 356 (19) (2007) 1915-1927.
- [21] Gissmann L., Boshart M., Durst M., Ikenberg H., Wagner D., zur Hausen H., Presence of human papillomavirus in genital tumors, *J. Invest. Dermatol.* 83 (1 Suppl) (1984) 26s-28s.
- [22] Griffin H., Elston R., Jackson D., Ansell K., Coleman M., Winter G., Doorbar J., Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting, *J. Mol. Biol.* 355 (3) (2006) 360-376.
- [23] Kabsch K., Alonso A., The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms, *J. Virol.* 76 (23) (2002) 12162-12172.
- [24] Kim V.N., MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6 (5) (2005) 376-385.
- [25] Kivi N., Greco D., Auvinen P., Auvinen E., Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression, *Oncogene* 27 (18) (2008) 2532-2541.
- [26] Kiyono T., Hirawa A., Fujita M., Hayashi Y., Akiyama T., Ishibashi M., Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (21) (1997) 11612-11616.
- [27] Martinez I., Gardiner A.S., Board K.F., Monzon F.A., Edwards R.P., Khan S.A., Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-216 in cervical carcinoma cells, *Oncogene* 27 (18) (2008) 2575-2582.
- [28] McCormack S.J., Brazinski S.E., Moore J.L., Jr., Werness B.A., Goldstein D.J., Activation of the focal adhesion kinase signal transduction pathway in cervical carcinoma cell lines and human genital epithelial cells immortalized with human papillomavirus type 18, *Oncogene* 15 (3) (1997) 265-274.
- [29] Mougin C., Bernard B., Lab M., Biology of papillomavirus infections. I. General characteristics, *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 55 (6) (1997) 555-563.
- [30] Munger K., Baldwin A., Edwards K.M., Hayakawa H., Nguyen C.L., Owens M., Grace M., Huh K., Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis, *J. Virol.* 78 (21) (2004) 11451-11460.
- [31] Munger K., Howley P.M., Human papillomavirus immortalization and transformation functions, *Virus Res.* 89 (2) (2002) 213-228.
- [32] Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah K.V., Snijders P.J., Meijer C.J., Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer, *N. Engl. J. Med.* 348 (6) (2003) 518-527.
- [33] Nakagawa S., Huijbregtse J.M., Human scribble (*Vartul*) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase, *Mol. Cell. Biol.* 20 (21) (2000) 8244-8253.
- [34] Nuovo G.J., MacConnell P.B., Sims A., Valea F., French D.L., Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma, *Cancer Res.* 55 (2) (1995) 267-275.
- [35] Oh S.T., Kyo S., Laimins L.A., Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites, *J. Virol.* 75 (12) (2001) 5559-5566.
- [36] Paavonen J., Jenkins D., Bosch F.X., Naud P., Salmeron J., Wheeler C.M., Chow S.N., Apter D.L., Kitchener H.C., Castellsague X., de Carvalho N.S., Skinner S.R., Harper D.M., Hedrick J.A., Jaisamram U., Limson G.A., Dionne M., Quint W., Spiessens B., Peeters P., Struyf F., Wieting S.L., Lehtinen M.O., Dubin G., Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial, *Lancet* 368 (9580) (2007) 2161-2170.
- [37] Parkin D.M., Bray F., Chapter 2: The burden of HPV-related cancers, *Vaccine* 24 Suppl 3 (2006) S11-25.
- [38] Prati M.A., Le Doussal V., Harvey P., Laval C., Bertrand F., Jibard N., Croissant O., Orth G., Human papillomaviruses in the epithelial cells of the cervix uteri: frequency of types 16 and 18. Preliminary results of a clinical, cytologic and viral study, *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 15 (1) (1986) 45-50.
- [39] Pretet J.L., Alvarez E., Monnier-Benoit S., Touze A., Vaccination against human papillomavirus infections, *Rev. Prat.* 56 (17) (2006) 1914-1918.
- [40] Pretet J.L., Jacquard A.C., Carcopino X., Charlot J.F., Bouhour D., Kantelip B., Soubeyrand B., Leocmach Y., Mougin C., Riethmuller D., Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study, *Int. J. Cancer* 122 (2) (2008) 428-432.
- [41] Pretet J.L., Jacquard A.C., Carcopino X., Monnier-Benoit S., Averou G., Soubeyrand B., Leocmach Y., Mougin C., Riethmuller D., Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: EDITH study, *Int. J. Cancer* 122 (2) (2008) 424-427.
- [42] Schiffman M., Herrero R., Desalle R., Hildesheim A., Wacholder S., Rodriguez A.C., Bratti M.C., Sherman M.E., Morales J., Guillen D., Alfaro M., Hutchinson M., Wright T.C., Solomon D., Chen Z., Schussler J., Castle P.E., Burk R.D., The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution, *Virology* 337 (1) (2005) 76-84.
- [43] Schwarz E., Freese U.K., Gissmann L., Mayer W., Roggenbuck B., Stremmler A., zur Hausen H., Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells, *Nature* 314 (6006) (1985) 111-114.
- [44] Skyldberg B., Salo S., Eriksson E., Aspenblad U., Moberger B., Tryggvason K., Auer G., Laminin-5 as a marker of invasiveness in cervical lesions, *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (21) (1999) 1882-1887.
- [45] Stubenrauch F., Zobel T., Iftner T., The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31, *J. Virol.* 75 (9) (2001) 4139-4149.
- [46] Suprynowicz F.A., Disbrow G.L., Krawczyk E., Simic V., Lantzy K., Schlegel R., HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells, *Oncogene* 27 (8) (2008) 1071-1078.
- [47] Thierry F., Benotmane M.A., Demeret C., Mori M., Teissier S., Desaintes C., A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis, *Cancer Res.* 64 (3) (2004) 895-903.
- [48] Valle G.F., Banks L., The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells, *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 5) (1995) 1239-1245.
- [49] van der Burg S.H., Kwappenberg K.M., O'Neill T., Brandt R.M., Melief C.J., Hickling J.K., Oflringa R., Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens, *Vaccine* 19 (27) (2001) 3652-3660.
- [50] Venturini F., Braspenning J., Homann M., Gissmann L., Sczakiel G., Kinetic selection of HPV 16 E6/E7-directed antisense nucleic acids: anti-proliferative effects on HPV 16-transformed cells, *Nucleic Acids Res.* 27 (7) (1999) 1585-1592.
- [51] Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V., Snijders P.J., Peto J., Meijer C.J., Munoz N., Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J. Pathol.* 189 (1) (1999) 12-19.
- [52] Yamato K., Yamada T., Kizaki M., Ui-Tei K., Natori Y., Fujino M., Nishihara T., Ikeda Y., Nasu Y., Saigo K., Yoshinouchi M., New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer, *Cancer Gene Ther.* 15 (3) (2008) 140-153.
- [53] Yang L., Mohr I., Fouts E., Lim D.A., Nohale M., Botchan M., The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (11) (1993) 5086-5090.
- [54] Zhang B., Srirangam A., Potter D.A., Roman A., HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes, *Oncogene* 24 (15) (2005) 2585-2588.

Posters

Poster n°1 :

J.F. Charlot, M.Nicolier, J.L.Prétet, C.Mougin. Apoptosis of cervical carcinoma-derived cells lines: role of p53 in the mitochondria pathway. 21st International Papillomavirus Conference, Mexico (Mexique), 20-26 february 2004.

Poster n°2 :

J.F.Charlot, M.Nicolier, J.L.Prétet, C.Mougin. Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and pifithrin- α on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 cells. 96th annual meeting American Association for Cancer Research, Anaheim (CA, USA), 16-20 april 2005.

Poster n°3 :

M.Nicolier, J.F.Charlot, J.L.Prétet, C.Mougin. Effet des agents chimiques PRIMA-1 et pifithrin- α sur l'activité transcriptionnelle de la protéine p53 impliquées dans l'apoptose induite par la staurosporine. XI^e Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon (France), 9-10 juin 2005.

Poster n°4 :

M.Nicolier, J.F.Charlot, J.L.Prétet, C.Mougin. Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and pifithrin- α : Effects on staurosporine-induced apoptosis of wild-type p53 cells. Cell Signaling Worls 2006 « Signal transduction pathway as therapeutic targets », Luxembourg (Luxembourg), 25-28 january 2006.

Poster n°5 :

M.Nicolier, J.F.Charlot, J.L.Prétet, C.Mougin. Apoptosis of cervical carcinoma-derived cell lines: Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and pifithrin- α . 23rd International Papillomavirus Conference, Prague (Czech Republic), 1-7 september 2006.

Poster n°6 :

M.Nicolier, S.Launay, A.Z.Décron-Barthod, J.L.Prétet, C.Mougin. Staurosporine induces apoptotic cell death of cervical carcinoma cells through cytochrome-c and AIF-dependent pathways.

- 4th International Meeting of the Cutaneous HPV Consortium « HPV and Skin Cancer », Besançon (France), 27-30 june 2007 (Abstract published in Bulletin du Cancer, 2007 ; 94: 617).

- 1st Forum Cancéropôle Grand-Est, Vittel (France), 19 octobre 2007.

Poster n°7 :

M.Nicolier, A.Z.Décron-Barthod, J.L.Prétet, C.Mougin. Cervical carcinoma cells display apoptosis under staurosporine exposure through caspase-dependent and caspase-independent pathways. 15th Euroconference on Apoptosis & 4th Training Course on « Concepts and Methods in Programmed cell Death Forum », Portoroz (Slovenia), 26-31 october 2007.



Apoptosis of cervical carcinoma-derived cell lines : A role of p53 in the mitochondrial pathway.

J.F. Charlot ; M. Nicolier ; J.L. Pr  tet and C. Mougin

IFR 133; EA 3181 Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire; CHU J.Minjoz; 2 bd Fleming; 25000 Besançon

Financial support by "La Ligue Contre le Cancer, comité du Doubs" and "TARERS". Registration fees paid by "Roche"



Introduction

In human papillomavirus (HPV)-associated carcinomas, the viral E6 protein promotes p53 degradation leading to cell cycle and apoptosis deregulation. Nevertheless, we have observed that staurosporine can trigger death of cancer-derived HeLa and CaSki cells with decreased E6 mRNA and increased expression of p53, which is transiently located to mitochondria (Bernard *et al.* Biol Cell 2003)

At the mitochondrial level, p53 forms, by its DNA binding domain (DBD), inhibitory complexes with Bcl-2 anti-apoptotic proteins during a p53-dependent apoptosis (Mihara 2003). Thus, p53 promotes apoptosis by favoring mitochondrial pore opening, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) dissipation and cytochrome c release (Fig. 1).

To investigate the implication of p53 on $\Delta\Psi_m$ collapse, two mutant p53 cell lines (C33A and HaCat) and one p53-defective cell line (SaOs-2) were studied in addition to HeLa and CaSki cells. p53 localization was observed by ICC, $\Delta\Psi_m$ dissipation and Sub-G1 DNA content were analyzed by flow cytometry in presence or not of cyclosporine A (an inhibitor of VDAC-ANT pore).

Material and methods

Cell lines and treatment :

- HeLa et CaSki: derived from uterine cervix cancer, p53 wild-type.
- C33A: derived from uterine cervix cancers, p53 mutated (DBD).
- HaCat: immortalized keratinocytes, p53 mutated (UV hot spots).
- SaOs-2: derived from osteosarcoma, p53 deficient.

- Apoptosis induction : 300 nM staurosporine (ST).
- $\Delta\Psi_m$ drop inhibition : 10 μ M cyclosporine (CsA).

Immunocytochemistry (microscope Olympus BX51) :

- p53 : Ab I DO-7 mouse anti human p53 – TRITC.
- Mitochondria : Nonyl Acridine Orange (NAO).
- DNA : Hoechst 33342.

Cytometry (FACSscan Epics® Altra, Beckman Coulter) :

- $\Delta\Psi_m$: MitoTrackerRed (specific marker of mitochondrial $\Delta\Psi_m$).
- DNA fragmentation : propidium iodide.
- Analyses performed with expo-32 software.

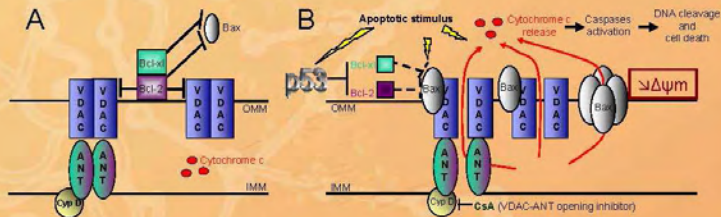


Fig. 1 : Major models of pores implicated in the mitochondrial permeability transition :
A : At basal level, Bcl-2 and Bcl-xL anti-apoptotic proteins inhibit pore opening by interacting with VDAC and pro-apoptotic proteins like Bax (or Bak) B : Following an apoptotic stimulus, p53 transactivates Bax whilst Bcl-2 is repressed. In addition, p53 localizes at the mitochondrial level to form inhibitory complexes with Bcl-2/Bcl-xL. Thus, Bax is able to form homo-oligomers (or hetero-oligomers with Bak) to create pores in the OMM. Bax can also interact with VDAC to open VDAC-ANT channel (which can be inhibited by, CsA) and VDAC-Bax pore. Then, cytochrome c is released into the cytosol and permits subsequently caspase activation, cellular protein cleavage, DNA fragmentation and cell death.

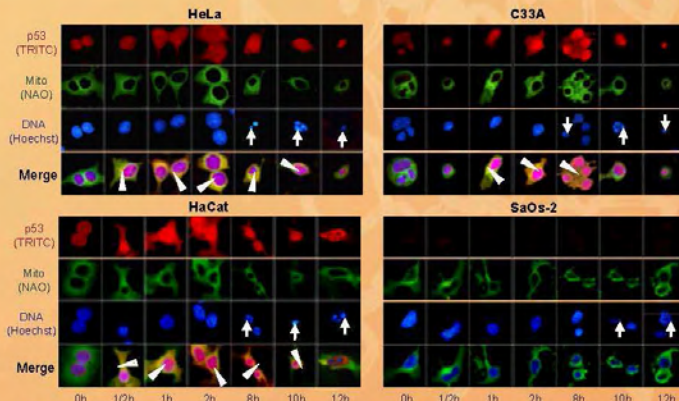


Fig 2 : p53 mitochondrial localization during ST-induced apoptosis. p53 staining revealed an exclusively nuclear localization in untreated p53wt HeLa cells. Mitochondrial localization occurred rapidly, within 30 min upon ST exposure and persisted for at least 10h. Beyond 12h of ST exposure, p53 was again distributed throughout the nuclei. Similar results were observed in CaSki cells (data not shown). Immunocytochemical staining for mutated p53 did not exhibit strong differences in immortalized HaCat cells and malignant C33A cells. In both cell lines, p53mt was recruited to the mitochondria. However a slight delay (60 min) and a shorter duration (8h) was observed in C33A cells harboring a p53 mutated on its DBD compared with HaCat cells with a p53 mutated on UV hot spots. Nuclear Hoechst staining confirmed death of these five immortal cell lines 8 to 12 h after ST treatment.

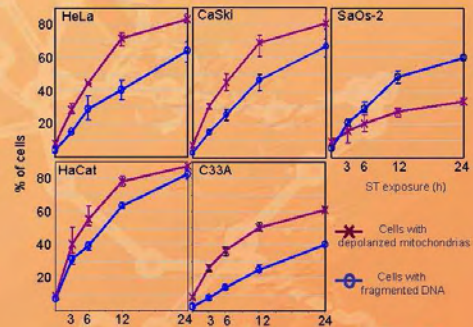


Fig. 3 : $\Delta\Psi_m$ drop precedes DNA fragmentation in p53+ cells. The percentage of cells with depolarized mitochondria and/or fragmented DNA increased upon ST exposure. The mitochondrial membrane depolarization (x) occurred before DNA fragmentation (o) in p53+ cell lines (HeLa, CaSki, C33A and HaCat). However, at 24h ST post-exposure, cells with depolarized mitochondria and/or fragmented DNA were less numerous in C33A cells (p53 mutated on its DBD) than in HeLa, CaSki (p53 wild-type) or HaCat cells (p53 mutated on UV hot spots but not on DBD). In SaOs-2 cells, the mitochondrial depolarization was weak and didn't precede DNA fragmentation.

Conclusions

- During ST-induced apoptosis, the mitochondrial localization of p53 occurred in HeLa, CaSki, HaCat (p53 without mutations on DBD) and C33A (p53 mutated on DBD) cells but it was later and shorter in the C33A cells.
- HeLa, CaSki and HaCat cell lines, without p53 mutations in its DBD (which is implicated in p53-Bcl-2/Bcl-xL interactions), presented a higher $\Delta\Psi_m$ drop than the C33A (p53 mutated on DBD) and SaOs-2 (p53 deficient) cell lines.
- In p53+ cells: $\Delta\Psi_m$ drop preceded the DNA fragmentation and its inhibition (by CsA) decreased apoptosis \rightarrow Mitochondrial depolarization is a necessary event for the apoptotic process
- In p53 deficient cells : $\Delta\Psi_m$ drop didn't precede the DNA fragmentation and its inhibition (by CsA) had no effect on apoptosis \rightarrow Mitochondrial depolarization seems to be more a consequence rather than a cause of the apoptotic process.

**Wild or mutated p53
appears to influence mitochondrial depolarization
during apoptosis of cervical carcinoma-derived cell lines.**

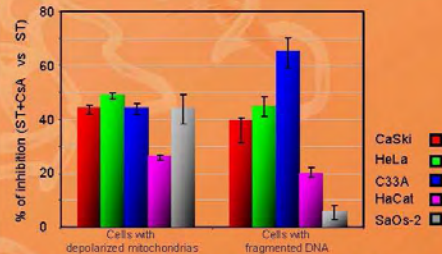


Fig. 4 : Cyclosporine A (CsA)-induced inhibition of $\Delta\Psi_m$ drop. Addition of 10 μ M CsA to 300 nM ST reduced $\Delta\Psi_m$ dissipation compared with cells treated by ST alone, (results are expressed in % of inhibition : CsA+ST treated cells compared to ST treated cells). In p53+ cells, inhibition of the mitochondrial depolarization was accompanied by a decreased percentage of cells with fragmented DNA. In p53- SaOs-2, CsA inhibited the mitochondrial depolarization with no effect on DNA fragmentation.

This work is in press in Apoptosis 2004

Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin- α on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 cells.



J.F. Charlot, M. Nicolier, J.Y. Cahn, J.L. Pr  tet, and C.Mougin
IFR 133, EA 3181, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, UFR SMP, 25000 Besançon, France.



Introduction

In more than half of human cancers, p53 is inactivated by mutation leading to apoptosis inhibition. However, a small molecule, named PRIMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis), has been recently discovered to restore the transcriptional activity of mutant p53. But the role of p53 is not limited to its involvement in killing tumour cells. This protein is indeed highly expressed in several normal tissues damaged by anti-cancer therapy. Thus Pifithrin- α (p fifty-three inhibitor), a chemical inhibitor of p53, has been proposed to be used as an adjunct of chemotherapy in tumours lacking functional p53 to avoid damages of healthy neighbourhoods' tissues.

We recently argued for a major role of p53 in staurosporine(ST)-induced apoptosis of immortalized epithelial cells, depending on their p53 status. To reinforce our previous results, we focused here on the modulation of p53 transcriptional activity induced by PRIMA-1 and PFT- α by assessing expression of p53, p21, Bax and Bcl-2, and two characteristic apoptotic events: the mitochondrial membrane depolarization ($\Delta\Psi_m$) and the DNA fragmentation (Sub-G1 DNA content).

Experimental Design

Cell lines and p53 status:

- HeLa and CaSki: derived from uterine cervix cancer, p53 wild-type.
- C33A: derived from uterine cervix cancer, p53 mutated.
- HaCat: immortalized keratinocytes, p53 mutated but transcriptionally active.
- SaOs-2: derived from osteosarcoma, p53 deficient.

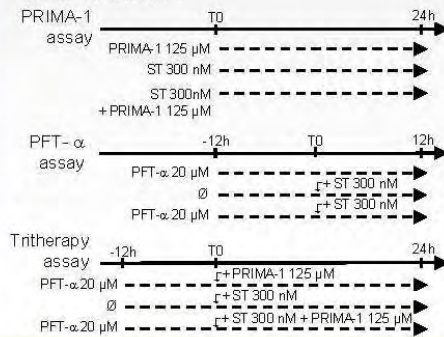
Cytometry (FACScan Epics[®] Altra, Beckman Coulter):

- $\Delta\Psi_m$: MitotrackerRed (specific marker of mitochondrial $\Delta\Psi_m$).
- DNA fragmentation: propidium iodide.
- Analyses performed with expo-32 software.

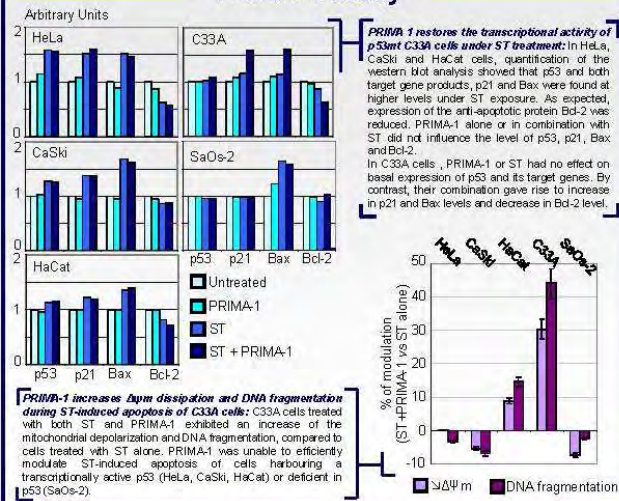
Western blotting:

- Ab: p53 DO-1; p21^{WAF16B6}; Bax BA7; Bcl-2 4D7; actine Ac15.
- Quantification performed with Gel Doc 1000[®] and multianalyst software.

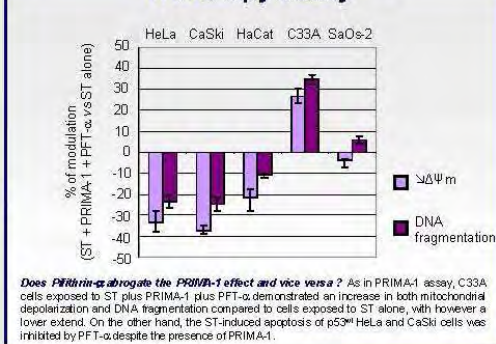
Treatment procedure:



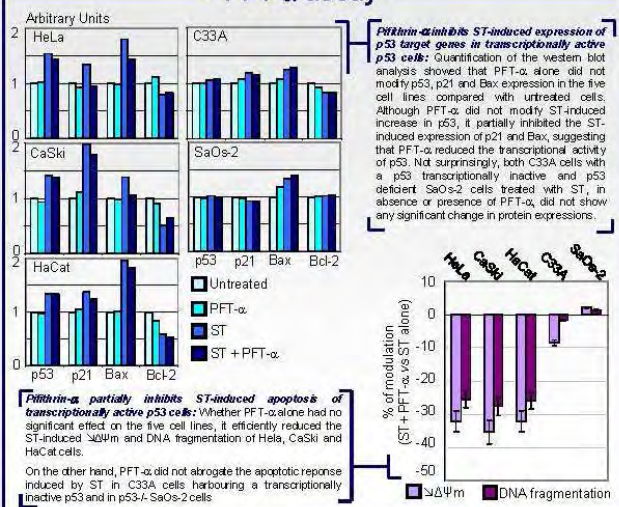
PRIMA-1 assay



Tritherapy assay



PFT- α assay



Conclusion

Our findings suggest a major role of p53 in ST-induced apoptosis of immortalized epithelial cell lines.

The combination of PRIMA-1 with staurosporine would be effective to target p53 transcriptionally defective tumors, but not useful in wild type p53 tumors that could be targeted by RITA (Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis).

Since PFT- α did not compromise the anti-tumor activity of ST and PRIMA-1 in p53-mutated cancer cells, this new compound might be added to ST and PRIMA-1 to reduce the chemotherapy ill-fated secondary effects such as hair loss by protecting vestibular hair cells from apoptosis. Future animal experiments and clinical trials will be conducted to test these new drugs in whole-organism and establish the efficiency of a tritherapy regimen.

Effet des agents chimiques, Prima-1 et Pifithrine- α , sur l'activité transcriptionnelle de la protéine p53 impliquée dans l'apoptose induite par la staurosporine (ST)



M. Nicolier, J.F. Charlot, J.L. Prêtet, and C.Mougins

IFR 133, EA 3181, Carcinogénèse épithéliale, UFR SMP, 25000 Besançon, France

Introduction

La protéine p53 est bien connue pour son activité anti-tumorale. Suite à un stress génotoxique, elle participe à l'arrêt du cycle cellulaire, voire à l'apoptose. Dans la majorité des cancers, p53 est inactivée suite à des mutations aboutissant à un défaut d'apoptose. Dans des cellules tumorales abritant des papillomavirus humains (HPV), p53 est inactivée suite à une dégradation dans le protéasome liée à l'expression d'oncoprotéines virales. Pour mieux comprendre le rôle de p53 lors de l'apoptose induite par la ST de cellules dérivées de cancer, nous avons étudié l'effet des molécules chimiques Prima-1 et Pifithrine α (PFT- α).

En effet, Prima-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) restaure l'activité transcriptionnelle de p53 mutée alors que PFT- α (p fifty-three inhibitor) inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 sauvage.

Pour évaluer l'impact de ces deux molécules sur l'apoptose induite par la ST, nous nous sommes intéressés à leurs effets sur l'expression de p53 et de ses gènes cibles p21, Bax et Bcl-2 et sur deux événements caractéristiques de l'apoptose : la dépolérisation de la membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) et la fragmentation de l'ADN (pic Sub-G1).

Lignées cellulaires et traitements

Lignées cellulaires :

- HeLa et CaSki (carcinome du col de l'utérus) : p53 sauvage.
- C33A (carcinome du col utérin) : p53 mutée transcriptionnellement inactive.
- HaCat (kératinocytes immortalisés) : p53 mutée transcriptionnellement active.
- SaOs-2 (ostéosarcome) : p53 nulle.

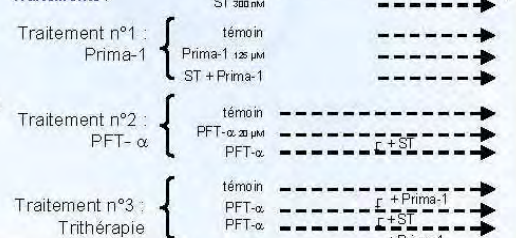
Cytométrie (FACSscan Epics® Altra, Beckman Coulter) :

- $\Delta\Psi_m$: MitotrackerRed CMXRos (marqueur spécifique du potentiel membranaire mitochondrial).
- Fragmentation de l'ADN : iodure de propidium.
- Analyses réalisées avec le logiciel expo-32.

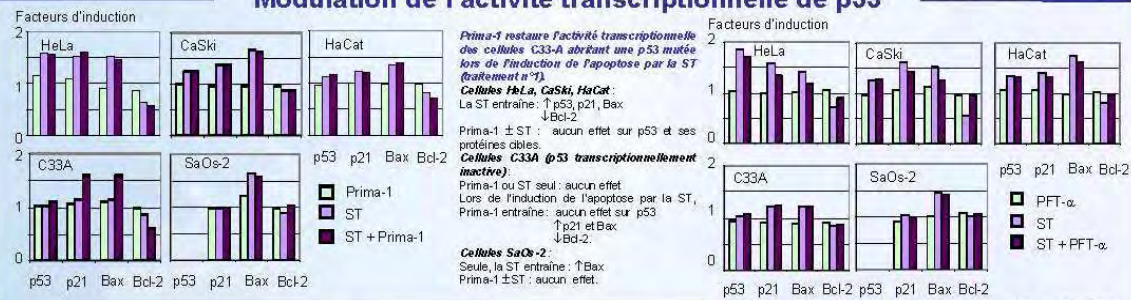
Western blotting :

- Anti-corps : p53 DO-1 ; p21WAF1 8B6 ; Bax 6A7 ; Bcl-2 4D7 ; actine Act15.
- Quantification réalisée avec le Gel Doc 1000® et le logiciel multianalyst.

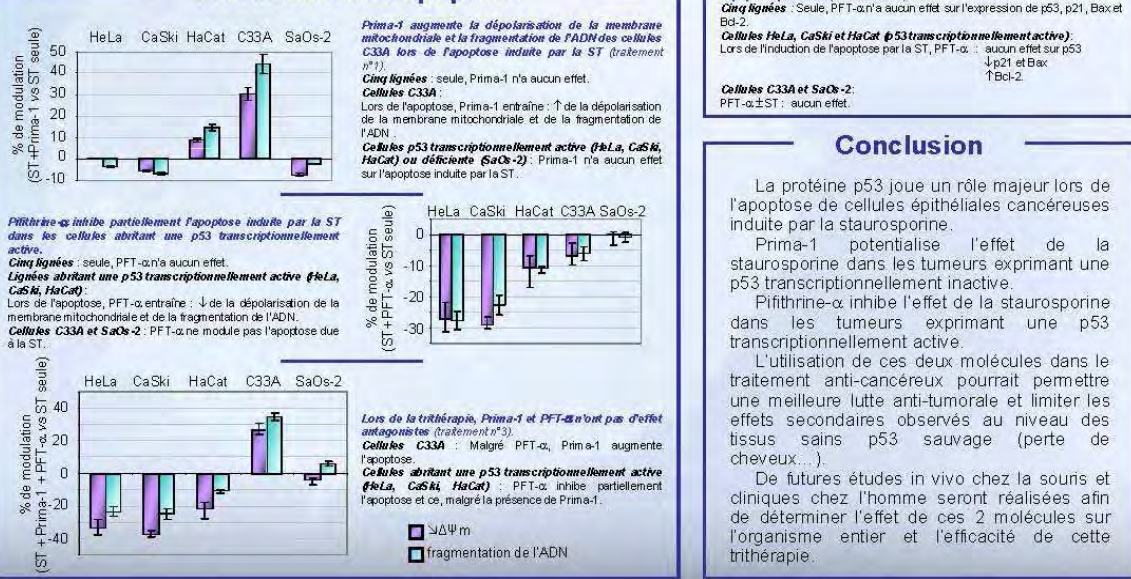
Traitements :



Modulation de l'activité transcriptionnelle de p53



Modulation de l'apoptose



Conclusion

La protéine p53 joue un rôle majeur lors de l'apoptose de cellules épithéliales cancéreuses induite par la staurosporine.

Prima-1 potentialise l'effet de la staurosporine dans les tumeurs exprimant une p53 transcriptionnellement inactive.

Pifithrine- α inhibe l'effet de la staurosporine dans les tumeurs exprimant une p53 transcriptionnellement active.

L'utilisation de ces deux molécules dans le traitement anti-cancéreux pourrait permettre une meilleure lutte anti-tumorale et limiter les effets secondaires observés au niveau des tissus sains p53 sauvage (perte de cheveux...).

De futures études in vivo chez la souris et cliniques chez l'homme seront réalisées afin de déterminer l'effet de ces 2 molécules sur l'organisme entier et l'efficacité de cette trithérapie.

Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin-alpha : effects on staurosporine-induced apoptosis of wild-type and mutated p53 cells



M. Nicolier, J.F. Charlot, J.L. Pr  tet, and C. Mouglin
 IFR 133, EA 3181, Carcinog  nese   pith  liale, UFR SMP, 25000 Besançon, France. Email : magali.nicolier@univ-fcomte.fr
 Financial supports by « La Ligue Contre Le Cancer, comité du Doubs » and Ville de Besançon (grant)



Introduction

Inactivation of p53 functions by mutations or by viral oncoproteins such as E6 from high risk human papillomavirus (HPV) is a common event in many human cancers. New therapeutic approaches consist in the induction of apoptosis through the restoration of p53 functions. However, these therapies may also damage surrounding normal tissues which express wild-type p53.

Recently, we argued for a major role of p53 in staurosporine (ST)-induced apoptosis of immortalized epithelial cells, according to their p53 status (wild type: wt or mutated: mt).

To reinforce our previous results, we investigated the effects of PRIMA-1 (for p53 reactivation and induction of massive apoptosis), a small drug allowing the refolding of mutant p53 and Pifithrin-alpha (for p53 transcriptional inhibitor: PFT-  ), a chemical inhibitor of p53^{mt} on ST-induced apoptosis. We focused our study on the expression of p53 target genes such as p21, Bax and Bcl-2 and on the loss of mitochondrial membrane depolarization ($\Delta\Psi_m$) and DNA fragmentation (Sub-G1 content).

Experimental design

Cell lines and p53 status:

- HeLa and CaSki (derived from uterine cervix carcinoma): p53 wild-type.
- C33-A (derived from uterine cervix carcinoma): p53 mutated and transcriptionally defective.
- HaCat (immortalized keratinocytes): p53 mutated but transcriptionally active.
- SaOs-2 (derived from osteosarcoma): p53 deficient.

Cytometry (FACSscan Epics® Altra, Beckman Coulter):

- $\Delta\Psi_m$: MitotrackerRed CMXRos (specific marker of mitochondrial $\Delta\Psi_m$).
- DNA fragmentation: propidium iodide.
- Analyses performed by expo-32 software.

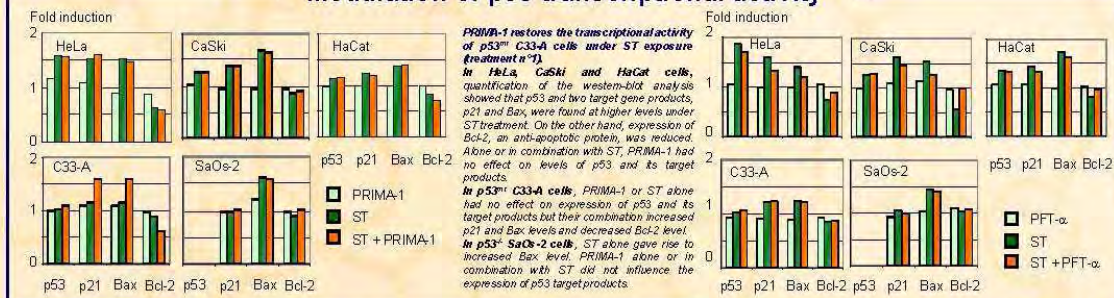
Western blotting:

- Abs: p53 DO-1; p21/WAF1 6B6; Bax 8A7; Bcl-2 4D7; actin Ac15.
- Quantification performed by Gel Doc 1000® and multianalyst software.

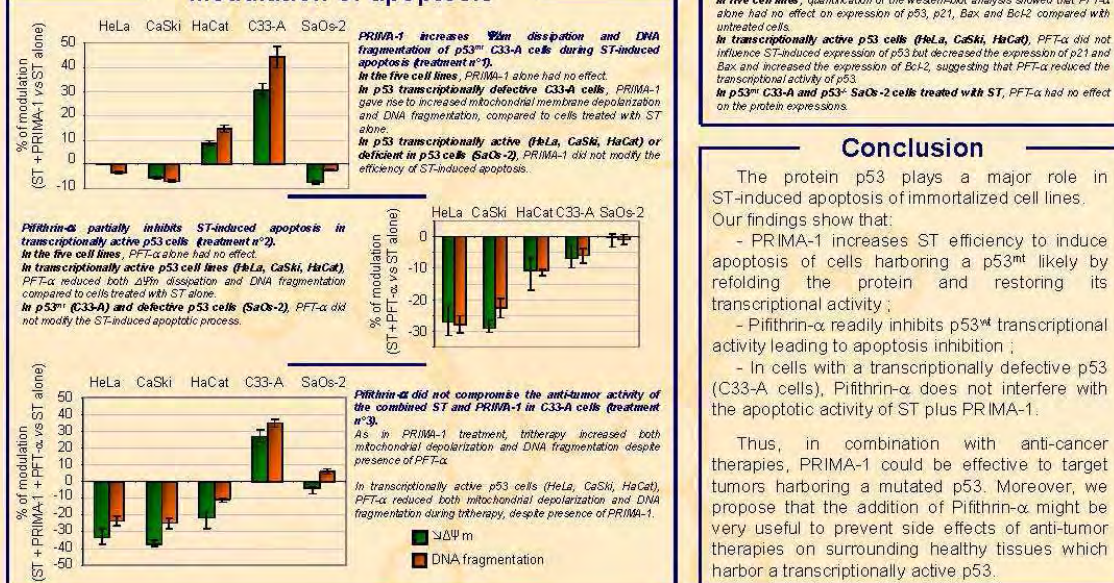
Treatments:

Treatment	-12h	T0	24h
Treatment n°1: PRIMA-1	ST		
	untreated		
	PRIMA-1 125 μ M		
Treatment n°2: PFT-��	untreated		
	PFT-�� 20 μ M		
	PFT-��	ST	
Treatment n°3: Tritherapy	untreated		
	PFT-��		
	PFT-��	ST + PRIMA-1	
	PFT-��	ST + PRIMA-1	

Modulation of p53 transcriptional activity



Modulation of apoptosis



Conclusion

The protein p53 plays a major role in ST-induced apoptosis of immortalized cell lines. Our findings show that:

- PRIMA-1 increases ST efficiency to induce apoptosis of cells harboring a p53^{mt} likely by refolding the protein and restoring its transcriptional activity;
- Pifithrin-   readily inhibits p53^{mt} transcriptional activity leading to apoptosis inhibition;
- In cells with a transcriptionally defective p53 (C33-A cells), Pifithrin-   does not interfere with the apoptotic activity of ST plus PRIMA-1.

Thus, in combination with anti-cancer therapies, PRIMA-1 could be effective to target tumors harboring a mutated p53. Moreover, we propose that the addition of Pifithrin-   might be very useful to prevent side effects of anti-tumor therapies on surrounding healthy tissues which harbor a transcriptionally active p53.

In press (Apoptosis 2006)

Apoptosis of cervical carcinoma-derived cell lines : Modulation of p53 transcriptional activity by PRIMA-1 and Pifithrin-alpha



M. Nicolier, J.F. Charlot, J.L. Pr  tet, and C. Mougin
IFR 133, EA 3181, Carcinog  nese   pith  liale, UFR SMP, 25000 Besançon, France. Email : magali.nicolier@univ-fcomte.fr
Financial supports by    La Ligue Contre Le Cancer, comité du Doubs   , Ville de Besançon (grant) and Digene (registration fees)



Introduction

In human papillomavirus (HPV)-associated carcinomas, the E6 viral protein promotes p53 degradation leading to cell cycle and apoptosis deregulation. However, we have observed that staurosporine (ST) can trigger death of cervix cancer-derived HeLa (HPV18+) and CaSki (HPV16+) cells with decreased E6 mRNA and increased expression of p53, which is transiently located to mitochondria. Recently, we argued for a major role of p53 in staurosporine (ST)-induced apoptosis of tumoral cervical epithelial cells, according to their p53 status (wild type: wt or mutated: mt).

To reinforce our previous results, we investigated the effects of PRIMA-1 (for p53 reactivation and induction of massive apoptosis), a small drug allowing the refolding of mutant p53 and Pifithrin-alpha (for p53 transcriptional inhibitor: PFT-  ), a chemical inhibitor of p53 on ST-induced apoptosis. We focused our study (i) on the expression of p53 target genes such as p21, Bax and Bcl-2, (ii) on the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and DNA fragmentation (Sub-G1 content) and (iii) on p53's mitochondrial translocation.

Experimental design

Cell lines and p53 status:

- HeLa and CaSki (derived from uterine cervix carcinoma): p53 wild-type.
- C33-A (derived from uterine cervix carcinoma): p53 mutated and transcriptionally defective.

Cytometry (FACSscan Epics® Altra, Beckman Coulter):

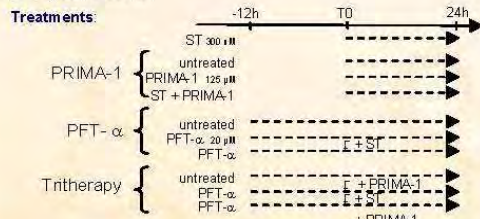
- $\Delta\Psi_m$: MitotrackerRed CMXRos (specific marker of mitochondrial $\Delta\Psi_m$).
- DNA fragmentation: propidium iodide.
- Analyses performed by expo-32 software.

Western blotting:

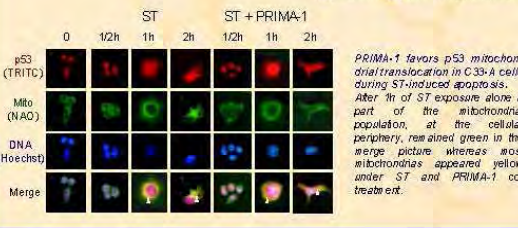
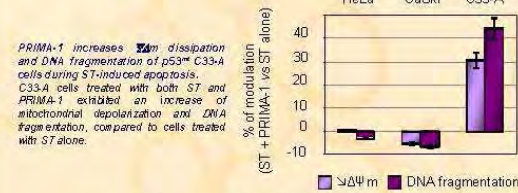
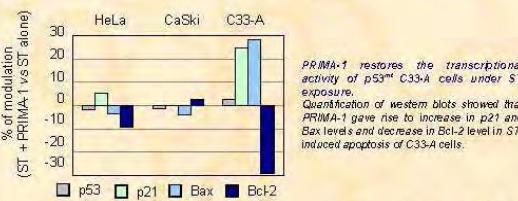
- Abs: p53 DO-1; p21WAF1 6B6; Bax 6A7; Bcl-2 4D7; actin Ac15.
- Quantification performed by Gel Doc 1000® and multianalyst software.

Immunocytochemistry (microscope Olympus BX51):

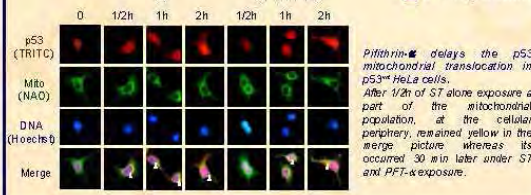
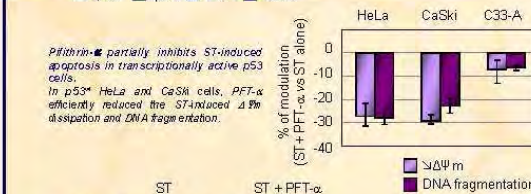
- Abs: p53 DO-7 mouse anti-human p53-TRITC.
- Mitochondria: Nonyl Acridine Orange (NAO).
- DNA: Hoechst 33342.



PRIMA-1 assay



Pifithrin-alpha assay



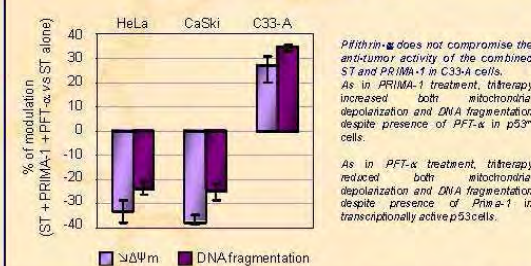
Conclusion

The protein p53 plays a major role in ST-induced apoptosis of cervical carcinoma-derived cell lines. Our findings show that:

- PRIMA-1 increases ST efficiency to induce apoptosis of cells harboring a p53^{mt} likely by refolding the protein and restoring its transcriptional activity;
- Pifithrin-   readily inhibits p53^{wt} transcriptional activity leading to apoptosis inhibition;
- In C33-A cells with a transcriptionally defective p53, Pifithrin-   does not interfere with the apoptotic activity of ST plus PRIMA-1.

Thus, in combination with anti-cancer therapies, PRIMA-1 could be effective to target tumors harboring a mutated p53. Moreover, we propose that the addition of Pifithrin-   might be very useful to prevent side effects of anti-tumor therapies on surrounding healthy tissues which harbor a transcriptionally active p53.

Tritherapy assay



Staurosporine induces apoptotic cell death of cervical carcinoma cells through Cytochrome c and AIF-dependent pathways



M. Nicolier, S. Launay, A.Z. Decrion-Barthod, J.L. Prétet, and C. Mougin

IFR 133, EA 3181, Carcinogénèse épithéliale, UFR SMP, 25000 Besançon, France. E mail: maqali.nicolier@univ-fcomte.fr

Introduction

In human papillomavirus (HPV)-associated carcinomas, the E6 viral protein promotes p53 degradation leading to cell cycle and apoptosis deregulation. However, we have observed that staurosporine (ST) can trigger death of cervix cancer-derived HeLa (HPV18+) and CaSki (HPV16+) cells with decreased E6 mRNA and increased expression of p53. Moreover, ST causes p53 and Bax translocation to mitochondria. These translocations occur before mitochondrial membrane depolarization, a decisive event of the intrinsic apoptotic pathway.

To characterize events in executive phase involved in the ST-induced apoptosis, mitochondrial pro-apoptotic proteins, cytochrome c and caspase-independent death effector Apoptosis-Inducing Factor (AIF), were studied by western blots on purified mitochondrial, cytosolic and nuclear fractions. To reinforce the implication of these 2 apoptotic factors in 2 molecular mechanisms during ST-induced apoptosis, caspase-dependent apoptosis and PARP-mediated cell death respectively, we investigated the effect of zVAD, a pan-caspase inhibitor, and 3-aminobenzamide, a PARP inhibitor, on ST-induced apoptosis of HeLa cells. We focused our study (i) on the modulation of cytochrome c and two characteristic apoptotic events: the mitochondrial membrane depolarization ($\Delta\Psi_m$) and DNA fragmentation (Sub-G1 DNA content) for caspase-dependent apoptosis and (ii) on the modulation of AIF expression and cleavage of mitochondrial PARP for PARP-mediated cell death.

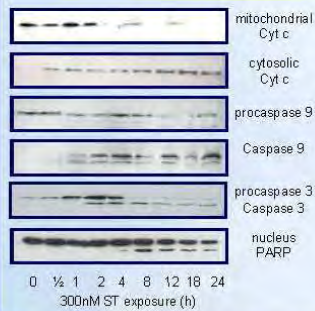
Experimental design

- Cell line and p53 status:**
- HeLa (derived from uterine cervix carcinoma): p53 wild-type.
- Cytometry (FACSscan Epics® Altra, Beckman Coulter):**
- $\Delta\Psi_m$: MitotrackerRed CMXRos (specific marker of mitochondrial $\Delta\Psi_m$).
 - DNA fragmentation: propidium iodide.
 - Analyses performed by expo-32 software.
- Western blotting:**
- Abs: cytochrome c 7H8 ; caspase 9 9502 ; caspase 3 9331; PARP 4C10.5 ; AIF E1.

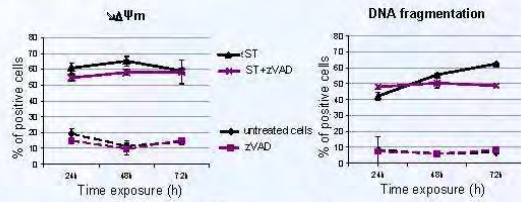
Treatment procedure



Caspase-dependent cell death

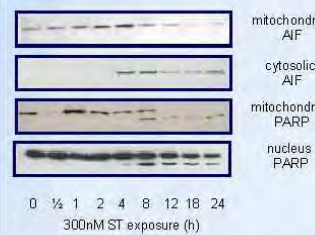


ST induces release of cytochrome c and activates caspase cascade.
In HeLa cells, western-blot analysis showed that the release of cytochrome c in the cytosol occurs after 30 min of ST-treatment. This release precedes cleavage of procaspase-9 followed by cleavage of procaspase-3 and finally cleavage of nucleus PARP.

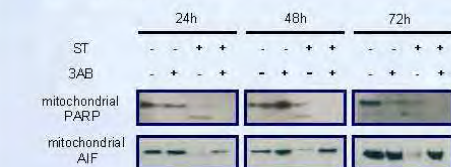


ST induces apoptosis of HeLa cells through a caspase-dependent pathway. Whether zVAD alone had no significant effect on HeLa cells, it efficiently reduced the ST-induced cleavage of procaspase-9 (24h) and DNA fragmentation (48h).

PARP-mediated cell death



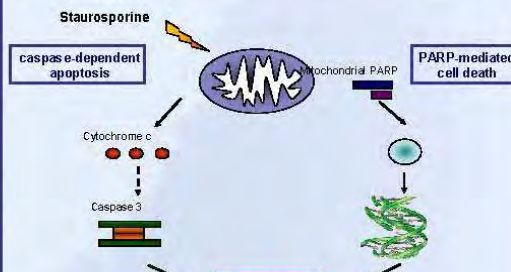
ST induces release of AIF.
In HeLa cells, western-blot analysis showed that unlike cytochrome c, the release of AIF in the cytosol occurs at 4h post-exposure. This release is concomitant with cleavage of mitochondrial PARP.



ST induces apoptosis of HeLa cells through a PARP-mediated cell death.
In HeLa cells, western blots on subcellular fractions showed that 3AB, a PARP inhibitor, had no effect on expression of PARP and AIF. In contrast, under ST, 3AB inhibited mitochondrial PARP expression and abrogated the release of AIF in the cytosol.

Conclusion

Our findings suggest that staurosporine orchestrate apoptotic cell death of cervical carcinoma cells by two overlapping molecular mechanisms which imply mitochondria:



These results open new fields from therapeutic intervention of cervical cancer.

Financial supports by « La Ligue Contre le Cancer, comité du Doubs », Ville de Besançon (grant) and Région de Franche-Comté

Cervical carcinoma cells display apoptosis under staurosporine exposure through caspase-dependent and caspase-independent pathways

M.Nicolier, A.Z.Decrion-Barthod, J.L.Prézet, and C.Mouglin

EA 3181, Carcinogénèse épithéliale, IFR 133, UFR SMP, 25000 Besançon, France. E.mail: magali.nicolier@univ-fcomte.fr

Introduction

In many human cancers, inactivation of p53 functions by mutation or by viral oncoproteins such as E6 from high risk human papillomavirus (HPV) is a common event. However, we have observed that staurosporine (ST), a broad spectrum protein kinase inhibitor, can induce apoptosis of cervix cancer-derived HeLa cells (HPV18+, p53^{wt}), as well as C33A cells (HPV-, p53^{mt}). ST causes p53 (wild-type or mutated) and Bax translocation to mitochondria and dissipation of mitochondrial membrane potential, a decisive event in the intrinsic pathway. To further characterize pathways involved in ST-induced apoptosis, mitochondrial pro-apoptotic proteins, cytochrome c (Cyt c) and Apoptosis-Inducing Factor (AIF), were studied by western blots on purified mitochondrial, cytosolic and nuclear fractions. To confirm the implication of these two apoptotic factors in different molecular mechanisms during ST-induced apoptosis, caspase-dependent apoptosis and PARP-mediated apoptosis respectively, we investigated the effect of zVAD, a pan-caspase inhibitor, and 3-aminobenzamide, a PARP inhibitor, on ST-induced apoptosis of HeLa and C33A cells.

Experimental design

Cell lines and treatments:

- HeLa: derived from uterine cervix-carcinoma, HPV18, p53 wild-type
- C33A: derived from uterine cervix-carcinoma, HPV-, p53 mutated (DBD)
- Apoptosis induction: 300 nM Staurosporine (ST)
- Caspase inhibition: 50 μM zVAD
- PARP inhibition: 10mM 3-Aminobenzamide (3AB)

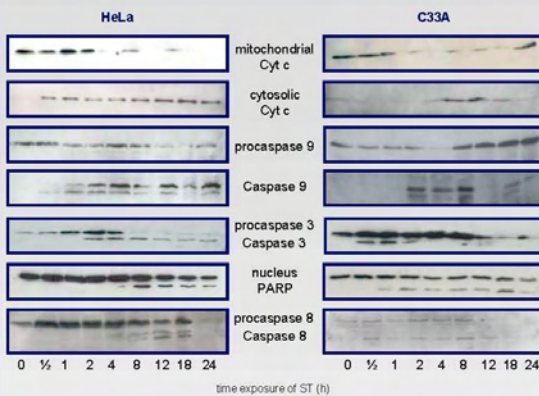
Cytometry (FACScan Epics® Altra, Beckman Coulter):

- ΔΨ_m (mitochondrial membrane potential): MitotrackerRed CMXRos.
- DNA fragmentation: propidium iodide.
- Analyses performed by expo-32 software.

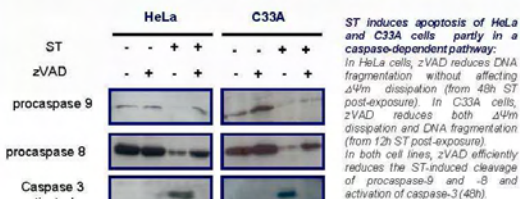
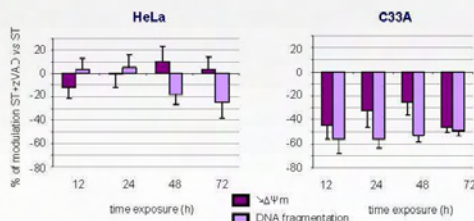
Western blotting:

- Abs: cytochrome c 7H8 ; caspase 9 9502 ; caspase 3 9331, caspase 8 3-1-3; AIF E1 ; PARP 4C10.5 .

Caspase-dependent apoptosis

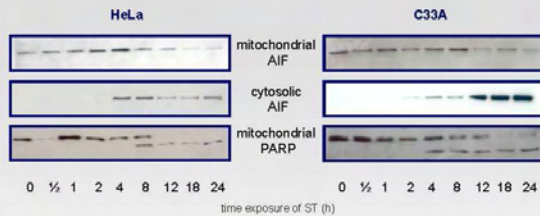


After ST-treatment of HeLa cells, the cytochrome c is released before the caspase-9 and -3 activation. In C33A cells, the caspase-8 activation occurs before cytochrome c release. In HeLa cells, western-blot analyses show that the release of Cyt c in the cytosol occurs after 30 min of ST-treatment. This release precedes cleavage of procaspase-9 followed by cleavage of procaspase-3 and finally cleavage of nucleus PARP. In C33A cells, cleavage of procaspase-8 occurs before the cleavage of procaspase-3 and nucleus PARP. The release of Cyt c is delayed.

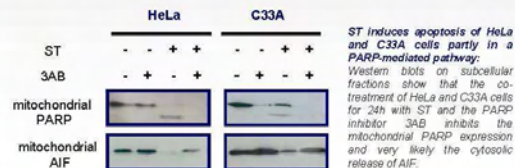


ST induces apoptosis of HeLa and C33A cells partly in a caspase-dependent pathway: In HeLa cells, zVAD reduces DNA fragmentation without affecting ΔΨ_m dissipation (from 48h ST post-exposure). In C33A cells, zVAD reduces both ΔΨ_m dissipation and DNA fragmentation (from 12h ST post-exposure). In both cell lines, zVAD efficiently reduces the ST-induced cleavage of procaspase-9 and -8 and activation of caspase-3 (48h).

PARP-mediated apoptosis



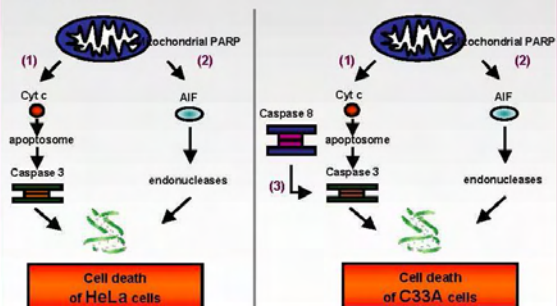
AIF is released in the cytosol of HeLa and C33A cells during ST-induced apoptosis: In HeLa cells, western-blot analyses show that unlike the Cyt c, the AIF release is delayed (occurring 4h ST post-exposure). In C33A cells, AIF release appears to be concomitant with that of Cyt c. Moreover, in both cell lines, AIF release is concomitant with mitochondrial PARP cleavage.



ST induces apoptosis of HeLa and C33A cells partly in a PARP-mediated pathway: Western blots on subcellular fractions show that the co-treatment of HeLa and C33A cells for 24h with ST and the PARP inhibitor 3AB inhibits the mitochondrial PARP expression and very likely the cytosolic release of AIF.

Conclusion

Our results suggest that staurosporine induces apoptotic cell death of cervical carcinoma cells by two overlapping molecular mechanisms implying intrinsic pathway: the caspase-dependent apoptosis (1) and the caspase-independent PARP-mediated apoptosis (2). Moreover, an extrinsic pathway via activation of caspase-3 by caspase-8 (3) might be implicated in ST-induced apoptosis of C33A cells.



These results open new fields for therapeutic intervention of cervical cancer.

Financial supports by « La Ligue Contre le Cancer, comité du Doubs », Cancéropôle Grand-Est, Ville de Besançon (grant)