

Mag - 576.88 - 04 / 03

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD - TLEMCEM

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mag
138/03

Mémoire pour l'obtention du Diplôme

De

MAGISTER DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

ETUDE DE L'INDUCTION DE L'APOPTOSE ET DE SES
MECANISMES SUR LA LIGNEE HT29 PAR LE
TRAITEMENT A LA CAMPTOTHECINE ET
L'HOMOCAMPTOTHECINE

Présenté par : Nabiha BENYAMINA DOUMA

Le : 07 novembre 2007

Composition du jury :

Président :	Pr. Fouzia ATIK (Département de Biologie- Tlemcen)
Examineurs :	Pr. Mohamed BENYOUCEF (Département de Biologie- Tlemcen)
	Pr. Hafida MERZOUK (Département de Biologie- Tlemcen)
	Dr. Lamia BOUBLENSA (Département de Biologie- Tlemcen)
Encadreur:	Pr. Chantal TRENTESAUX (Faculté de Pharmacie – Reims – France)
Co-encadreur:	Pr. Rabah BAKOUR (Département de Biologie – USTHB – Alger)

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD - TLEMCCEN

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire pour l'obtention du Diplôme

De

MAGISTER DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

**ETUDE DE L'INDUCTION DE L'APOPTOSE ET DE SES
MECANISMES SUR LA LIGNEE HT29 PAR LE
TRAITEMENT DE LA CAMPTOTHECINE ET DE
L'HOMOCAMPTOTHECINE**

Présenté par : Nabiha BENYAMINA DOUMA

Composition du jury :

Président : Pr. Fouzia ATIK (Département de Biologie- Tlemccen)
Examineurs : Pr. Mohamed BENYOUCEF (Département de Biologie- Tlemccen)
Pr. Hafida MERZOUK (Département de Biologie- Tlemccen)
Dr. Lamia BOUBLENSA (Département de Biologie- Tlemccen)
Encadreur: Pr. Chantal TRENTESAUX (Faculté de Pharmacie – Reims – France)
Co-encadreur: Pr. Rabah BAKOUR (Département de Biologie – USTHB – Alger)

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité JE2428, d'Oncopharmacologie, à la Faculté de Pharmacie à l'Université de Reims (France).

*Je tiens à remercier très sincèrement le Professeur **ATIK** Fouzia qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury.*

*Un grand merci également aux personnes de ce jury qui ont accepté d'évaluer mon travail : le Professeur Hafeda **MERZOUK**, le Professeur Mohamed **BENYOUCEF** et le Docteur Lamia **BOUBLENZA** en qualité d'examineurs.*

*J'exprime ma profonde gratitude aux Professeurs Chantal **TRENTESAUX** et Rabah **BAKOUR** qui durant ce travail sont restés à mon écoute, me conseillant sur la meilleure marche à suivre dans l'avancée de mes travaux et me faisant partager leur connaissances.*

*Un grand merci pour le Docteur Hamid **MORJANI** pour ses conseils et son dévouement.*

*Comment ne pas exprimer ma grande gratitude au Docteur Denis **GOMEZ** pour ses conseils pertinents et sa grande disponibilité.*

*Un grand merci et bravo pour le Docteur Marie Thérèse **DIMANCHE-BOITREL** pour sa fructueuse et étroite collaboration.*

*J'aimerais aussi dire merci aux étudiants pour leur bonne humeur, leur soutien et leurs discussions enrichissantes, notamment Houria **MECHICHE**, Nassera **AOUALI**, David **CHAUVIER**, Lahcen **EDDABRA**, Nassima **TEMIME**, Loubna **ALOUANE** et Céline **DOUARI**.*

*Bien sûr, je n'oublie pas l'ensemble du personnel du laboratoire notamment Madame Denise **PIZANI** pour sa gentillesse et les conseils qu'elle m'a donnés.*

A toute ma famille

A Leila et Hafida et leurs petites familles

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	4
I- CANCER ET APOPTOSE	5
II- L'APOPTOSE:	7
II-1. Généralités	7
II-2. Caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose et de la nécrose	8
II-3. L'apoptose est un phénomène conservé au cours de l'évolution	10
II-4. Mécanisme et aspect moléculaire de l'apoptose	12
II-4-1. La phase d'initiation	12
II-4-2. La phase de décision	12
II-4-3. La phase de dégradation	13
II-5-2. Les effecteurs centraux de l'apoptose	14
II-5-2-1. La voie des récepteurs membranaires	14
II-5-2. La mitochondrie: rôle central dans l'apoptose induite par les agents anti-cancéreux	17
II-5-2-1. Structure et physiologie de la mitochondrie	17
II-5-2-1-1. La phosphorylation oxydative	20
II-5-2-1-2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	22
II-5-2-1-3. Le pore de transition de perméabilité	23
II-5-2-2. Rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire Programmée	24
II-5-2-3. La transition de perméabilité mitochondriale	25
II-5-2-4. Le relargage de facteurs apoptogènes	25
II-5-3. La famille des Bcl-2	26
II-5-3-1. Les oncogènes et les oncoprotéines	26
II-5-3-2. Rôle des membres de la famille Bcl-2 dans la régulation du processus apoptotique	29
II-5-4. Les caspases	32
II-5-4-1. Structure des caspases	32

IV-	DETERMINATION DE LA FRACTION DES CELLULES APOPTOTIQUES	-----52
V-	BIOLOGIE MOLECULAIRE	-----53
V-1.	Etude de l'expression des gènes pro et anti-apoptotiques	-----53
V-1.1.	Extraction des ARNs totaux	-----55
V-1.2.	Dosage des ARNs totaux et vérification de leur intégrité	-----55
V-1.3.	Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)	-----56
V-1-3-1.	Synthèse des ADNc par la Reverse Transcriptase	-----56
V-1-3-2.	Amplification des ADNc par PCR (Réaction de Polymérisation en chaîne)	-----57
V-1-3-3.	Contrôle des résultats obtenus à partir de la RT-PCR des gènes pro et anti-apoptotiques (caspase-3, Bax, Bcl _{xL} et GAPDH)	-----58
V-1-3-4.	Amorces des gènes pro et anti-apoptotiques utilisés	-----58
V-1.4.	Analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose	-----60
V-2.	Analyse des protéines pro et anti-apoptotiques par immuno-empreinte (Western Blot)	-----61
	RESULTATS ET INTERPRETATIONS	-----66
	DISCUSSION	-----84
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	-----88
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	-----90

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Différences morphologiques entre la nécrose et l'apoptose.....	8
Figure 2:	Modélisation du signal initial de l'activation de la voie Fas	15
Figure 3 :	Voies d'activation de Fas dans les cellules de type I ou de type II.....	16
Figure 4:	La mitochondrie : réservoir et site d'une activité métabolique intense.....	19
Figure 5:	Synthèse de l'ATP par la chaîne respiratoire.....	20
Figure 6 :	Représentation schématique du PTP.....	24
Figure 7 :	Représentation schématique des membres de la famille Bcl-2.....	28
Figure 8:	D'une proenzyme à une caspase active.....	33
Figure 9:	Activation de la caspase-8 par le récepteur de Fas.....	34
Figure 10:	La camptothécine et son sel de sodium.....	38
Figure 11:	Structure de la camptothécine (1), de sa forme carboxylate (2), du topotecan (3), de l'irinotecan (4), et de l'homocamptothécine « BN80765 » (5).....	39
Figure 12:	Relation structure- activité.....	41
Figure 13 :	Structure de la camptothécine et de l'homocamptothécine.....	48
Figure 14:	Principe général de la RT-PCR	54
Figure 15:	A/ Profils d'expression du gène Caspase-3 dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1µM de CPT (C) ou de hCPT (H) ont été déterminés par RT-PCR. B/ Quantification : les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.....	68
Figure 16:	A/ Profils d'expression du gène Bax déterminés par RT-PCR dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1µM de CPT (C) ou de hCPT (H) ont été déterminés par RT-PCR. B/ Quantification : les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.....	69
Figure 17:	A/ Profils d'expression du gène Bcl-x_L dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1µM de CPT (C) ou hCPT (H) ont été déterminés	

par RT-PCR. B/ Quantification : les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.....70

Figure 18: Bilan récapitulatif de l'expression des gènes pro et anti-apoptotiques après traitement avec la CPT et la hCPT. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées.....71

Figure 19: A/ Profils d'expression de **la protéine caspase-3** dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1µM de CPT (C) ou hCPT (H). Les protéines totales sont analysées par Western Blot et la caspase-3 activée est révélée par un anticorps monoclonal qui reconnaît la forme pro et la forme clivée active. B/ Quantification : les résultats donnent le taux de **la caspase-3 active (20Kd)** et sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.....73

Figure 20: A/ Profils d'expression de **la protéine Bax** dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1µM de CPT (C) ou hCPT (H). Les protéines totales sont analysées par Western Blot et la protéine Bax est révélée par un anticorps monoclonal. B/ Quantification : les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.....74

Figure 21: A/ Profils d'expression de **la protéine Bcl-x_L** dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1µM de CPT (C) ou hCPT (H). Les protéines totales sont analysées par Western Blot et la protéine Bcl-x_L est révélée par un anticorps monoclonal. B/ Quantification : les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.....75

Figure 22: Induction de l'apoptose par la CPT dans les cellules HT29, HT29-Bcl2 et HT29-Vecteur. Le milieu est changé au terme de 5 heures d'incubation avec 1 µM de CPT. L'apoptose est déterminée après 1, 2, 3 et 4 jours de la fin du traitement.....77

Figure 23: Cytotoxicité de la CPT et de HA14-1 sur les cellules HT29-Vec.....79

Figure 24: Cytotoxicité de la CPT et de HA14-1 dans les cellules HT29-Bcl2.....79

- Figure 25:** Induction de l'apoptose par la CPT et le ligand de Bcl-2 (HA14-1) dans les cellules HT29-Vecteur et HT29-Bcl2. Le milieu est changé au terme de 48 heures d'incubation avec 1 μ M de CPT et/ou 10 μ M de HA14-1. L'apoptose est déterminée à 72 heures depuis le début de Traitement.....80
- Figure 26:** Profils d'expression des protéines HSC70 et caspase-8 dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1 μ M de CPT (C) ont été déterminés par Western Blot83
- Figure 27** : Profils d'expression de la protéine Bid dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1 μ M de CPT (C) ont été déterminés par Western Blot83
- Figure 28:** Profils d'expression de la protéine caspase-3 dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1 μ M de CPT (C) ont été déterminés par Western Blot83

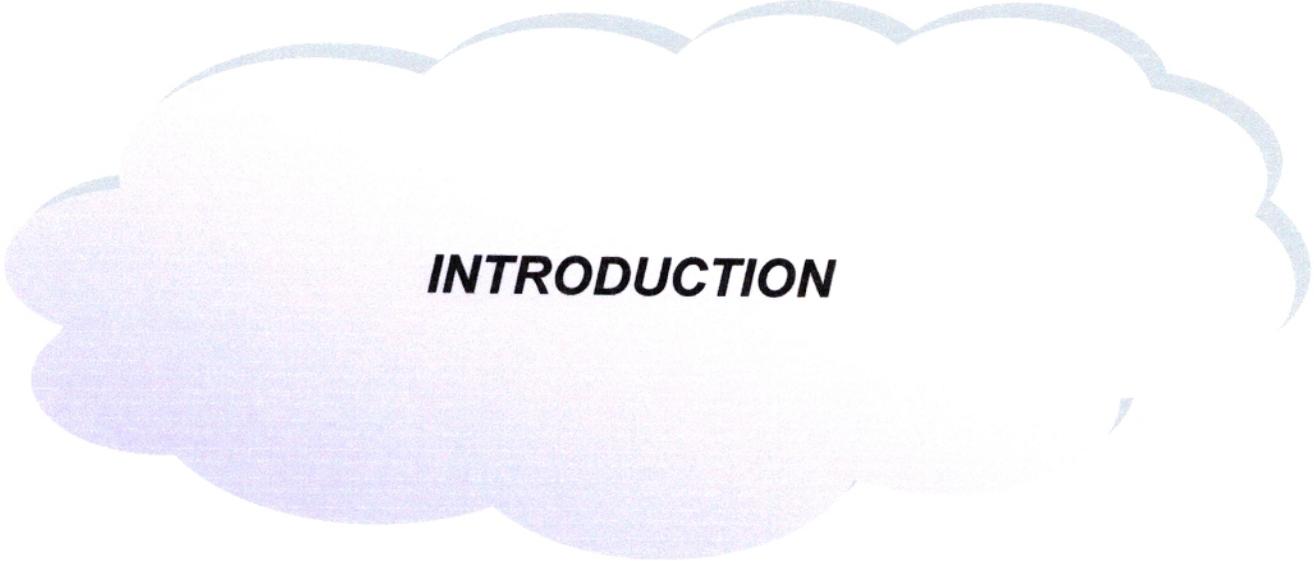
LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	principales anomalies réglant la mort cellulaire dans les tumeurs humaines	6
Tableau 2:	Fonctions des protéines impliquées dans l'apoptose.....	11
Tableau 3 :	Séquences des amorces des gènes pro et anti-apoptotiques et conditions d'utilisation.....	59
Tableau 4:	Protocole d'immunoempreinte.....	65

Liste des Abréviations

$\Delta\psi_{mt}$: potentiel transmembranaire mitochondrial
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	: Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire
AIF	: Apoptosis Inducing Factor
ANT	: Adenin Nucleotide Translocator
ARN	: Acide RiboNucléique
ATP	: Adenosine TriPhosphate
BAR	: Bifunctional Apoptosis Regulator
BET	: Bromure d'éthidium
BH	: Bcl-2 Homology domain
BIR	: Baculoviral IAP Domain
CARD	: Caspase Recruitment Domain
Caspase	: CysteinyI aspartate- specific proteinase
CAT	: Chloramphénicol Acétyle Transférase
CK	: Créatine Kinase
CPT	: Camptothécine
CPT-11	: Irinotécan
CrmA	: Cytokine Response Modifier A
CycD	: Cyclophiline D
Cyt-c	: Cytochrome c
Da	: Dalton
DD	: Death Domain
DED	: Death Effector Domain
DEPC	: Di Ethyl Pyro Carbonate
DFF-40	: DNA Fragmentation Factor- 40 (= Nuc18)
DMEM	: Dubellco Medium Eagle's Modified
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DO	: Densité Optique
DTT	: Dithiothréitol
EDTA	: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
FAD	: Flavine Adenine Dinucleotide

FADD	: Fas Associated Death Domain
GAPDH	: Glyceraldehydes-3 Phosphate Déshydrogénase
hCPT	: Homocamptothécine
HK	: Hexokinase
HAS	: Serum albumine humaine
IAP	: Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE	: Interleukin-1 β Converting Enzyme
IC_x	: Concentration induisant x% d'inhibition de croissance
IL-1, 8	: Interleukine-1, 8
IP	: Iodure de Propidium
ME	: Membrane externe mitochondriale
MI	: Membrane interne mitochondriale
NADH	: 3-Nicotinamide Adenine Dinucléotide
NAD(P)H	: 3-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NGF	: Nerve Growth Factor
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PARP	: Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBR	: Peripheral Benzodiazepine Receptor
PCR	: Réaction de Polymérisation en Chaîne
PEG	: Polyéthylène Glycol
PMM	: Perméabilité de la Membrane Mitochondriale
PT	: Transition de Perméabilité
PTP	: Pore de Transition de Perméabilité
QSP	: Quantité Suffisante Pour
ROS	: Reactive Oxygen Species
RT	: Transcription Inverse
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
Smac	: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SVF	: Sérum Foetal de Veau
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TNF-RI	: Tumor Necrosis Factor Receptor I
u.a.	: unité arbitraire
UV	: Ultraviolet
VDAC	: Voltage Dependent Anion Channel



INTRODUCTION

Introduction

Le cancer est une maladie des gènes dans laquelle il existe un déséquilibre entre les systèmes biochimiques qui régulent la prolifération et la mort cellulaire.

Pendant longtemps les biologistes cellulaires ont pensé que l'action toxique de certains agents anti-cancéreux était la raison directe de la mort cellulaire et que la détermination de la nature des dommages permettrait de comprendre pourquoi les cellules meurent. Cette vue est généralement inexacte. Le dommage n'est pas la cause de la mort : de nombreux signaux peuvent induire la mort avant tout dommage à la cellule. L'élucidation de ces signaux et leurs mécanismes ouvrira de nouvelles stratégies dans la recherche anticancéreuse. Cette démarche est différente de celle préconisée pour l'étude de la cytotoxicité.

Plusieurs stratégies curatives sont adoptées pour le traitement des cancers. Les actes chirurgicaux, la radiothérapie et enfin la chimiothérapie qui peut être utilisée contre des tumeurs localisées ou des métastases, elle peut être aussi appliquée comme traitement adjuvant à une radiothérapie ou à une exérèse.

La camptothécine (CPT) est un alcaloïde végétal découvert en 1966 par M. Wall. Mais ce n'est qu'en 1985 que cette molécule prit un grand intérêt avec la mise en évidence de son activité inhibitrice de la topoisomérase I (Hsiang et coll., 1985).

Les topoisomérases sont des enzymes ubiquitaires qui agissent comme un véritable « garde barrière du génome » (Pommier et coll., 1994). L'inhibition de l'une d'entre elles, la topoisomérase I, peut causer des dégâts dans le génome pouvant être irréversibles. Le stress génique induit par la CPT en bloquant la topoisomérase I (Hsiang et coll., 1985 ; Hertzberg et coll., 1989) entraîne la mise en place d'un processus complexe de mort cellulaire appelé apoptose. La découverte de son activité anti-topoisomérase I et son implication antitumorale a été le déclencheur du développement d'un grand nombre d'analogues de ce composé. Actuellement les camptothécines sont les seuls inhibiteurs de topoisomérase I utilisés en clinique (le topotécan ou CPT-11 [Hycamptin[®]] et l'irinotacan [Campto[®]]).

L'homocamptothécine (hCPT) est un analogue structural de la CPT synthétisé à l'institut Henri Beaufour (Les Ulis, France) (Lavergne et coll., 1997). Cette molécule est en cours d'évaluation pour l'étude de ses caractéristiques et propriétés anti-tumorales, ainsi que ses mécanismes d'action au sein des cellules malignes.

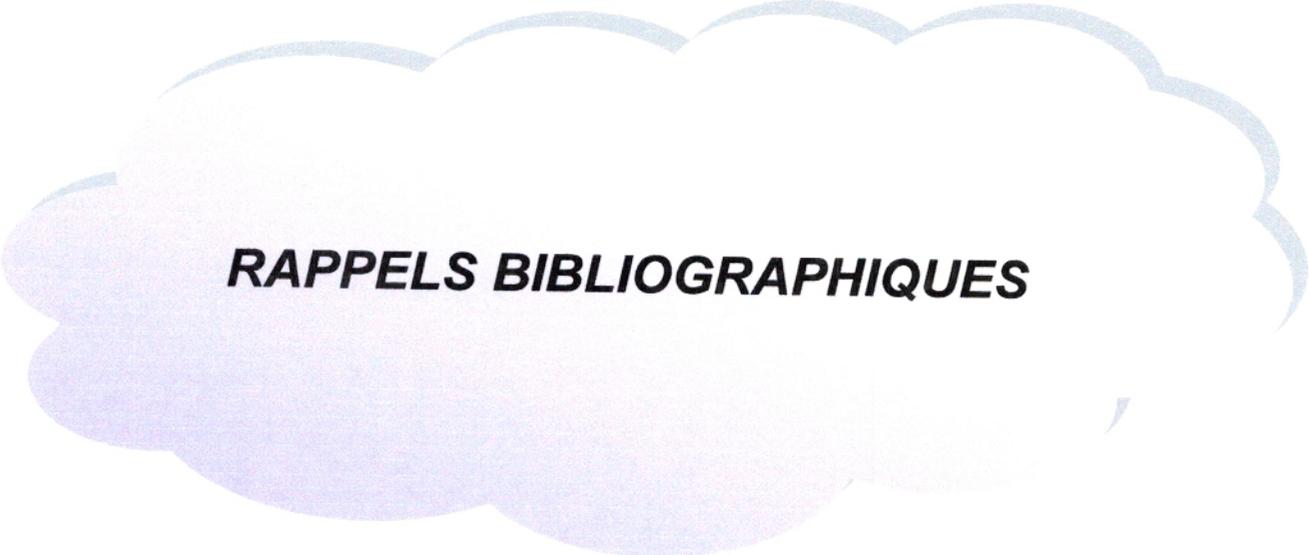
Introduction

Dans un premier temps, l'objectif de ce travail repose sur l'étude de l'expression des gènes pro et anti-apoptotiques durant le mécanisme d'apoptose induite par la CPT et la hCPT. Ces gènes interviennent durant la phase d'initiation de l'apoptose, notamment les gènes Bax et Bcl-x_L. Aussi l'étude de l'expression du gène intervenant durant la phase terminale de l'apoptose (la phase de dégradation), le gène de la caspase-3. La RT-PCR est la technique utilisée pour cette étude. Le profil d'expression des trois protéines (Caspase-3, Bax et Bcl-x_L) est déterminé par Western Blot. **Durant ce travail, nous nous sommes attachés à vérifier si l'expression des gènes et des protéines pro et anti-apoptotiques marque une quelconque différence entre la CPT et la hCPT.**

Le modèle cellulaire choisi est représenté par les cellules du cancer colorectal humain, les HT-29. Ce choix est basé sur le fait que les CPTs sont particulièrement cytotoxiques et de puissants inducteurs d'apoptose à l'encontre des cancers colorectaux, notamment les cellules HT-29 (Chauvier et coll., 2002).

Dans une seconde approche, nous avons étudié l'effet protecteur du gène Bcl-2 dans l'apoptose induite par la CPT. Ce gène n'est pas exprimé dans les cellules HT-29. Cette étude a été entreprise en utilisant un modèle de cellules HT-29 transfectées par le gène Bcl-2 et qui le surexpriment.

Enfin, nous avons essayé de déterminer quelle voie cellulaire était impliquée dans l'induction de l'apoptose par la CPT, et en particulier déterminer si la voie Fas était partie prenante du processus apoptotique.



RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Rappels bibliographiques

I- CANCER ET APOPTOSE:

Au cours de la vie, la prolifération cellulaire est un processus hautement régulé qui intervient aux différents stades de développement de l'individu et participe au maintien de l'équilibre, de la croissance, de la différenciation et de l'apoptose. Cette multiplication cellulaire est soumise à de nombreux contrôles. Cependant, il arrive que certaines cellules échappent aux systèmes de régulation et elles vont alors croître, se diviser et transmettre à leur descendance leur capacité de proliférer indépendamment des systèmes de régulation. Les tumeurs formées par ces clones pourront infiltrer des territoires de l'organisme qui ne sont pas les leurs et y avoir des effets dévastateurs. **Le cancer est donc une maladie des gènes dans laquelle il existe un déséquilibre entre les systèmes biochimiques qui régulent la prolifération et la mort cellulaire (apoptose).** Vu l'importance de la mort cellulaire, l'étude de ce processus a constitué l'un des principaux axes de recherche dans la lutte anticancéreuse de ces dernières années. La modulation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses présente un très grand intérêt dans la lutte contre le cancer (Meng et coll., 2006).

Des mutations dans les cellules somatiques engendrent le développement de tumeurs. Ces cellules somatiques transformées acquièrent une résistance à l'apoptose qui contribue à leur survie et au développement d'une tumeur agressive qui métastase et résiste aux agents cytotoxiques. Les protéines dont l'expression anormale induit la résistance à l'apoptose ont des fonctions variées : détection des dommages cellulaires comme la protéine p53 (Gervais et coll., 2002), contrôle de la phase mitochondriale de l'apoptose comme Bcl-2 (Jones et coll., 2001) ou Bax (Vousden et coll., 2000 ; Rampino et coll., 1997), ou post-mitochondriale comme la molécule adaptatrice Apaf-1 (Shin et coll., 2001).

Ce dérèglement peut être la conséquence de mutations géniques, de translocations chromosomiques ou de modifications épigénétiques (méthylation du promoteur). *Le tableau 1* résume les principales anomalies réglant l'apoptose dans les tumeurs humaines.

Rappels bibliographiques

Anomalies	Principales tumeurs	Références
Mutation p53 Bax Bak Fas (CD95) DR4, DR5	50% des tumeurs solides Cancers colorectaux MSI+, hémopathies Cancers gastriques ou colorectaux Hémopathies malignes, Cancers du sein métastatiques	(Gervais et coll., 2002) (Vousden et coll., 2000 ; Rampion et coll., 1997) (Molenaar et coll., 1998) (Uren et coll., 2000) (Zhang et coll., 1999)
Translocation chromosomique t(14 ; 18)(q32;q21)-Bcl-2 t(11 ; 18)(q21 ;q21) – IAP2-MLT1 t(1 ;14)(q2 ;q32) – Bcl-10	Lymphomes folliculaires Lymphomes du MALT Lymphomes du MALT	(Jones et coll., 2001) (Cory et coll., 1999) (Garrido et coll., 1998)
Méthylation du promoteur Caspase-8 Apaf-1 TMS1	Neuroblastomes Mélanomes métastatiques Cancers du sein	(Liu et coll., 2001) (Shin et coll., 2001) (Soengas et coll., 2001)

Tableau 1: principales anomalies réglant la mort cellulaire dans les tumeurs humaines
 (Solary et coll., 2002).

Rappels bibliographiques

II- L'APOPTOSE :

En janvier 2006, environ 110000 articles traitant de l'apoptose (dans le cancer, le vieillissement, les maladies cardio-vasculaires, les maladies neuromusculaires, le développement embryonnaire, ...) étaient recensés.

Ces rappels ne prétendent pas couvrir tous les aspects de l'apoptose, mais plutôt donner une vue d'ensemble des mécanismes apoptotiques.

II- 1. Généralités :

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée est un processus de mort cellulaire hautement régulé qui joue un rôle important dans l'homéostasie d'un tissu. Elle est aussi une réponse hautement conservée des eucaryotes unicellulaires aux mammifères. Elle fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme. Ainsi au cours de nombreuses mitoses et différenciations cellulaires qui permettront de créer un organisme à partir d'une cellule œuf, il est nécessaire d'éliminer les cellules âgées, superflues ou potentiellement dangereuses. Ce phénomène d'élimination sélective ou suicide programmé participant à la formation des membres, des reins, du tube digestif, du système nerveux, du système immunitaire est médié par un processus hautement complexe appelé APOPTOSE (le nom apoptose fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne ; **apo** pour éloignement et **ptose** pour chute). La dérégulation du processus d'apoptose peut être à l'origine de nombreuses pathologies. Une résistance à l'apoptose au cours de l'embryogenèse provoque des malformations. Après la vie fœtale et pendant toute la vie adulte cette résistance à l'apoptose provoque des maladies auto-immunes et des cancers.

Au contraire une apoptose accrue est à l'origine des maladies neurodégénératives et neuromusculaires. La diminution des lymphocytes T CD4 par apoptose favorise l'affaiblissement du système immunitaire des patients atteints du SIDA (Thompson et coll., 1995 ; Ameisen, 1996).

Il a été observé une réponse de type apoptotique lors du traitement de nombreuses lignées cancéreuses en culture par divers agents anticancéreux. La contribution de l'apoptose en chimiothérapie clinique dans le mécanisme cytotoxique des médicaments anti-cancéreux est encore actuellement difficile à évaluer.

Rappels bibliographiques

II-2. Caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose et de la nécrose :

La notion d'apoptose a été introduite par Kerr en 1972 pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant du point de vue morphologique que biochimique. La nécrose était la seule forme de mort cellulaire connue à cette époque (Kerr et coll., 1972 ; Kerr et coll., 1994). Les deux phénomènes sont comparés dans une représentation schématique en *figure 1* (Kerr et coll., 1994).

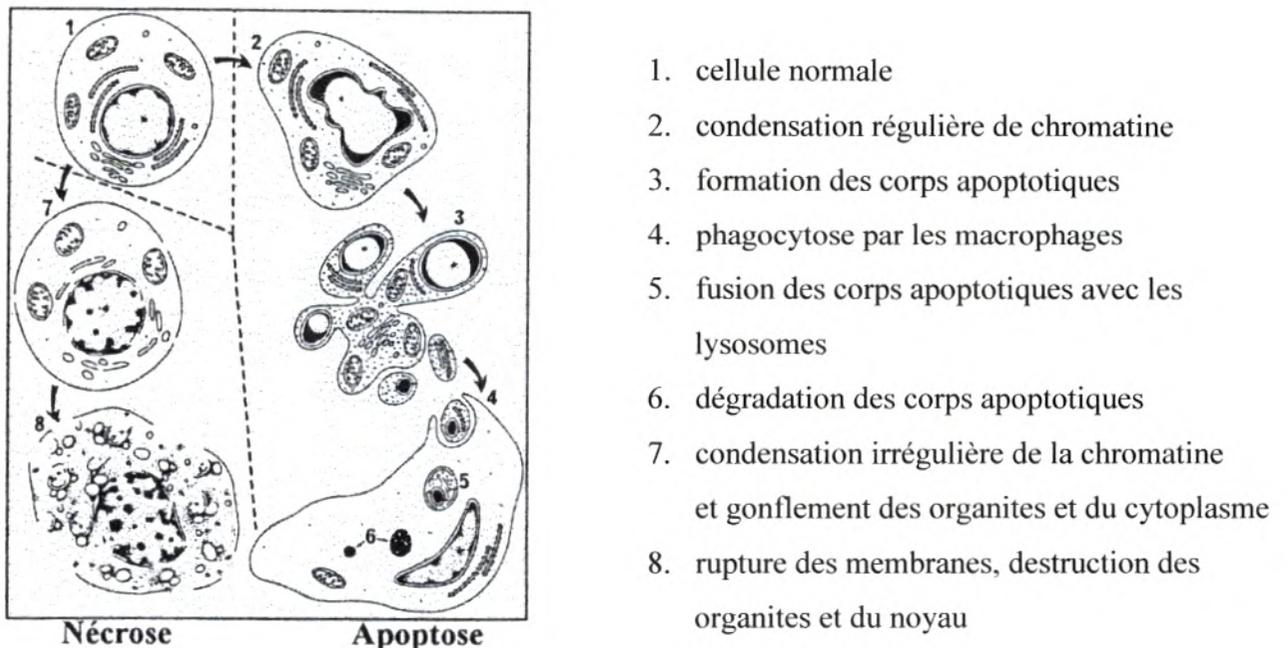


Figure 1: Différences morphologiques entre la nécrose et l'apoptose (Kerr et coll. 1972).

La **nécrose** est considérée comme la mort cellulaire « désordonnée ». En effet, sur le plan morphologique au cours de la nécrose les cellules vont se gorger d'eau au point que cela va entraîner la lyse de leur membrane plasmique. Cette véritable explosion cellulaire conduit au relargage dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique. Les organelles vont aussi avoir tendance à gonfler. L'ADN va être dégradé de manière « aléatoire » (Bicknel et Cohen, 1995 ; Dong et coll., 1997) par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong et coll., 1997).

Rappels bibliographiques

Par opposition à la **nécrose**, l'**apoptose** est considérée comme un phénomène « ordonné » se déroulant sur différentes phases (Kerr et coll., 1972). Les cellules commencent à se détacher des autres cellules (perte de contacts entre les cellules). Ensuite les cellules subissent de nombreux changements morphologiques caractéristiques, mais l'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée, ce qui permet d'éviter le déversement du contenu cellulaire et prévenir ainsi tout dommage infligé aux tissus avoisinants. On observe tout d'abord la condensation du noyau et la réduction du volume cytoplasmique, ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire. A son tour la mitochondrie va subir plusieurs modifications majeures : augmentation de la perméabilité membranaire, la diminution du potentiel membranaire ($\Delta\psi_{mt}$) et le relargage des protéines de l'espace inter-mitochondrial dans le cytoplasme (cytochrome c, AIF) (Yang et coll., 1997, Petit et coll., 1998 ; Kroemer et coll., 1998). Le noyau se condense (pyknosis), puis la chromatine est clivée par des endonucléases en fragments réguliers (karyorrhexis) d'environ 180 pb (Wyllie et coll., 1984). La membrane plasmique perd son asymétrie, bourgeonne et conduit à la formation des corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement notamment grâce au changement de l'orientation des molécules de phosphatidylsérines qui deviennent extracellulaires. Les corps apoptotiques sont ensuite éliminés par les cellules voisines, éliminant ainsi toute trace dans le tissu où se déroule l'apoptose. Notons aussi que l'inflammation n'est pas totalement absente (en raison du relargage de l'IL-1 et IL-8), mais il s'agit ici d'une inflammation régulée, contrairement à la nécrose où l'inflammation est très importante et résulte du relargage du contenu cellulaire dans le tissu environnant.

La mort cellulaire programmée est un processus rapide (quelques heures), dépendant de la présence d'énergie. Cependant certains événements apoptotiques, comme la fragmentation de l'ADN, ne nécessite pas un apport d'énergie, contrairement à la condensation nucléaire par exemple (Kass et coll., 1996).

Au point de vue biochimique l'apoptose est caractérisée par des altérations biochimiques majeures: parmi ces altérations on peut noter l'externalisation des

Rappels bibliographiques

phosphatidylsérines membranaires, la condensation de la chromatine, la dégradation spécifique de l'ADN (en fragments de hauts poids moléculaires et / ou en fragments nucléotidiques) et la dégradation sélective de certaines protéines cellulaires.

On peut aussi observer une perte des fonctions mitochondriales, la libération de marqueurs proapoptotiques mitochondriaux tels que le cytochrome c ou l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et enfin l'activation des caspases et la protéolyse sélective de certaines protéines cellulaires comme par exemple: le clivage de la protéine PARP (Nicholson 1999; Susin et coll., 1998).

La régulation de l'apoptose se révèle très complexe, et la dérégulation de ce processus peut être à l'origine de nombreuses pathologies dont le cancer. On a longtemps pensé que la transformation cancéreuse d'une cellule résultait uniquement de l'expression de gènes déclenchant une multiplication accrue. Les stratégies anti-cancéreuses ont eu comme but d'interférer avec ces mécanismes de prolifération. Actuellement il a été prouvé que le blocage anormal des programmes de mort cellulaire participe aussi bien à la génération des tumeurs ainsi qu'à leur dissémination ou à leur résistance aux agents pharmacologiques (Frankfurt et coll., 1994).

II-3. L'apoptose est un phénomène conservé au cours de l'évolution

Des études récentes ont révélé que les familles de protéines régulant l'apoptose chez les mammifères présentent des homologies avec celles identifiées chez le nématode *Caenorhabditis elegans* ce qui suggère que certains de ces mécanismes fondamentaux sont conservés au cours de l'évolution (*tableau 2*).

Chez les mammifères la multiplicité des gènes impliqués dans l'apoptose augmente le niveau de complexité des mécanismes de régulation.

Rappels bibliographiques

C.elegans	Mammifères	Fonctions
Ced-3	Famille des protéases à cystéine ou caspases (14 membres)	Initiation et exécution de l'apoptose
Ced-4	Apaf-1, FADD	<ul style="list-style-type: none"> - Ced-4: interagit avec Ced-3 et permet l'activation de Ced-3 et l'initiation de l'apoptose. - Apaf-1, FADD: activateurs des caspases.
Ced-9	Famille Bcl-2: <ul style="list-style-type: none"> • Bcl-2, Bcl-x_L (anti-apoptotiques), • Bax, Bak, Bok (pro-apoptotiques) 	<ul style="list-style-type: none"> - Ced-9: inhibe l'activation de Ced-3 et Ced-4 en séquestrant Ced-4 et / ou le complexe Ced-4/Ced-3 - Bcl-2, Bcl-x_L, Bax, Bak, Bok: régulateurs de la perméabilité des membranes intracellulaires et/ ou de l'apoptosome.
Egl-1	Famille Bcl-2: <ul style="list-style-type: none"> • Bik, Bad (pro-apoptotiques) 	<ul style="list-style-type: none"> - Egl-1: suite à un stimulus de mort cellulaire Egl-1 interagit avec Ced-9 permettant l'activation de Ced-3 par Ced-4. - Bik, Bad: inhibiteurs de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Tableau 2: Fonctions des protéines impliquées dans l'apoptose (Gaumer et coll., 2002; Metzstein et coll., 1998).

Rappels bibliographiques

II-4. Mécanismes et aspect moléculaire de l'apoptose:

II-4-1. La phase d'initiation:

Les cellules sont en permanence soumises à des signaux émis par l'environnement. Ces signaux sont nécessaires à la survie, au fonctionnement et au maintien de la population cellulaire. Il existe aussi des stimuli de mort qui modifient l'équilibre de la cellule vivante et fait qu'elle organise elle-même les processus qui conduisent à sa propre mort.

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'apoptose. La voie apoptotique choisie par la cellule dépend du type de stimulus reçu. Toutefois il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de l'apoptose: **les récepteurs de mort** qui induisent l'activation des caspases, et la cellule atteint ainsi le point de non retour vers la mort.

Parmi ces récepteurs de mort, on peut citer le récepteur TNF-RI (Loetscher et coll., 1990; Schall et coll., 1990), Fas (Itoh et coll., 1991; Oehm et coll., 1992) et DR3 (Chinnaiyan et coll., 1996).

D'autres facteurs peuvent également conduire la cellule à l'apoptose tel que les lésions de l'ADN, la privation de facteurs de croissance, l'hypoxie, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Hockenbery et coll., 1993) ou les céramides (Kim et coll., 2001).

Tous les facteurs induisant l'apoptose conduisent la machinerie cellulaire dans des voies convergeant vers les effecteurs centraux de l'apoptose qui entraîne irréversiblement la cellule vers la mort.

II-4-2. La phase de décision:

Deux effecteurs centraux interviennent durant cette phase: les caspases et la mitochondrie. Cette phase effectrice est aussi finement régulée par un nombre de protéines.

La mitochondrie de la cellule apoptotique va subir des modifications majeures: augmentation de la perméabilité membranaire, la chute du potentiel membranaire mitochondrial et l'ouverture des pores de PT mitochondriaux (Transition de Perméabilité) pour permettent le relargage des protéines de l'espace intermembranaire (le cytochrome c et AIF "Apoptotic Inducing Factor") dans le cytoplasme (Zamzami et coll., 1996; Yang et coll., 1997; Petit et coll., 1998; Kroemer et coll., 1998).

Rappels bibliographiques

Les caspases sont des protéases qui sont capables de faire un clivage strict en position C-terminale d'un aspartate. Ce clivage permet ensuite la formation d'une structure active pro-apoptotique. Les caspases ont le pouvoir de s'auto-activer et / ou d'activer d'autres caspases. Une fois les caspases initiateuses activées, elles vont cliver d'autres caspases et ainsi de suite, d'où la notion de **cascade d'activation**.

Les caspases et la mitochondrie sont les effecteurs centraux dans l'exécution de l'apoptose, ils conduisent la cellule au point de non retour vers la mort et le processus devient ainsi irréversible et la cellule commence la phase de dégradation.

II-4-3. La phase de dégradation:

Cette phase est caractérisée par la condensation de la chromatine, la dégradation des acides nucléiques, les modifications cytosoliques et les changements moléculaires de la membrane plasmique ce qui rend les corps apoptotiques détectables par les phagocytes.

La dégradation nucléaire constitue l'une des étapes finales de l'apoptose. Deux modes de fragmentation sont observés ; (1) une fragmentation internucléosomale qui donne des fragments de multiples de 108 pb. Ce clivage dans le noyau implique des endonucléases comme Nuc18, CAD/ DFF-40 (DNA Fragmentation Factor-40) (Mukae et coll., 1998). Aussi des endonucléases dépendantes du Ca^{2+}/Mg^{2+} ou Ca^{2+}/Mn^{2+} sont impliquées (Yoshida et coll., 1998). (2) un clivage qui donne des fragments de hauts poids moléculaires d'environ 50 à 300Kpb. Cette fragmentation qui impliquerait la DNase I (Hughes et Cidlowski, 1997) peut être suivie d'un clivage internucléosomal (Fournel et coll., 1995).

Le cytoplasme se condense par perte d'eau et d'ions, les protéines du cytosquelette sont clivées (gelsoline et actine) par la caspase-3 (Robertson et coll., 2000a).

La translocation des phosphatidylsérines de la face interne à la face externe de la membrane plasmique permet la reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes et donc leur élimination rapide (Bratton et coll., 1997).

Une augmentation très importante de la concentration du Calcium cytosolique joue un rôle important dans l'activation des endonucléases responsables de la dégradation de l'ADN (McConkey et coll., 1996). Le Calcium joue aussi un rôle dans la régulation de la

Rappels bibliographiques

phosphorylation de Bad, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (Wang et coll., 1999).

Il a été constaté une augmentation de certaines molécules toxiques telles que les ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène) capables de créer des dommages importants au niveau des protéines, de l'ADN et des membranes lipidiques.

II-5. Les effecteurs centraux de l'apoptose

II-5-1. La voie des récepteurs membranaires

Dans l'apoptose, l'activation des caspases passent généralement par des voies de signalisation dépendantes d'une manière directe des récepteurs de mort de la famille TNF (Tumor Necrosis Factor) et de la famille NGF (Nerve Growth Factor) (Enari et coll., 1995 ; Longthorne et Williams, 1997). Ils comprennent les récepteurs TNFR1 (p55/ CD120a/ TNFRSF1A) (Loetscher et coll., 1990 ; Scall et coll., 1990), Fas (CD95/ APO-1/ TNFRSF6) (Itoh et coll., 1991 ; Oehm et coll., 1992), DR4 (TRAIL-R1/ TNFRSF10A) (Chaudhary et coll., 1997), DR5 (TRAIL-R2/ TNFRSF10B) (Chaudhary et coll., 1997), DR6 (Pan et coll., 1998), DR3 (Wsl-1/ TRAMP/ APO-3) (Chinnaiyan et coll., 1996). Ces récepteurs de la membrane plasmique ont la particularité de posséder dans leur partie cytoplasmique une région conservée appelée DD (Death Domain) nécessaire à la transmission du signal de mort par ces récepteurs.

L'apoptose induite par la voie de Fas est la plus étudiée . Elle peut se résumer de la façon suivante :

- en se liant à Fas, le ligand FasL ou un anticorps agoniste, permet la fixation de la protéine FADD (Fas- Associated Death Domain) grâce à son domaine de mort homologue à celui de Fas (Boldin et coll., 1995).
- à l'extrémité N-terminale de FADD, se trouve le domaine effecteur de mort DED (pour Death Effector Domain). Ce dernier interagit avec la caspase-8 (ou -10) et induit le recrutement et l'activation de cette dernière.

La transmission du signal apoptotique passe donc par la formation d'un complexe multiprotéique formé par l'assemblage de Fas, FADD et la caspase-8 (ou -10). Ce complexe

Rappels bibliographiques

est nommé « complexe de signalisation de la mort induite » ou DISC (pour Death Inducing Signaling Complex) (Siegel et coll., 2000). Voir *figure 2*.

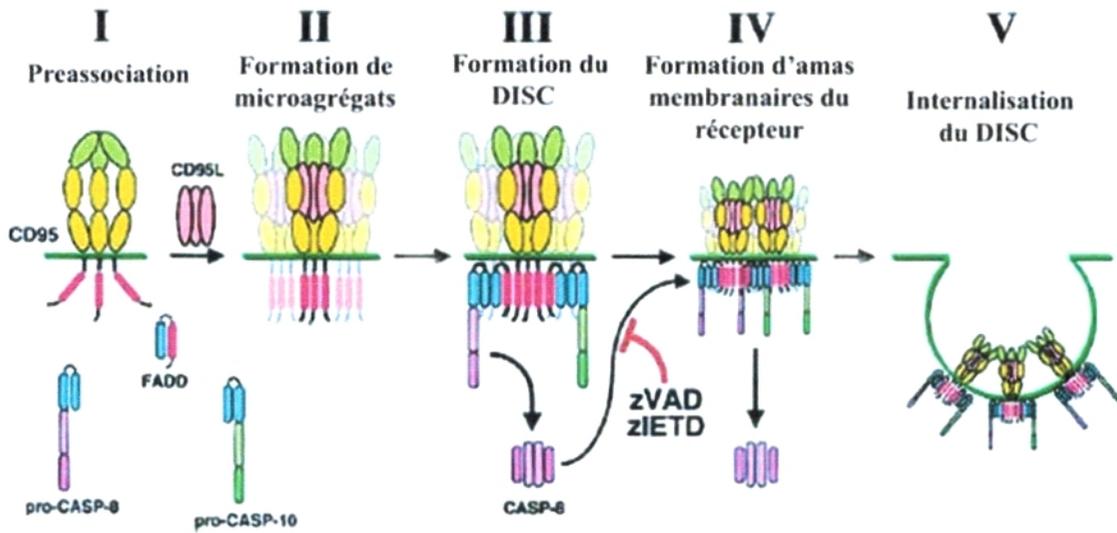


Figure 2: Modélisation du signal initial de l'activation de la voie Fas (d'après Algeciras-Schimmich et coll., 2002).

Rappels bibliographiques

Les travaux de Fulda et coll. (1998) ont montré l'importance de la voie mitochondriale dans l'apoptose induite par Fas (Fulda et coll. 1998). Selon l'utilisation de l'une de ces voies en aval de Fas, on peut distinguer deux types de cellules (Scaffidi et coll., 1998). Les cellules de type I seraient indépendantes de l'activité apoptotique des mitochondries. Les cellules de type II seraient dépendantes de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose (figure 3).

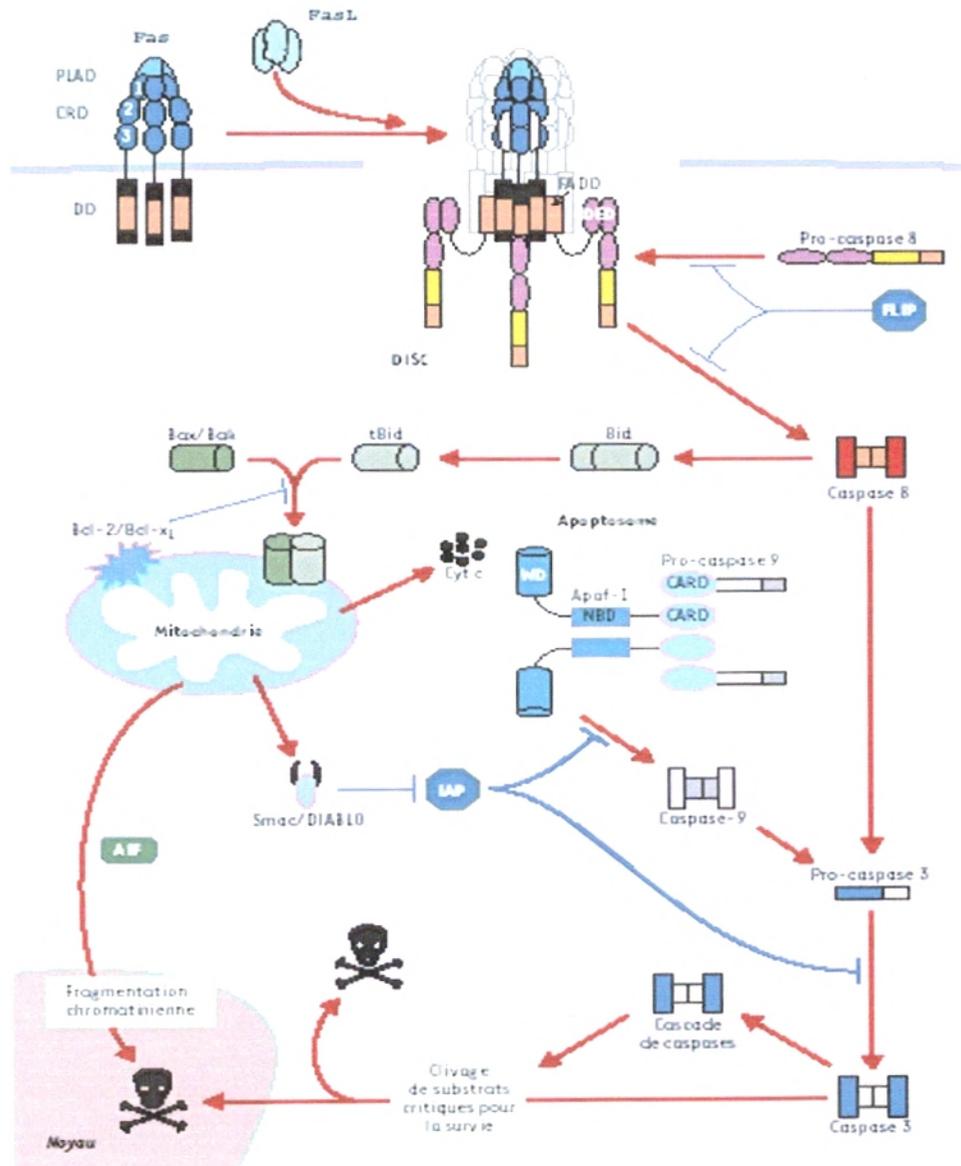


Figure 3 : Voies d'activation de Fas dans les cellules de type I ou de type II (d'après Couzinet et coll., 2002).

Rappels bibliographiques

La molécule Bid, un membre de la famille Bcl-2, constitue l'un des liens connus entre la voie du récepteur Fas et la voie mitochondriale (Li et coll., 1998). Dans les cellules de type I, Bid est clivé par la caspase-8. Un fragment de Bid va se lier à Bax présent sous forme monomérique dans le cytosol. Cette liaison permet l'oligomérisation de Bax et son intégration dans la membrane mitochondriale externe. En conséquence des mégapores sont ouverts et sont à l'origine de la chute de $\Delta\psi_{mt}$ et de la libération du cytochrome c (Eskes et coll., 2000). Les travaux de Zhang et coll. (2000) ont permis d'identifier une autre protéine qui fait jonction entre les deux voies. Il s'agit de la protéine régulatrice BAR (Bifunctional Apoptosis Regulator) (Zhang et coll., 2000). Cette protéine régulatrice possède à la fois la capacité de s'associer aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2/ Bcl-x_L et à la caspase-8.

Donc le rôle inhibiteur de Bcl-2 dans la mort induite par Fas dépend directement du type de cellules (type I ou type II). Bcl-2 ne jouerait alors aucun rôle dans l'apoptose provoquée par Fas dans les cellules au sein desquelles une activation directe des caspases est suffisante pour le déroulement du processus apoptotique ; c'est-à-dire dans les cellules de type I.

II-5-2. La mitochondrie: rôle central dans l'apoptose induite par les agents anticancéreux

Dans la cellule, la mitochondrie est placée au centre du métabolisme énergétique. La mitochondrie joue aussi un rôle important dans la régulation de la vie ou de la mort cellulaire par le relargage de facteurs pro-apoptotiques (cytochrome c et AIF) (Green et coll., 1998a ; Susin et coll., 1998). Les protéines appartenant à la famille des Bcl-2 régulent la PMM (Perméabilité de la Membrane Mitochondriale) et donc le relargage dans le cytoplasme des facteurs pro-apoptotiques.

Les mitochondries sont aussi sensibles à des signaux de stress intra/ extracellulaires et répondent à ces agressions par l'induction de l'apoptose (Lee et coll., 2000).

II-5-2-1. Structure et physiologie de la mitochondrie

La mitochondrie est délimitée par une membrane externe lisse et une membrane interne avec de nombreuses invaginations (crêtes), entre les deux membranes se situe l'espace

Rappels bibliographiques

intermembranaire (Kroemer et Reed, 2000), cet espace est un réservoir pour l'AIF et le cytochrome c. La protéine la plus abondante de la membrane externe est la porine (VDAC : Voltage Dependent-Anion Channel) qui permet le passage des molécules inférieures à 5000 Da (Kroemer et coll., 2000 ; Brenner et coll., 1998), ce qui donne à l'espace intermembranaire une composition chimique proche du cytosol par rapport aux petites molécules. La membrane interne par contre est imperméable aux ions et aux petites molécules. La matrice délimitée par la membrane interne ne contient donc que des molécules qui peuvent être transportées de façon sélective à travers la membrane interne. Elle contient également des centaines d'enzymes nécessaires à l'oxydation du pyruvate et des acides gras et celles du cycle de l'acide citrique, ainsi que plusieurs copies identiques de l'ADN mitochondrial, des ribosomes mitochondriaux et des ARN_t (*figure 4*).

La membrane interne contient les complexes de la chaîne respiratoire, l'ATP synthase et le translocateur ATP/ADP (dit aussi ANT : Adenine Nucleotide Translocator).

Grâce à son imperméabilité, la membrane interne joue un rôle important en créant un potentiel électrochimique ou transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_{mt}$) et ce par le rejet de protons. Dans les conditions physiologiques normales $\Delta\psi_{mt} = 220\text{mV}$ (Mitchell, 1979). La formation du $\Delta\psi_{mt}$ est nécessaire au bon fonctionnement de la mitochondrie et notamment dans la synthèse d'ATP. Nous verrons plus loin que la chute du $\Delta\psi_{mt}$ est indissociable du processus apoptotique.

Rappels bibliographiques

Espace inter-membranaire

Contient :

- AIF
- Cytochrome c
- Transit de l'ADP, ATP, O₂, ions superoxyde, hydroxydes

Membrane interne

Imperméable à la plupart des ions et des petites molécules, y compris les protons

Contient :

- les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire (complexes I à VI)
- les translocases ADP-ATP
- l'ATP synthase (F₀F₁)
- d'autres transporteurs membranaires

Membrane externe

Aisément perméable aux ions et aux petites molécules

Crêtes

Matrice

Contient :

- le complexe de pyruvate déshydrogénase
- les enzymes du cycle de l'acide citrique
- les enzymes de la β-oxydation des acides gras
- les enzymes d'oxydation des acides aminés
- du DNA et des ribosomes
- ATP, ADP, Pi, Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺
- Beaucoup d'autres enzymes
- Beaucoup d'intermédiaires métaboliques solubles

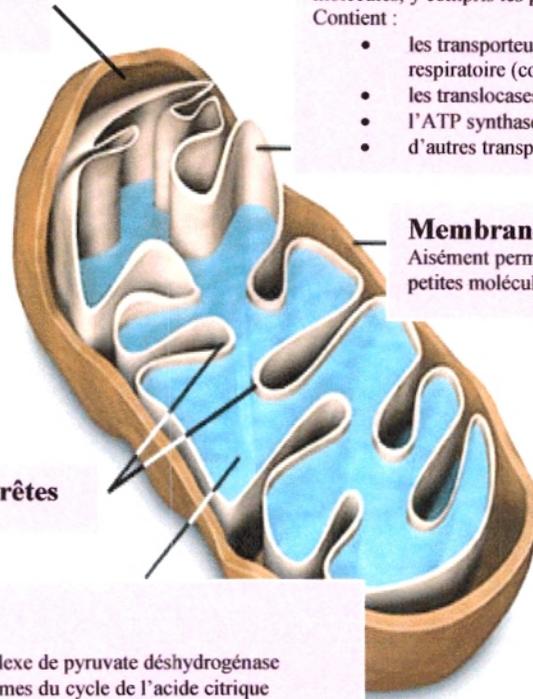


Figure 4: La mitochondrie : réservoir et site d'une activité métabolique intense (adapté d'après Voet et coll., Biochimie, Ed DeBoeck Université, 1982, 2^{ème} édition).

Rappels bibliographiques

II-5-2-1-1. La phosphorylation oxydative

La chaîne respiratoire est localisée dans la membrane interne mitochondriale. Elle est présente en plusieurs exemplaires. Les protéines qui la composent sont regroupées en quatre grands complexes d'enzymes respiratoires, contenant chacun plusieurs protéines individuelles. Ces complexes sont couplés à une pompe à protons F_1F_0 -ATPase dite aussi ATP synthase (le complexe V de la chaîne respiratoire) (figure 5).

Adapté d'après Voet et coll., Biochimie, Ed. DeBoeck Université, 1998, 2^{ème} édition.

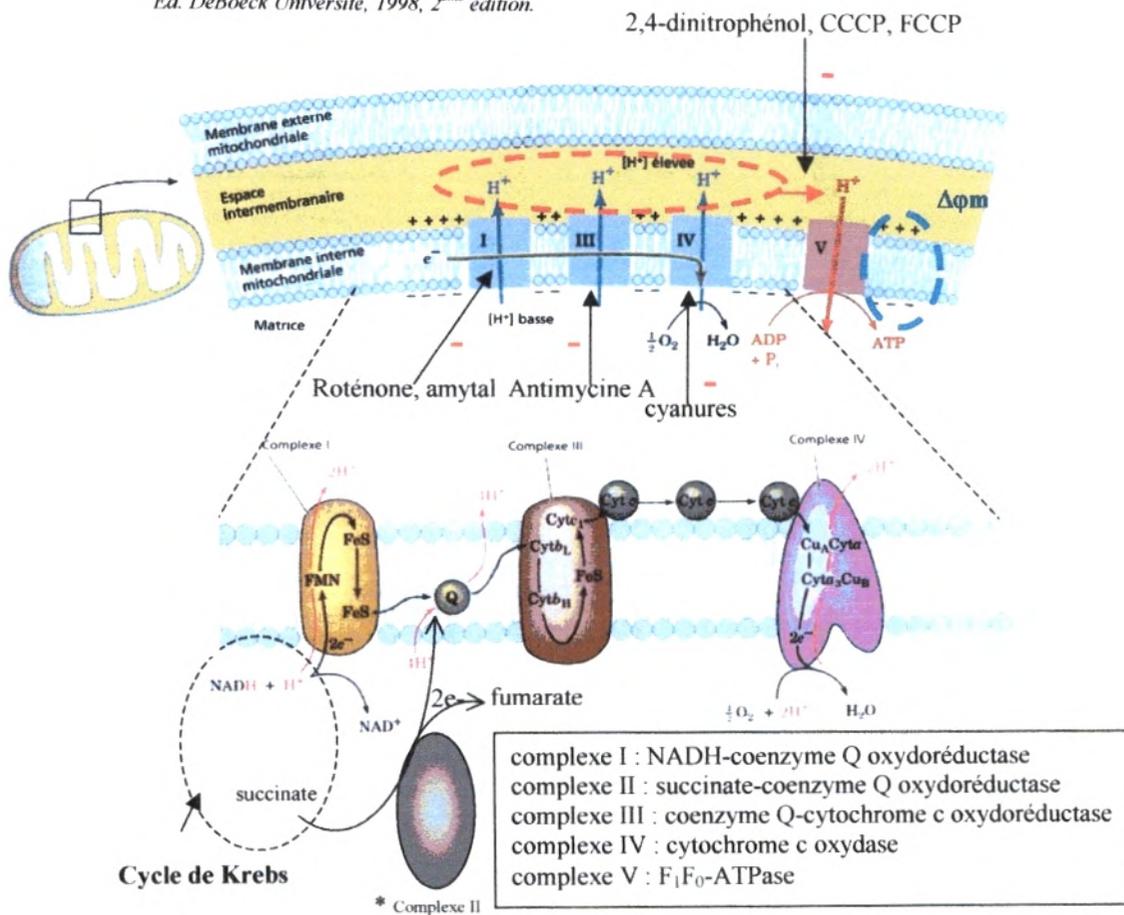


Figure 5: Synthèse de l'ATP par la chaîne respiratoire.

Les quatre complexes d'enzymes respiratoires sont : (1) le complexe de la NADH déshydrogénase (complexe I), (2) le complexe succinate-coenzyme Q oxydoréductase (complexe II), (3) le complexe du cytochrome b-c₁ dit aussi le complexe coenzyme

Rappels bibliographiques

Q-cytochrome c oxydoréductase (complexe III), et (4) le complexe de la cytochrome c oxydase dit aussi cytochrome a-a₃ (complexe IV).

Le coenzyme Q (ubiquinone) et le cytochrome c sont des transporteurs d'électrons mobiles de la chaîne respiratoire respectivement entre les complexes (NADH déshydrogénase-cytochrome-b-c₁) et (cytochrome b-c₂- cytochrome oxydase).

Les électrons provenant du cycle de Krebs vont être cédés par le NADH sous forme d'ion hydride (H⁻), qui est converti en un proton et deux électrons riches en énergie :

$H^- \longrightarrow H^+ + 2e^-$, cette réaction est catalysée par le complexe NADH déshydrogénase, qui accepte les électrons. Les électrons sont ensuite successivement transférés le long de la chaîne à chacun des complexes enzymatiques, en utilisant les transporteurs d'électrons mobiles : le coenzyme Q et le cytochrome c. L'oxygène moléculaire, accepteur final des électrons, sera réduit en H₂O. Le FADH₂ produit dans la matrice mitochondriale cède, quant à lui, ses équivalents réducteurs au complexe cytochrome b-c₁. Le cheminement des électrons est ensuite identique à celui des électrons fournis par NADH.

Le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire crée un gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne, en expulsant des H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire. Ce gradient est constitué d'un gradient de pH (pH matriciel basique, proche de 8) et d'un gradient de charges (la face matricielle de la MI est chargée négativement).

Le gradient électrochimique de protons favorise sur le plan énergétique le retour du flux de H⁺ dans la matrice de la mitochondrie. Ce retour ne peut s'effectuer qu'au niveau de passages spécifiques constitués par l'ATP synthase (complexe F₀F₁) : F₀ est un canal transmembranaire qui laisse passer sélectivement les protons, F₁ contient le site catalytique responsable de la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de P_i. Environ 3 protons doivent passer pour chaque molécule d'ATP produite, et l'ATP synthase est capable de produire 100 molécules d'ATP par minute. Un fort gradient électrique ($\Delta\psi_{mt}$) est donc important pour la production d'ATP.

Rappels bibliographiques

II-5-2-1-2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupent un ensemble de dérivés radicalaires de l'oxygène (comme OH \cdot , O $_2^{\cdot-}$, RO $_2^{\cdot}$) mais également d'autres composés non radicalaires (comme H $_2$ O $_2$, RO $_2$ H).

Un radical libre est une molécule ou atome qui possède sur sa couche externe un électron non apparié ou célibataire. Les radicaux libres sont formés par gain d'électrons à partir de l'oxygène. C'est au niveau de la membrane interne que la majorité des ERO de la cellule sont formés.

La majeure partie de l'oxygène respiré subit une réduction tétravalente pour donner l'eau au niveau du complexe IV de la chaîne respiratoire (la cytochrome oxydase). Par contre une petite partie de cet oxygène peut être réduite mais en partie seulement, conduisant à la formation du radical superoxyde O $_2^{\cdot-}$ au niveau de l'ubiquinone.

La NADH-deshydrogénase conduit à la formation des radicaux O $_2^{\cdot-}$ qui s'accumulent dans l'espace intermembranaire où il est transformé en peroxyde d'hydrogène (H $_2$ O $_2$) par la superoxyde dismutase (SOD). L'H $_2$ O $_2$ traverse la membrane mitochondriale vers le cytosol et va exercer le rôle de second messenger pour dégrader ses cibles.

La toxicité du peroxyde d'hydrogène provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle OH \cdot en présence de cations métalliques tels que Fe $^{2+}$ ou Cu $^{2+}$ selon la réaction de Fenton (H $_2$ O $_2$ + Fe $^{2+}$ \longrightarrow OH \cdot + Fe $^{3+}$ + OH $^-$) (Wardman et coll., 1996 ; Skulachev, 2000 ; Cadenas et coll., 2000). Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques.

La catalase (présente dans les peroxysomes) et les glutathion peroxydases (présente essentiellement dans le cytosol) régulent la concentration de H $_2$ O $_2$. La catalase le transforme en eau et O $_2$ et les glutathions peroxydases accélère la réaction d'oxydation du glutathion par le H $_2$ O $_2$. Le H $_2$ O $_2$ est réduit en H $_2$ O.

Il est important de noter le rôle de second messenger que peuvent jouer les ERO produits dans les cellules tumorales en réponse aux agents anti-cancéreux et ce dans un vaste processus apoptotique (et aussi nécrotique).

Rappels bibliographiques

Ils peuvent (1) induire et/ ou maintenir la transition de perméabilité (PT) mitochondriale (Zamzami et coll., 1995 ; Lemasters et coll., 1998 ; Susin et coll., 1998 ; Shkulachev, 2000 ; Zorov et coll., 2000), (2) réguler l'activation des caspases de manière directe ou indirecte (Matsura et coll., 1999 ; Anuradha et coll., 2001), (3) activer la kinase c-Jun et induire la synthèse du céramide (Mansat-De Mas et coll., 1999), (4) induire l'expression de gènes nucléaires dont les gènes pro-apoptotiques (Nakamura et coll., 2001).

Les ERO ont aussi un rôle physiologique dans les cellules endothéliales du muscle lisse du système vasculaire. Ils sont impliqués dans leur prolifération en activant des facteurs de transcription, gènes, kinases responsables de la survie ou de la prolifération cellulaire (Irani, 2000). Ces résultats paradoxaux incitent les chercheurs à s'intéresser de plus près aux espèces réactives de l'oxygène pour comprendre la balance prolifération/ mort cellulaire.

II-5-2-1-3. Le pore de transition de perméabilité

Le pore de transition de perméabilité (PTP, Permeability Transition Pore) de la membrane mitochondriale est localisé à un point de contact entre les membranes interne (MI) et externe (ME) mitochondriales. Il est formé par opposition de protéines des MI et ME. Sur le plan structural, le PTP est constitué d'une hexokinase (HK), d'un récepteur aux benzodiazépine périphériques (PBR), de la créatine kinase (CK), de la porine VDAC (Voltage Dependant Anion Chanel), de l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator), de la cyclophiline D (CycD) et des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ces unités sont mobiles et momentanément associées au niveau d'un point de contact des membranes interne et externe (*figure 6*) (Kroemer et coll., 2000 ; Zoratti et coll., 1995 ; Beutner et coll., 1998).

Dans les conditions physiologiques normales le PTP intervient dans le contrôle du flux calcique et du pH matriciel, permet à la mitochondrie de maintenir un bon équilibre d'oxydo-réduction, et participe à la régulation du volume de la mitochondrie.

Rappels bibliographiques

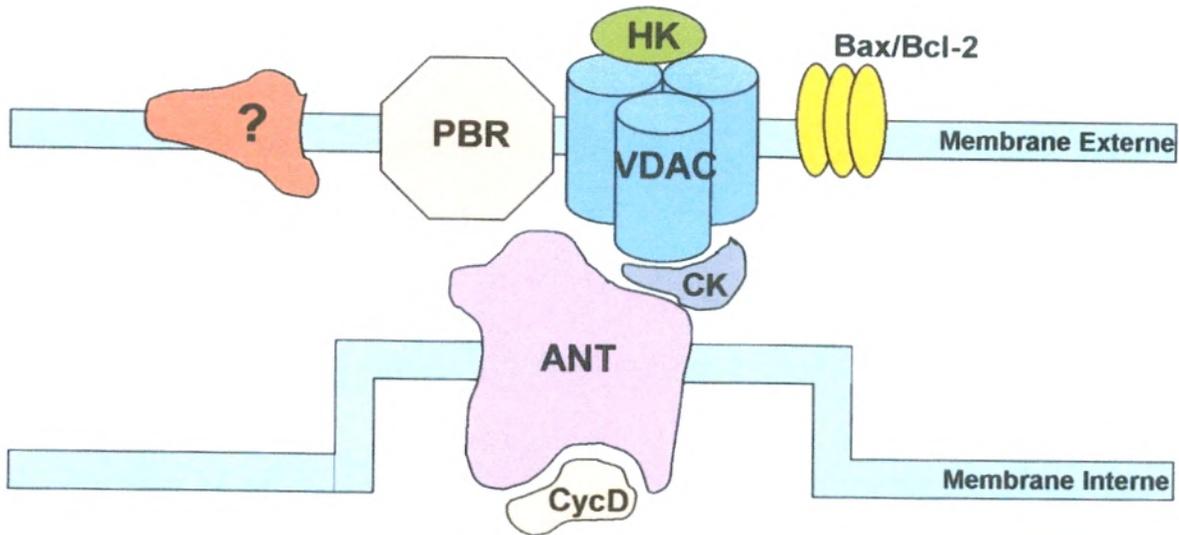


Figure 6 : Représentation schématique du PTP (Huetz, 2006).

II-5-2-2. Rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire programmée

Différentes observations suggèrent que la mitochondrie est un organe essentiel au processus apoptotique (Susin et coll., 1998). (1) Des modifications concernant la membrane mitochondriale sont observées précocement au cours du processus apoptotique, comme la diminution de $\Delta\psi_{mt}$ (Vayssiere et coll., 1994), l'augmentation de la production des ERO et l'augmentation de la perméabilité de la ME (Yang et coll., 1997). (2) Des études faites in vitro montrent la nécessité de la présence d'extraits mitochondriaux pour le déroulement du processus apoptotique (Newmeyer et coll., 1994 ; Martin et coll., 1995). (3) Les molécules qui stabilisent les membranes mitochondriales empêchent la chute du $\Delta\psi_{mt}$ des cellules en apoptose (Zamzami et coll., 1996a).

Ces observations constituent non seulement une preuve de l'importance de la mitochondrie dans le processus apoptotique, mais aussi la place au centre de l'évènement. Dans un premier temps, c'est la perméabilité de la membrane mitochondriale qui change, entraînant par conséquent la libération des facteurs apoptogènes nécessaires au déroulement de la phase de dégradation de l'apoptose.

Rappels bibliographiques

II-5-2-3. La transition de perméabilité mitochondriale

La transition de perméabilité est principalement régulée par le VDAC et l'ANT. Le VDAC est perméable aux molécules inférieures à 5000 daltons sans sélectivité particulière. Par contre l'ANT est beaucoup plus sélectif et ne transporte que l'ADP et l'ATP.

Durant le processus apoptotique, l'ouverture intempestive d'un seul PTP permet le libre passage de métabolites de masse inférieure à 1500 Da ainsi que des ions et de l'eau. Cette ouverture est suffisante pour provoquer la dépolarisation mitochondriale et le gonflement de la mitochondrie (Lemaster et coll., 1998 ; Decaudin et coll., 1998). Il s'ensuit une chute de $\Delta\psi_{mt}$, aboutissant à la libération du contenu de l'espace intermembranaire dans le cytosol (Kroemer et coll., 2000).

Les constituants du PTP jouent un rôle important dans le déroulement de l'apoptose. En effet l'utilisation d'inhibiteurs de PT modifie la réponse apoptotique (Beutner et coll., 1998 ; Crompton et coll., 2002 ; Beutner et coll., 1996). L'utilisation de l'acide bongkrélique par exemple inhibe la chute du $\Delta\psi_{mt}$ en agissant au niveau de l'ANT et donnant une conformation fermée au PTP (Zamzami et coll., 1996b). L'atractyloside réagit avec l'ANT et maintient le PTP en position ouverte, provoquant ainsi la chute irréversible du $\Delta\psi_{mt}$ (Zoratti et coll., 1995). Les protéines Bax et Bcl-2 interagissent avec l'ANT pour réguler le potentiel membranaire mitochondrial (Bernardi et coll., 1996 ; Beutner et coll., 1998).

La protéine anti-apoptotique Bcl-x_L peut fermer le VDAC, alors que les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak forment avec ce dernier la structure d'un pore ouvert pour le passage des protéines apoptotiques comme le cytochrome c (Shimizu et coll., 1999 ; Shimizu et coll., 2000a). L'utilisation d'anticorps humains anti-VDAC prévient la chute de $\Delta\psi_{mt}$ et empêche l'apoptose par divers stimuli (Shimizu et coll., 2001).

II-5-2-4. Le relargage de facteurs apoptogènes

Durant la phase de décision, les molécules apoptogènes sont libérées dans le cytosol. Parmi ces facteurs apoptogènes, comme certaines pro-caspases, le cytochrome c (Green et coll., 1998b), l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Josa et coll., 2001), le répresseur d'inhibiteurs de caspases Smac (DIABLO) (Verhagen et coll., 2000) et l'endonucléase G

Rappels bibliographiques

(Parrish et coll., 2001). Après le relargage des facteurs apoptogènes, la phase de dégradation de l'apoptose peut commencer. Le cytochrome c interagit avec Apaf-1 (Activating protease factor) permettant, en présence de l'ATP, le recrutement de la pro-caspase 9 (Stennicke et coll., 1998 ; Chinnaiyan et coll., 1997; Zou et coll., 1999), pour former le complexe multiprotéique dit apoptosome. L'apoptosome est à l'origine de l'activation de la caspase-9 qui activera ensuite la caspase 3, ce qui déclenchera la cascade des caspases. L'AIF (Josa et coll., 2001) et l'endonuléase G (Parrish et coll., 2001) sont transférés vers le noyau, où ils vont jouer un rôle dans la fragmentation de l'ADN nucléaire (Susin et coll., 1999). La protéine DIABLO se lie aux protéines inhibitrices de l'apoptose et les inactive (Du et coll., 2001 ; Chai et coll., 2000).

Le mécanisme précis de la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage des facteurs apoptogènes est controversé. Deux modèles distincts sont proposés : (1) Ce modèle repose sur le gonflement de la matrice qui pourrait être dû soit à : - l'ouverture du PTP qui serait favorisée par l'association de l'ANT et du VDAC avec des protéines pro-apoptotiques (comme Bax) (Marzo et coll., 1998 ; Deasgher et Martinou, 2000), - ou bien au dysfonctionnement de l'échange ATP/ADP mitochondrial lié à la fermeture du VDAC, provoquant une accumulation de H⁺ dans l'espace intermembranaire responsable du gonflement de la matrice et de la production des ERO (Zamzami et coll., 2001).

Durant le gonflement de la matrice seule la ME est rompue, la MI reste intacte grâce aux crêtes qui augmentent sa surface. (2) L'autre modèle suggère la formation de canaux dans la ME, permettant le passage des molécules apoptogènes dans le cytosol. La protéine pro-apoptotique Bax serait à l'origine de la formation de ces canaux, soit en se liant directement avec VDAC (Shimizu et coll., 1999), soit en s'insérant dans la membrane pour former un canal lipidique ou un complexe lipide-protéine (Bazanez et coll., 1999).

II-5-3. La famille des Bcl-2:

II-5-3-1. Les oncogènes et les oncoprotéines:

Les membres de la famille Bcl-2 jouent un rôle majeur dans la régulation des caspases et plus généralement de l'apoptose.

Rappels bibliographiques

Du point de vu biologique les membres de la famille Bcl-2 sont partagés en deux sous familles:

- les anti-apoptotiques comme: Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, NR-13, Boo, A1.
- et les pro-apoptotiques comme: Bax, Bcl-xs, Bak, Bok, Bad, Bid, Bim, Blk, Hrk, Nip1, Nip3, Noxa.

Sur le plan structural, toutes les protéines présentent des homologies avec Bcl-2 au niveau des régions conservées dites BH (Bcl-2 Homology Domain). Les protéines anti-apoptotiques présentent des homologies de séquences dans les domaines BH1, 2, 3 et 4. Les protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bad, Mtd et Diva présentent des homologies de séquences dans les domaines BH1, 2 et 3. Les protéines pro-apoptotiques comme Bid, Bik, Bim, Hrk, Blk, Bnip3 et Bnip3L présentent des homologies dans les séquences des domaines BH3. BAR est un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2 qui présente une structure originale (*figure 7*).

L'extrémité C- terminale hydrophobe de la majorité des membres de la famille Bcl-2 leur permet de se localiser principalement dans la membrane externe mitochondriale, ainsi que dans la membrane du réticulum endoplasmique et dans la membrane nucléaire.

La protéine pro-apoptique Bax est localisée principalement dans le cytoplasme. Gross et coll. ont montré que l'insertion de Bax est nécessaire à la libération du cytochrome c et à son activité pro-apoptotique. Cette redistribution de Bax du cytoplasme vers les mitochondries implique une homodimérisation et / ou des changements conformationnels de la protéine Bax favorisés par un facteur cytoplasmique inhibé par Bcl-2 (Gross et coll., 1998; Nechushtan et coll., 1999; Nomura et coll., 1999).

Rappels bibliographiques

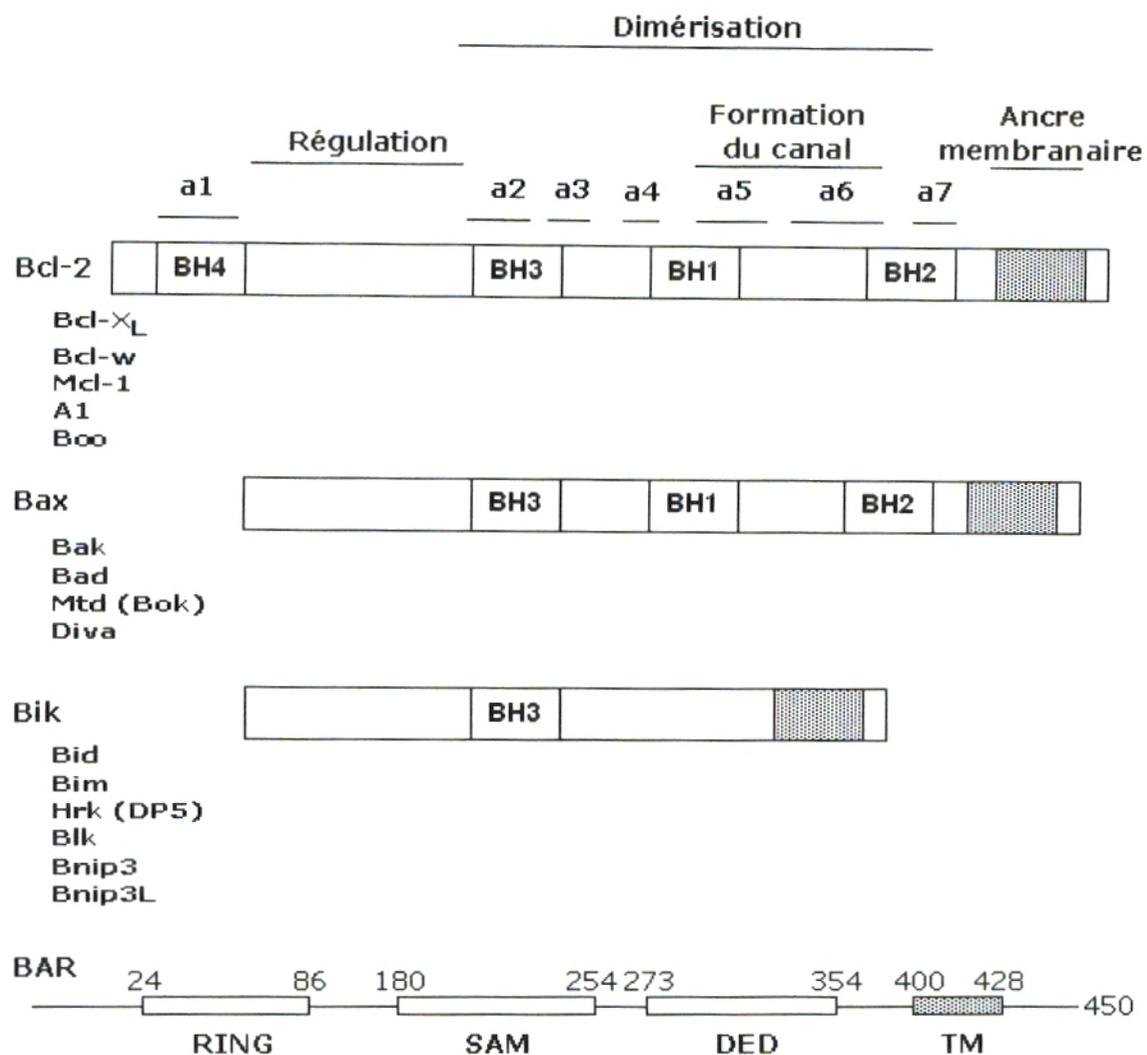


Figure 7 : Représentation schématique des membres de la famille Bcl-2. Les domaines BH1 à BH4 sont des motifs très conservés. a1-a7 représentent les hélices a identifiées dans Bcl-X_L. a5 et a6 forment un core hydrophobe entouré par 5 hélices amphipatiques. Le domaine entre a1 et a2 contient une boucle de régulation. Il est à noter que tous les membres de la famille Bcl-2 ne possèdent pas le domaine d'ancrage membranaire (Adapté de Tsujimoto et coll., 2000).

Rappels bibliographiques

II-5-3-2. Rôle des membres de la famille Bcl-2 dans la régulation du processus apoptotique:

La fonction régulatrice des protéines Bcl-2 du processus apoptotique est basée sur:

- Les interactions des membres de la famille Bcl-2 entre eux et leurs interactions avec des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose comme les caspases.
- Les modifications post traductionnelles des membres de la famille Bcl-2 (phosphorylation).
- La capacité des protéines Bcl-2 à former des canaux dans la membrane mitochondriale et contrôler le relargage du cytochrome c.

a- Les interactions des membres de la famille Bcl-2 entre eux et leurs interactions avec des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose comme les caspases

- Interaction dans la famille Bcl-2: Leur capacité à former des homo ou des hétérodimères est très importante dans l'induction ou l'inhibition de l'apoptose. Les domaines BH1 et BH2 des protéines anti-apoptotiques et les domaines BH3 des protéines pro-apoptotiques sont impliqués dans la formation d'hétérodimères (Ricci, 2006).

Voici quelques exemples d'interaction et leur rôle dans la régulation positive ou négative de l'apoptose:

- Le niveau d'expression des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques par rapport aux protéines Bcl-2 anti-apoptotiques détermine la sensibilité des cellules à un stimulus de mort cellulaire (Yang et Korsmeyer, 1996; Yang et coll., 1995).

Ainsi la surexpression de Bax favorise la formation d'homodimères Bax-Bax qui conduiront à l'apoptose grâce à la libération du cytochrome c et l'activation des caspases. Quand les cellules surexpriment Bcl-2, il y a formation de dimères Bcl-2-Bcl-2 et donc survie cellulaire. Si la cellule surexprime à la fois Bax et Bcl-2 ou Bcl-x_L, l'effet pro-apoptotique de Bax est neutralisé par la formation d'hétérodimères Bax-Bcl-2 ou Bax-Bcl-x_L.

Rappels bibliographiques

- Quant à Bad et Bid, ils sont incapables de former des homodimères, mais ils joueraient leur rôle pro-apoptotique en interagissant avec les membres anti-apoptotiques (comme Bcl-x_L) en formant avec eux des hétérodimères et en favorisant ainsi la formation d'homodimères pro-apoptotiques Bax-Bax (Kelekar et coll., 1997; Sattler et coll., 1997)
- Interaction avec les protéines non homologues impliquées dans la régulation de l'apoptose:
 - Bcl-x_L: Les travaux de Hu et coll. et Li et coll. suggèrent un modèle selon lequel l'interaction Bcl-x_L-Apaf-1 entraîne la séquestration du complexe Apaf-1/ procaspase-9 au niveau de la membrane mitochondriale et inhibe ainsi l'activation de la procaspase-9 et par conséquent empêche la cascade apoptotique de fonctionner (Hu et coll., 1998; Li et coll., 1997). Ce modèle a été remis en question par les travaux de Hausmann (Hausmann et coll., 2000).
 - La protéine BAR: Le domaine SAM est nécessaire pour l'interaction avec Bcl-2 et Bcl-x_L pour bloquer l'apoptose induite par Bax.

Le domaine DED permet à BAR d'abolir l'apoptose induite par Fas. Grâce au domaine DED, la protéine BAR est capable de former un complexe comprenant la procaspase-8 et Bcl-2. Des études suggèrent que BAR entrerait en compétition avec les protéines adaptatrices telle que FAD pour la liaison aux procaspases-8 et -10 (Tschopp et coll., 1998).

b- Les modifications post traductionnelles des membres de la famille Bcl-2 (phosphorylation)

- La protéine Bad: Les signaux de survie (tel que IL-3) font que Bad est phosphorylée et transloquée vers le cytoplasme où elle est séquestrée par la protéine 14-3-3 (Franke et Cantley, 1997).
- L'absence d'IL-3 provoque la déphosphorylation de Bad qui se libère de la protéine 14-3-3 et interagit avec Bcl-x_L pour bloquer son action anti-apoptotique (Kelekar et coll., 1997).
- La protéine Bcl-2: L'utilisation d'agents chimiothérapeutiques (tel que le Taxol) ou d'inhibiteurs de phosphatase (acide oxaïdique) provoque la phosphorylation d'une

Rappels bibliographiques

sérine de Bcl-2 la rendant incapable d'intervenir dans l'apoptose (Haldar et coll., 1995; Pratesi et coll., 2001).

- La protéine Bid: Elle est activée par clivage au niveau du récepteur de mort cellulaire Fas, ce qui induit sa redistribution du cytoplasme vers la mitochondrie où elle exerce sa fonction (Li et coll., 1998; Luo et coll., 1998).

c- Capacité des protéines Bcl-2 à former des canaux dans la membrane mitochondriale et contrôler le relargage du cytochrome c

- La protéine Bax: Elle interagit avec ANT (Adenine Nucleotide Translocator) et VDAC (Voltage Dependant Anion Chanel) qui composent les mégacanaux et provoque l'ouverture de ces derniers pour libérer le cytochrome c (Marzo et coll., 1998; Shimizu et coll., 1999; Shimizu et Tsujimoto, 2000).
- Les protéines Bcl-x_L et Bcl-2: Elles se lient à VDAC pour favoriser la fermeture des mégacanaux et empêcher la libération du cytochrome c (Shimizu et coll., 2000a et b; Shimizu et coll., 1999).

d- Capacité de Bcl-x_L, Bcl-2 et Bax à contrôler les efflux d'ions au niveau des membranes intracellulaires

Les travaux de Shendel ont montré que les canaux formés dans des membranes artificielles par des protéines anti-apoptotiques (Bcl-x_L et Bcl-2) sont perméables aux cations, alors que les canaux formés par Bax sont plus perméables aux anions (Shendel et coll., 1998).

Les protéines Bcl-2 joueraient un rôle sur le potentiel transmembranaire des mitochondries pour favoriser (Bax) ou défavoriser (Bcl-2 et Bcl-x_L) l'apoptose en provoquant la chute ou la stabilisation du potentiel transmembranaire ($\Delta\psi_{mt}$). Cette capacité à modifier le $\Delta\psi_{mt}$ leur est conférée par leur localisation membranaire et leur activité potentielle de canal (Kroemer et Reed, 2000; Kroemer et coll., 1997).

Rappels bibliographiques

II-5-4. Les caspases

A ce jour 14 caspases (cysteinyl aspartate protéinase) ont été identifiées chez les mammifères (Kohler et coll., 2002). Elles sont présentes dans la quasi-totalité des types cellulaires sous forme de proenzymes inactives, et peuvent être activées en réponse à un stimulus apoptotique. Elles sont aussi impliquées dans la régulation de l'inflammation et du cycle cellulaire (Cohen 1997; Stennicke et Salvesen, 1998).

A l'exception des caspases-11, -12 et -13 toutes les caspases sont exprimées chez l'homme (Fadeel et coll., 2000).

En fonction de leur implication dans le mécanisme d'activation des cytokines et celui de l'apoptose, les membres de la famille des caspases peuvent être divisées en deux groupes (Kohler et coll., 2002):

- 1- Le groupe des ICE (Interleukine-1 β Converting Enzymes) qui regroupe les caspases-1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14.
- 2- Le groupe des CED-3 (Cell Death Abnormal) qui regroupe les caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10. Les membres de ce groupe sont impliqués dans l'apoptose.

II-5-4-1. Structure des caspases

Toutes les caspases sont des protéases à cystéine et possèdent une séquence conservée QACxG contenant le site catalytique cystéine (C) sur la grande sous unité (Mignon et coll., 1998).

A leur synthèse, les caspases se trouvent sous la forme de précurseurs inactifs dits procaspases. Les procaspases sont de tailles variables (32 à 56 KDa) et sont constituées d'un prodomaine de longueur variable en NH₂ terminal, d'un domaine central (grande sous unité) et d'une petite sous unité (Kohler et coll., 2002). Elles sont activées par clivage au niveau des sites Aspartate conservés. Cette activation libère la grande et la petite sous unité qui s'associent pour former un hétérodimère (Thornberry et coll., 1998). La structure et l'activation des caspases sont schématisées dans la *figure 8* (Kohler et coll., 2002).

Rappels bibliographiques

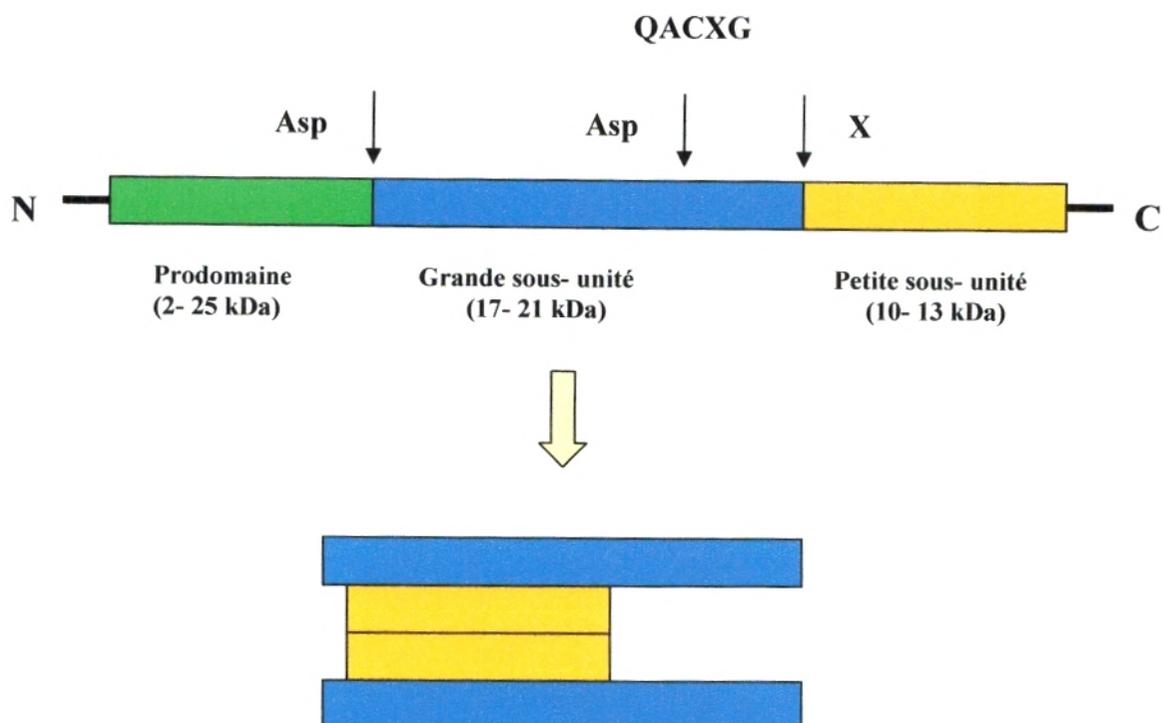


Figure 8: D'une proenzyme à une caspase active (adapté d'après Walker et coll., 1994 ; Wilson et coll., 1994).

L'enzyme active est obtenue par le regroupement de deux hétérodimères en tétramère (Walker et coll., 1994; Wilson et coll., 1994; Rotonda et coll., 1996).

La capacité des caspases à cliver spécifiquement leurs substrats au niveau d'un résidu Aspartate, leur confère le pouvoir de s'auto activer et/ ou de s'activer mutuellement d'où la notion d'activation protéolytique en cascade.

Selon la longueur du pro domaine en NH₂ terminal, les caspases sont divisées en deux groupes : les caspase initiatrices et les caspases effectrices. Les caspases à petits pro domaines appartiennent aux caspases effectrices de l'apoptose (caspases-2, -8, -9 et -10) qui sont activées par les caspases initiatrices de l'apoptose (caspases-3, -6 et -7) qui ont un pro domaine de grande taille (Kohler et coll., 2002).

Rappels bibliographiques

II-5-4-2.Mécanisme d'action des caspases

Les caspases initiatrices possèdent dans leurs pro domaines des séquences spécifiques d'interaction tel que le domaine CARD (Caspases Recrutement Domain) ou le domaine DED (Death Effector Domain). Ils permettent le recrutement des procaspases par des protéines adaptatrices au niveau des complexes d'initiation de l'apoptose et par la suite l'oligomérisation des pro enzymes et leur activation par autocatalyse (Bettaieb et coll., 1999).

L'activation de la procaspase-8 par exemple passent par sa liaison au récepteur Fas sur son domaine cytoplasmique FADD (Fas Associated Death Domain) et ce grâce à un domaine DED situé au niveau du pro domaine de la pro enzyme (*figure 9*) (Fernandes-Alnemri et coll., 1996 ; Muzio et coll., 1996).

Cette interaction entre le DED de FADD et le DED de la procaspase-8 entraîne la libération de la caspase-8 active (Villa et coll., 1997) et l'initiation de la cascade protéolytique.

De façon similaire la procaspase-9 se lie à la protéine adaptatrice Apaf-1 par des interactions CARD-CARD, ce qui permet ensuite son oligomérisation et son activation par autocatalyse en présence de cofacteurs (Stennicke et coll., 1998 ; Chinnaiyan et coll., 1997; Kumar, 1999).

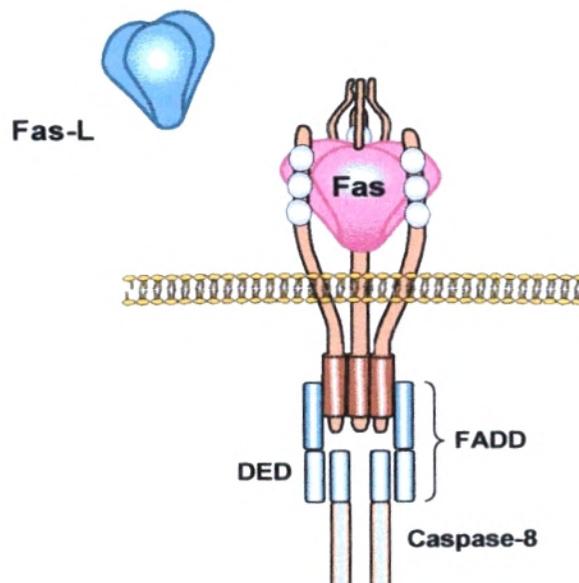


Figure 9. Activation de la caspase-8 par le récepteur de Fas (adapté d'après Algeciras-Schimmich et coll., 2002).

Rappels bibliographiques

Les caspases initiatrices ainsi activées peuvent activer à leur tour les caspases effectrices dans une réaction de cascade qui amplifie le signal de l'apoptose.

Les caspases effectrices clivent des substrats spécifiques dans la cellule. De ce clivage résultent les changements morphologiques de l'apoptose.

Près d'une centaine de protéines cibles pour les caspases sont identifiées (Fadell et coll., 2000). Suivant l'activation ou l'inactivation des substrats après clivage par les caspases et suivant leurs fonctions dans la cellule, les substrats peuvent être classés en plusieurs catégories.

Parmi tous les substrats, on retrouve les protéines qui sont inactivées par protéolyse comme par exemple les protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité du génome (PARP, ATM, DNA-PK), les protéines du cytosquelette (actin, lamine), les inhibiteurs de l'endonucléase et des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L).

D'autres substrats peuvent être activés par clivage tel que Bid et leur protéolyse amplifie le signal apoptotique. Les caspases sont elles mêmes cibles des caspases et leur activation représente à un niveau critique le point de non retour du processus apoptotique.

II-5-4-3. La régulation intracellulaire de l'activité des caspases:

Plusieurs inhibiteurs des caspases sont décrits chez les virus: les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Deveraux et coll., 1998), CrmA (Cytokine Response Modifier A) (Ray et coll., 1992) et les FLIPs (Viral Flice Inhibitory Proteins) (Stennicke et coll., 1998).

Les IAPs sont capables de contrôler les caspases par l'intermédiaire de domaine BIR (Bucaloviral IAP Repeat) (Deveraux et coll., 1999). 8 membres de cette famille ont été identifiés, dont XIAP, c-IAP1 et c-IAP2 qui sont des inhibiteurs directs des caspases-3 et -7 et des inhibiteurs de l'activation de la caspase-9 par le cytochrome c. (Fesik et coll., 2001 ; Shi et coll., 2001). Les IAPs sont elles mêmes régulées, leur transcription dépend du NF-κB. Aussi la protéine Smac (Second mitochondria-derived activator of caspases) (Du et coll., 2001) est libérée dans l'espace intermédiaire mitochondrial et dans le cytosol et empêche l'action des IAPs sur les caspases (Chai et coll., 2000).

Hsp70 est une protéine de choc thermique appartenant à une famille qui inhibe l'activation de la caspase-3 (Kidd 1998; Jäättelä 1999). Les protéines Bcl-2 et Bcl-x_L

Rappels bibliographiques

empêchent le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme et par conséquent l'activation de la caspase-3 qui passe par la caspase-9 (Reed, 1997; Yang et coll., 1997; Jäättelä 1999).

En résumé l'activité des caspases peut être modulée par des molécules physiologiques comme les Bcl-2, ou par certaines protéines virales comme les IAPs ainsi que par certaines molécules de synthèse pour l'étude de l'activité des caspases *in vitro*.

Des modifications biochimiques des caspases peuvent aussi moduler leur activité. En effet une déphosphorylation des caspases provoque l'augmentation de leur capacité à cliver la protéine PARP (Martin et coll., 1998).

La phosphorylation de la caspase-9 par la protéine Kinase AKT inhibe son activation (Cardone et coll., 1998).

II-5-4-4. Apoptose indépendante des caspases:

Il existe des cas rares où l'apoptose peut être caspase indépendante. En effet l'inhibiteur des caspases ZVAD-fmk n'empêche pas le processus apoptotique (Xiang et coll., 1996). La privation de sérum, des dommages de l'ADN par irradiation et l'expression des oncogènes Bak, myc, E1A sont capables de provoquer l'apoptose sans une présence significative des caspases (McCarthy et coll., 1997; Kidd, 1998).

En revanche la présence des caspases n'est pas suffisante pour réussir le processus d'apoptose (Miossec et coll., 1997) car il faut aussi l'intervention des membres de la famille Bcl-2 et aussi de la mitochondrie.

II-6. Induction de l'apoptose par la camptothécine et l'homocamptothécine chez les cellules HT29 :

Le processus apoptotique dans les cellules cancéreuses peut être déclenché en réponse à de nombreux stimuli chimiques, physiques ou biologiques, dont : les agents anti-cancéreux (inhibiteurs de topoisomérase, agents intercalants, agents anti-microtubules, anti-métabolites, inhibiteurs de kinases ou de synthèse protéique), les radiations (UV, β , γ), l'hyperthermie, le DMSO, l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, des cytokines (TNF α , interféron), des hormones (glucocorticoïdes), le céramide, la privation en sérum (Kerr et coll., 1994 ; Kroemer et coll., 1998 ; Kaufmann et coll., 2000).

Rappels bibliographiques

Les travaux de Giovanella et coll. en 1989 ont démontré que les CPTs sont particulièrement cytotoxiques contre les cellules d'adénocarcinome de côlon greffées chez la souris et induisent la régression de la tumeur (Giovanella et coll., 1989). Ces résultats ont aussi été confirmés par Tanizawa et coll. en 1994 et Goldwasse et coll. en 1998 (Tanizawa et coll., 1994 ; Goldwasse et coll., 1998). Les hCPT sont aussi particulièrement efficaces (Lavergne et coll., 1998 ; Lesieur-Ginot et coll., 1999 ; Douillard et coll., 2000).

Les CPTs induisent l'apoptose dans les cellules humaines HT29 d'adénocarcinome de côlon (Te Poele et coll., 1999). Comme la hCPT induit aussi l'apoptose dans les cellules humaines HT29 d'adénocarcinome de côlon ainsi qu'une cytotoxicité (Chauvier et coll., 2002), cette lignée constitue un bon modèle pour l'étude des mécanismes d'induction de l'apoptose par la molécule connue, la CPT, et son dérivé en cours d'études au laboratoire le hCPT.

Rappels bibliographiques

III- LES CAMPTOTHECINES:

III.1- De la découverte à l'application clinique:

La camptothécine est un alcaloïde végétal isolé initialement de *Camptotheca acumunata* (famille des *Nyssaceae*), arbre ornemental d'origine chinoise, par M. Wall en 1966 (Wall M. et coll., 1966). Le développement de cette molécule a été retardé à cause de la difficulté d'approvisionnement en écorce de *Camptotheca acumunata* et du faible rendement d'extraction de CPT.

Par la suite d'autres ressources végétales ont été recherchées et la CPT est extraite aujourd'hui de *Nothapodyte foetida* (famille des *Icacinacea*), *Ophiorhiza mungos* (famille des *Rubiacea*), *Ervatamia heyneana* (famille des *Apocynacea*) et de *Pyrenacanth klaineana* (Hutchinson, 1981; Wu et coll., 1995; Zhou et coll., 2000).

Un autre problème majeur réside dans la faible solubilité de la CPT, qui est par la suite administrée dans les essais cliniques à l'aide d'un sel sodique hydrosoluble de la CPT (Moertel et coll., 1972; Muggia et coll., 1972; Hsiang et coll., 1989).

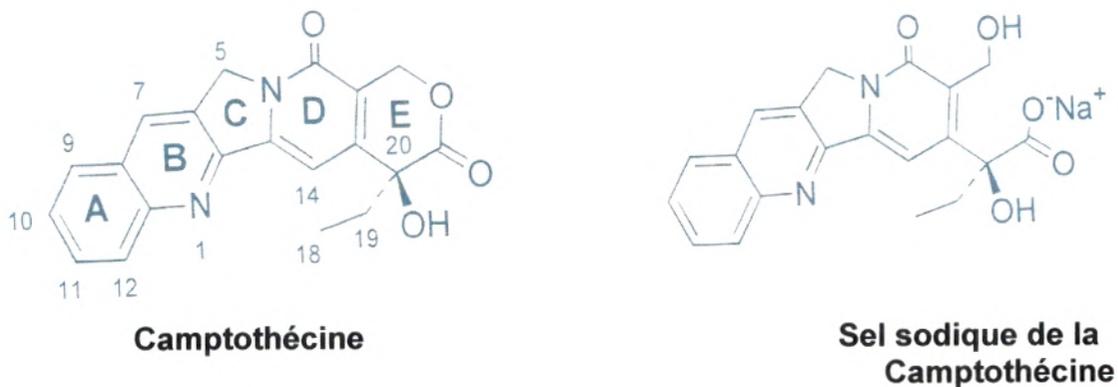


Figure 10: La camptothécine et son sel de sodium (Wall et coll., 1966 ; Hutchinson, 1981 ; Zhou et coll., 2000).

La toxicité sévère de la CPT a fait que les essais cliniques ont été suspendus jusqu'en 1985, date de la découverte de la topoisomérase I comme cible intracellulaire de la CPT

Rappels bibliographiques

(Hsiang et coll., 1985; Mattern et coll., 1987; Hsiang et coll., 1988; Covery et coll., 1989; Jaxel et coll., 1989; Khon et coll., 2000).

La CPT et de ses dérivés ne se lient ni à l'ADN isolé, ni à la topoisomérase I seule, mais au complexe covalent ADN-topoisomérase I pour former un complexe ternaire (Hsiang et coll., 1985; Hertzberg et coll., 1989a). L'efficacité cytotoxique qui en résulte est directement liée au taux de la topoisomérase I présente dans la cellule au moment de la synthèse de l'ADN. Ces molécules se fixent au "complexe de clivage" et le stabilise, empêchant ainsi l'étape de religation.

La découverte de la topoisomérase I comme cible de la CPT (Hertzberg et coll., 1990) a permis d'identifier et de développer avec succès des agents antitumoraux dérivés de la CPT (topotecan et irinotecan) (Sawada et coll., 1996) utilisés respectivement pour le traitement du cancer ovarien et du cancer colorectal (Garcia-Carbonero et coll., 2002).

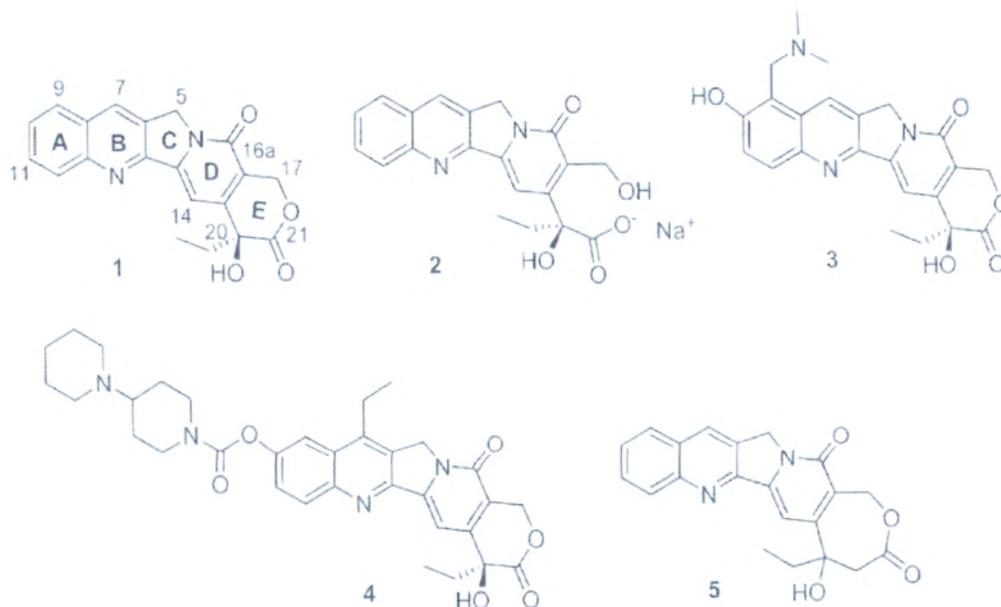


Figure 11: Structure de la camptothécine (1), de sa forme carboxylate (2), du topotecan (3), de l'irinotecan (4), et de l'homocamptothécine « BN80765 » (5) (Hutchinson, 1981 ; Sawada et coll., 1996 ; Lavergne et coll., 1997).

Rappels bibliographiques

III-2. Relation structure- activité:

III-2-1. Les structures essentielles à l'activité des camptothécines:

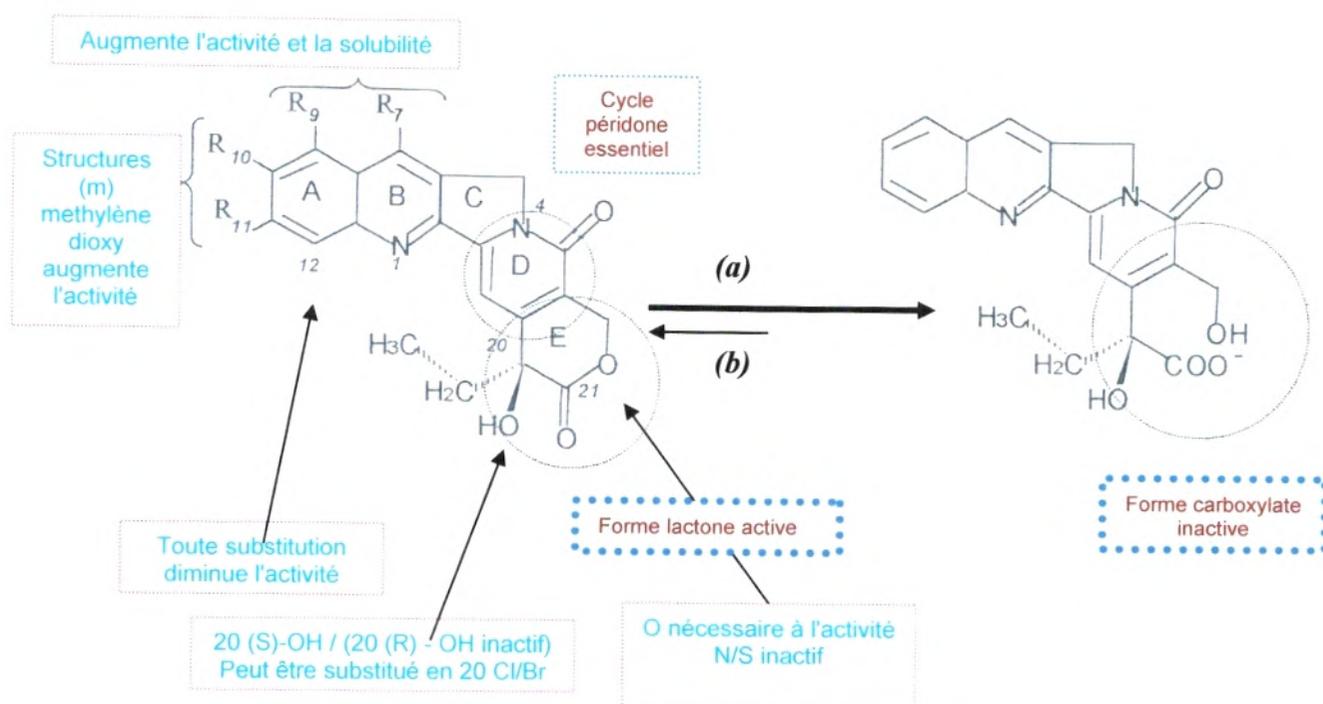
La CPT est caractérisée par la présence d'un squelette pentacyclique comprenant un noyau pyridone (D), un noyau quinoline (AB), une fonction α - hydroxy δ - lactone (E) et un seul carbone asymétrique C20. Sa structure est globalement plane et le haut degré de conjugaison entre les cycles (A- B- C- D) explique sa fluorescence (Rivory et coll., 1995).

La présence d'une fonction alcool tertiaire en C20 confère une forte électrophilie au carbonyle de la fonction lactone en C21. Ceci peut expliquer le comportement de la molécule en milieu aqueux alcalin en présence de borohydrure de sodium (Wall et coll., 1966).

De formule brute $C_{20}H_{16}N_2O_4$ et de PM 348, la CPT est une poudre cristalline jaune pâle, très peu soluble dans les solvants polaires ainsi que dans les solvants non polaires.

Devant l'intérêt thérapeutique de cette molécule, de nombreux dérivés synthétiques ont été comparés pour leur activité, *in vitro* et *in vivo* (test de relaxation de l'ADN par la topoisomérase, formation des complexes clivables, évaluation de leur stabilité, mesure de l'activité antiproliférative, induction de l'apoptose). Les structures démontrées comme essentielles à l'activité des CPT sont présentées en figure 12.

Rappels bibliographiques



Facteurs influençant l'équilibre lactone-carboxylate:

(a) *pH* neutre et alcalin; interaction avec le sérum albumine humaine

(b) *pH* acide; stabilisation lactone en présence: ADN, lipides

Figure 12: Relation structure- activité Lacky et coll., 1995 ; Nicolas et coll., 1990 ; Wall et coll., 1966).

- La présence des cycles ABCD couplés à E est nécessaire pour inhiber la topoisomérase I (Lackey et coll., 1995). Typiquement une activité est conservée après modification des cycles A et B.
- La molécule CPT comporte un seul carbone asymétrique en position 20 (voir *figure 12*) et la configuration naturelle 20 (S) est indispensable à l'activité antitumorale, l'isomère optique (R) obtenu par synthèse est pratiquement inactif tant sur l'inhibition de la topoisomérase I que sur le clivage de l'ADN (Wani et coll., 1987; Wall et coll., 1993).
- Les substitutions qui provoquent un encombrement stérique de la position 12 du cycle A bloquerait peut être l'interaction avec le récepteur (Jaxel et coll., 1989).
- L'addition de groupement 10, 11-méthylène- dioxo ou 10, 11-éthylène- dioxo sur le noyau A augmente fortement l'activité anti- tumorale de la CPT substituée en 7 par une fonction aminoéthyl (Luzzio et coll., 1995; Emerson et coll., 1995).

Rappels bibliographiques

- Certaines substitutions en C₇ et C₉ du cycle B confère une amélioration de la solubilité du composé et / ou confèrent une meilleure activité anti-tumorale (Luzzio et coll., 1995; Sugimori et coll., 1998).
- Le cycle D pyridone est indispensable (Nicholas et coll., 1990; Wang et coll., 1995).
- La structure du cycle E, 20 hydroxy- 21- δ - lactone constitue le point critique de l'activité (Wall et coll., 1966; Hutchinson et coll., 1981; Gunasekera et coll., 1979).
- Le cycle E contient une fonction lactone et un groupement α -hydroxylé en position 20, permettant tous deux la stabilisation du complexe ADN-topoisomérase I. La modification du cycle E s'accompagne d'une perte d'activité partielle, voire totale de la molécule. (Hertzberg et coll., 1989b; Jaxel et coll., 1989; Nicholas et coll., 1990).

III-2-2. Les stratégies pour améliorer les camptothécines:

III-2-2-1. La solubilisation en milieu aqueux:

La mauvaise solubilisation des CPTs constitue l'une des limites de leur efficacité anti-tumorale. Des effets secondaires dus à leur précipitation dans le tractus urinaire en découlent (cystites hémorragiques). De ce fait des dérivés à substituants hydrosolubilisants ont été produits. Ces groupements hydrosolubilisants azotés ou aminés sont positionnés en C₇ et/ou C₉ du noyau quinilone. (Luzzio et coll., 1995; Emerson et coll., 1995; Sugimori et coll., 1998; Lavergne, 1998b; Kumazawa et coll., 1998).

III-2-2-2. Les composés à substituants activants:

L'ajout de substituants en position 7 et/ou 9 améliore la solubilité des camptothécines dans l'eau, mais provoque souvent une diminution d'activité, sauf pour le lurtotecan (GI47211 ou GG211) et le exatecan (DX-8951f) qui possèdent des groupements supplémentaires sur le cycle A. On parle alors de substituants activants car ils sont capables de compenser cette perte d'activité (Lavergne et coll., 1998b).

Il faut rappeler un autre avantage commun aux molécules porteuses de substituants hydrosolubilisants ou hydrosolubilisants + activants, pour le développement clinique: cet avantage est l'augmentation de la stabilité de ces molécules dans le sang car elles

Rappels bibliographiques

n'interagissent plus avec la HSA (Sérum Albumine Humaine) (Burke et coll., 1994; Burke et coll., 2000).

III-2-2-3. La stabilisation du cycle lactone: l'homocamptothécine

La perte d'activité anti-topoisomérase I liée à l'ouverture du cycle E ou au contraire à sa stabilité absolue (lactame) pose le problème de construire un cycle E capable de s'ouvrir mais lentement, tout en conservant une activité biologique suffisante. Les premières tentatives ont été soldées par une perte totale de l'activité biologique de la majorité des composés ainsi modifiés (Hertzberg et coll., 1989a; Nicholas et coll., 1990).

En 1997, l'homocamptothécine (hCPT ou BN80765) (voir formule chapitre I, Matériel et Méthodes, figure 13, page 48), homologue de CPT, à cycle β -hydroxylactone, a été synthétisé à l'institut Henri Beaufour (Les Ulis, France) (Lavergne et coll., 1997). Un groupement méthylène a été inséré entre le carbonyle et la fonction alcool du cycle E. Ce groupement lui confère une grande stabilité en milieu aqueux et dans le plasma humain (Lavergne et coll., 1997; Lavergne et coll., 1998a). Ce composé possède une activité biologique et présente une cytotoxicité supérieure à celle observée pour la CPT à l'encontre des cellules cancéreuses de sein, prostate, ovaire, côlon et leucémiques (Lavergne et coll., 1998a; Lavergne et coll., 1999; Lesueur-Ginot et coll., 1999; Lavergne et coll., 2000; Demarquay et coll., 2001). hCPT induit une régression des tumeurs coliques humaines greffées sur des souris (Lesueur-Ginot et coll., 1999).

Le dérivé bi-fluoré BN80915 (Diflomotecan) est testé en phase I clinique depuis 1999. Il est le plus actif de la série des hCPT (Larsen et coll., 2001). Le Diflomotecan induit la régression complète de tumeurs d'origine humaine (sein, ovaire, côlon, pancréas, mélanome) transplantées chez la souris (Dermaquay et coll., 2001).

La cytotoxicité des hCPT a été corrélée à la stabilisation des complexes de clivage au niveau des sites TG habituellement reconnus par CPT, mais aussi au niveau de sites additionnels CG (sites spécifiques aux hCPTs) (Lusueur-Ginot et coll., 1999; Bailly et coll., 1999; Lavergne et coll., 2000). D'autre part, les complexes clivables stabilisés par hCPT au niveau des sites TG sont moins facilement réversibles que pour la CPT (Bailly et coll., 1999). Cette activité anti-proliférative est confirmée par la diminution de l'indice de prolifération des cultures primaires des cellules humaines de cancer de côlon et des cultures de cellules HT29,

Rappels bibliographiques

traitées au BN80915 (Prévost et coll., 2001). Les hCPTs sont aussi plus cytotoxiques que les CPTs à l'encontre de tumeurs de côlon issues d'une résection chirurgicale et maintenues en culture (Philippart et coll., 2000).

La forte cytotoxicité du BN80927 est liée à l'inhibition mixte de la topoisomérase I et II dans les cellules HT29, SKOV-3, DU145 et MCF7 (Lavergne et coll., 1999). Cette activité duale est sans précédent pour les molécules de la série des CPTs (excepté un hybride CPT/VP16) (Bastow et coll., 1997).

Le cycle β -hydroxylactone des CPTs apparaît donc comme un motif structural important pour le développement des futurs CPTs.

III-3. Les camptothécines poisons de la topoisomérase I :

Les inhibiteurs de la topoisomérase I peuvent être divisés en deux classes: Les "suppresseurs" et les "poisons". Les supresseurs inhibent l'enzyme sans stabiliser le complexe covalent ADN-topoisomérase I. L'enzyme ne peut donc plus se fixer sur l'ADN. Quant aux poisons, ils stabilisent le complexe covalent ADN-topoisomérase I et stimulent ainsi le clivage de l'ADN et/ou inhibent l'étape de religation. Trois modèles d'association ADN-enzyme-CPT sont proposés: (i) une association ADN-enzyme est reconnue par le poison, (ii) l'enzyme se lie au complexe ADN-poison, (iii) un complexe enzyme-poison se forme pour interagir avec l'ADN. Cette hypothèse décrite pour la topoisomérase II est aussi valable pour la topoisomérase I (Burden et coll., 1998).

Les CPTs reconnaissent et bloquent le complexe de clivage covalent ADN-topoisomérase I dans les réactions de clivage *in vitro* et dans la cellule (Hsiang et coll., 1985; Mattern et coll., 1987; Hsiang et coll., 1988; Hsiang et coll., 1989; Covery et coll., 1989).

Durant l'étude du mécanisme de formation du complexe ternaire ADN-topoisomérase-CPT, de nombreuses observations ont été faites et ont permis d'aboutir à la synthèse d'analogues de la CPT. Certains de ces analogues sont utilisés actuellement en clinique, tels que le topotécan (TPT, Hycamtin[®]) utilisé contre les carcinomes ovariens résistants au cisplatine, et l'irinotécan (CPT-11, Campto[®]) (Hertzberg et coll., 1990) utilisé pour le traitement des cancers colorectaux résistants au 5-fluorouracile.



BUT DU TRAVAIL

But du travail

Le travail présenté dans ce mémoire vise dans un premier temps à étudier l'expression des gènes pro et anti-apoptotiques durant le mécanisme d'apoptose induite par la CPT et la hCPT. Nous avons ciblé les gènes pro et anti-apoptotiques Bax et Bcl-x_L dont les protéines interviennent durant la phase d'initiation de l'apoptose. Aussi notre étude aura pour objectif d'évaluer l'expression du gène caspase-3, caspase effectrice, intervenant durant la phase terminale de l'apoptose (la phase de dégradation). La RT-PCR est la technique utilisée pour cette étude. L'évolution de l'expression des protéines Bax et Bcl-x_L ainsi que l'activation de la protéine caspase-3 sont suivis par Western Blot.

La hCPT présente une cytotoxicité supérieure à celle observée pour la CPT dans les cellules du cancer de colon (Philippart et coll., 2000). Durant ce travail, nous nous sommes attachés à vérifier si cette efficacité est liée à l'expression des gènes et des protéines pro et anti-apoptotiques pour la CPT et la hCPT.

Le modèle cellulaire choisi est représenté par les cellules du cancer colorectal humain, les HT-29. Ce choix est basé sur le fait que les CPTs sont particulièrement cytotoxiques et de puissants inducteurs d'apoptose à l'encontre des cancers colorectaux, notamment les cellules HT-29 (Chauvier et coll., 2002).

Dans une seconde approche, nous étudierons l'effet inhibiteur du gène Bcl-2 dans l'apoptose induite par la CPT. Ce gène n'est pas exprimé dans les cellules HT-29. Cette étude a été entreprise en utilisant un modèle de cellules HT-29 transfectées par le gène Bcl-2 et qui le surexpriment.

Enfin, nous essayerons de déterminer quelle voie cellulaire était impliquée dans l'induction de l'apoptose par la CPT, et en particulier nous tenterons de déterminer si la voie Fas intervient dans le processus apoptotique.



MATERIELS ET METHODES

Matériels et méthodes

I- La camptothécine et l'homocamptothécine :

La camptothécine (CPT) et l'homocamptothécine (BN80765) utilisées pour ce travail ont été synthétisées et fournies par l'institut Henri Beaufour (Les Ulis, France) sous forme de poudre. A cause de la faible solubilité de la CPT et l'hCPT en milieu aqueux, elles ont été dissoutes à 10^{-2} M puis à 10^{-3} M dans du DMSO. Les solutions préparées sont aliquotées et conservées à -20°C . Les aliquotes ne seront pas décongelés-recongelés plus de deux fois et seront manipulés à l'abri de la lumière de façon à limiter l'altération du produit.

L'homocamptothécine diffère de la camptothécine par son cycle β -hydroxylactone à 7 chaînons au lieu du cycle α -hydroxylactone caractéristique des CPTs.

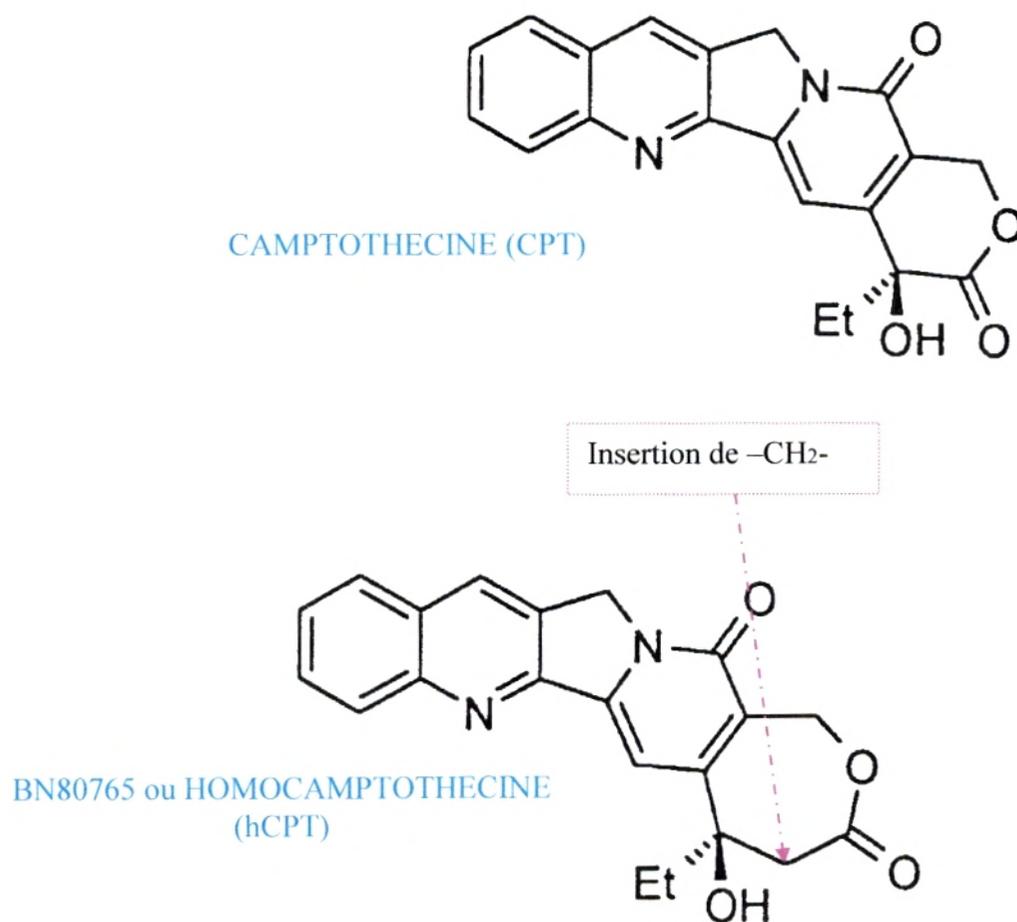


Figure 13 : Structure de la camptothécine et de l'homocamptothécine (Wall et coll., 1966 ; Hutchinson, 1981 ; Zhou et coll., 2000).

Matériels et méthodes

II- Lignées cellulaires utilisées et les conditions de culture :

II-1. La lignée HT29 :

Les cellules HT29 ont été obtenues de l'Institut Henri Beaufour (Les Ulis- Paris). A l'origine, ces cellules ont été prélevées sur une patiente d'origine caucasienne âgée de 44 ans atteinte d'un adénocarcinome du côlon. L'étude caryotypique montre que le chromosome 13 est nullisomique et que les chromosomes 8 et 14 sont généralement monosomiques. L'expression des oncogènes c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, myb, fos, sis, p53 a été détectée ainsi que certaines productions d'antigènes carcino-embryonnaires dont le composé sécrétoire des IgA, le CEA (dont la présence dans le sang est un facteur diagnostique du cancer colorectal), le TGF β , la mucine... Les HT29 expriment aussi les récepteurs à l'urokinase (u-PAR) et à la vitamine D.

Ces cellules cancéreuses possèdent la capacité de se différencier en cellules sécrétrices de mucus ou en cellules de type entérocytaire sous certaines conditions (Zweibaum, 1993). En fait, la lignée HT29 est hétérogène : elle est constituée de cellules indifférenciées dont moins de 5% sont capables de se différencier (Lesuffleur et coll., 1991). Le processus de différenciation ne se met en place que lorsque les cellules ont atteint la confluence et il ne devient complet qu'après l'arrêt des divisions cellulaires. Le remplacement du glucose par du galactose peut aussi conduire à cette différenciation (Zweibaum et coll., 1991). De même, le déficit en glucose conduit à l'acquisition du phénotype entérocytaire (Chintalacharuvu et coll., 1991). C'est pourquoi dans cette étude, un milieu riche en glucose est utilisé pour éviter ces phénomènes de différenciation cellulaire. De plus, les cellules ne sont jamais cultivées jusqu'à confluence totale.

Les cellules HT29 sont un bon modèle pour étudier l'efficacité de médicaments anticancéreux. Généralement, les cellules de cancer de côlon formant des tumeurs solides sont naturellement réfractaires à la chimiothérapie. En dehors du 5-fluorouracil utilisé seul ou en association avec d'autres molécules (par exemple l'acide folinique), les camptothécines sont très efficaces pour le traitement des cancers colorectaux (O'Connor et coll., 1991 ; Bertrand et coll., 1992). Toutefois, les cellules HT29 présentent une altération génétique du gène suppresseur de tumeur p53 comme dans la plupart des adénocarcinomes colorectaux (75%)

Matériels et méthodes

(Te poele et coll., 1999). Près de 300 mutations de ce gène ont été recensées. Dans le cas des cellules HT29, c'est la Guanine du codon 273 qui est mutée en une Adénine, d'où le remplacement d'une arginine par une histidine. Cette mutation pourrait être à l'origine de la chimiorésistance naturelle de cette lignée observée à l'encontre de nombreuses drogues habituellement efficaces en clinique.

II-2. Les cellules HT29 transfectées avec la construction vecteur-gène Bcl2:

Les cellules HT-29 transfectées avec la construction vecteur-gène Bcl-2 sont fournies par le Docteur J BREARD, INSERM 461, France (Lacour et coll., 2003).

II-3. Les cellules HT29 transfectées avec le vecteur seul :

Les cellules HT-29 transfectées avec le vecteur seul sont fournies par le Docteur Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL, INSERM U517, France (Lacour et coll., 2003).

II-4. Les conditions de culture cellulaire :

II-4.1. Le milieu de culture :

Les cellules HT29 sont cultivées en milieu DMEM (Gibco BRL) riche en glucose (4.5g/l) et contenant 2mM de glutamine. Ce milieu est complété par 10% de sérum de veau fœtal (Gibco BRL) -préalablement décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C- et d'un mélange d'antibiotiques [Streptomycine 40mg/l et Pénicilline $5 \cdot 10^5$ U/l (Eurobio, les Ulis)] et un antifongique [Fungizone 3mg/l (Gibco BRL)].

II-4.2. Entretien des cultures des cellules HT29 :

Les cellules HT29 sont des cellules adhérentes. Pour être repiquées, elles sont lavées deux fois au PBS 1X (Sigma, pH 7, 0.017M NaCl, 0.33mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 0.18 KH₂PO₄) chauffé à 37°C. Empiriquement, on a pu déterminer que les cellules sont détachées par addition de 400µl de trypsine (0.05%, Eurobio) (préalablement chauffée à 37°C) pour les

Matériels et méthodes

boîtes de culture de 25cm² ou 1 ml pour celles de 75 cm² (3-5 min à 37°C). L'action de la trypsine est stoppée par l'addition de milieu de culture à 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF). Les cellules récupérées dans le milieu de culture neuf sont comptées etensemencées dans de nouvelles boîtes de culture. Les cellules adhèrent au support au bout de 48 heures de culture (37°C et 5% de CO₂), le milieu de culture est alors changé. Les cellules poussent jusqu'à un état de sub-confluence qu'elles atteignent au bout de 4 à 5 jours en fonction du nombre de cellules repiquées initialement et de la surface de la boîte de culture. Elles sont ainsi mises en culture à une concentration de 50000 cellules par ml et repiquées dans du milieu de culture neuf tous les 4 à 5 jours.

III- Evaluation de l'effet cytotoxique :

III- 1. Principe du test MTT :

Une solution de MTT ou 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (Sigma) est préparée à 2.5 mg/ml dans le PBS 1X (Sigma, pH 7, 0.017M NaCl, 0.33mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 0.18 KH₂PO₄), protégée de la lumière et stockée à -20°C. Le test MTT permet de déterminer la fraction de cellules vivantes après traitement à une ou plusieurs drogues. Seules les cellules vivantes, grâce à leurs déshydrogénases mitochondriales, sont capables de réduire ce sel de Tétrazolium de couleur jaune en cristaux pourpres de MTT-formazan soluble dans le DMSO. Sans attendre le produit de la réaction enzymatique est homogénéisé et quantifié par spectrophotométrie à 540 nm (Campling et coll., 1991).

III-2. Protocole général :

Les cellules HT29 sont directementensemencées dans les puits des plaques de microtitration à une densité définie au préalable (8000 cellules/200µl/puit). On les laisse adhérer et se multiplier pendant 48 heures. Au terme des 48 heures, les cellules sont incubées en présence d'une gamme de concentrations d'une ou plusieurs drogues (l'incubation peut être simultanée ou séquentielle quand plusieurs produits sont analysés en même temps), pendant un temps déterminé. Le milieu est aspiré et les cellules sont lavées une fois avec du milieu neuf et remises en culture dans du milieu neuf pendant 72 heures. En fin de traitement, 20µl de MTT à 2.4mg/ml sont ajoutés dans chaque puit et les cellules sont remises à 37°C et à l'obscurité pendant au moins 3 heures. Le milieu est aspiré et 200 µl de DMSO sont ajoutés dans chaque puit. Les DO₅₄₀ sont ensuite mesurées, après homogénéisation, dans un lecteur de

Matériels et méthodes

microplaques (séries 750, Cambridge Technology, Watertown, MA, USA). La DO du DMSO sert de blanc et est automatiquement retranchée.

III-3. Pourcentage de survie cellulaire :

Le pourcentage de survie cellulaire est calculé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de survie} = \frac{\text{Moyenne de DO des cellules traitées}}{\text{Moyenne des DO des cellules non traitées}} \times 100$$

La courbe de cytotoxicité ou inhibition de croissance (% de viabilité cellulaire en fonction du logarithme des concentrations en drogue) est générée selon une courbe de régression non linéaire de type sigmoïde, à l'aide du logiciel Graph Pad Prism™. On pourra ainsi déterminer la concentration du médicament qui inhibe de X % (CI_X) la croissance cellulaire à partir de cette courbe générée mathématiquement.

IV- Détermination de la fraction des cellules apoptotiques :

Les cellules HT29 sont mises en culture (80000 cellules/ml) dans des Lab-Tek® en borosilicate (2 chambres ; Nalge Nunc International). Au bout de 48 heures, le tapis cellulaire est lavé une fois avec du milieu de culture, le milieu est changé et les cellules incubées en présence de la drogue à étudier (sauf témoins). Une partie des cellules se détachent sous l'effet de la CPT ou hCPT. Il faut donc tenir compte à la fois des cellules adhérentes et décrochées pour déterminer la proportion réelle de cellules apoptotiques (Clarke et coll., 2000). Aucun rinçage n'est effectué au terme de la période d'exposition à l'agent cytotoxique et les cellules sont marquées aussitôt.

Le double marquage successif Hoechst 33258 (25 min, 37°C, 5.2µM)/ Iodure de propidium (6 min, T° ambiante, 0.5 mg/ml) permet de distinguer les cellules apoptotiques (fluorescence bleue) des cellules nécrosées (fluorescence rouge). Le Hoechst (Sigma) est un colorant vital spécifique de l'ADN. L'iodure de propidium (Sigma) marque exclusivement l'ADN des cellules non viables. Les cellules marquées sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence. Le Hoechst est excité en UV selon une bande passante (BP 330-385) et l'iodure de propidium selon une bande passante (BP 460-490). Plusieurs champs optiques d'au moins 100 cellules sont comptées.

Matériels et méthodes

Aussi les cellules sont considérées comme apoptotiques si elles fluorescent uniquement dans le bleu et si elles présentent les caractéristiques morphologiques définies par Kerr (Kerr et coll., 1972 ; Kerr et coll., 1994) : chronologiquement un aspect rugueux et fragmenté du noyau puis une condensation nucléaire et plus tardivement la présence de corps apoptotiques.

V- Biologie moléculaire :

V-1. Etude de l'expression des gènes pro et anti-apoptotiques :

L'expression des gènes impliqués dans la régulation du processus apoptotique a été analysée par RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase-Chain-Reaction). Le principe est résumé dans *la figure13* (d'après COHEN, 2001); il consiste en une réaction de synthèse d'un ADN complémentaire (ADNc) par une reverse transcriptase à partir d'un modèle d'ARNm. Les ADNc sont ensuite amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'amorces spécifiques d'un gène donné et d'une Taq Polymérase.

Matériels et méthodes

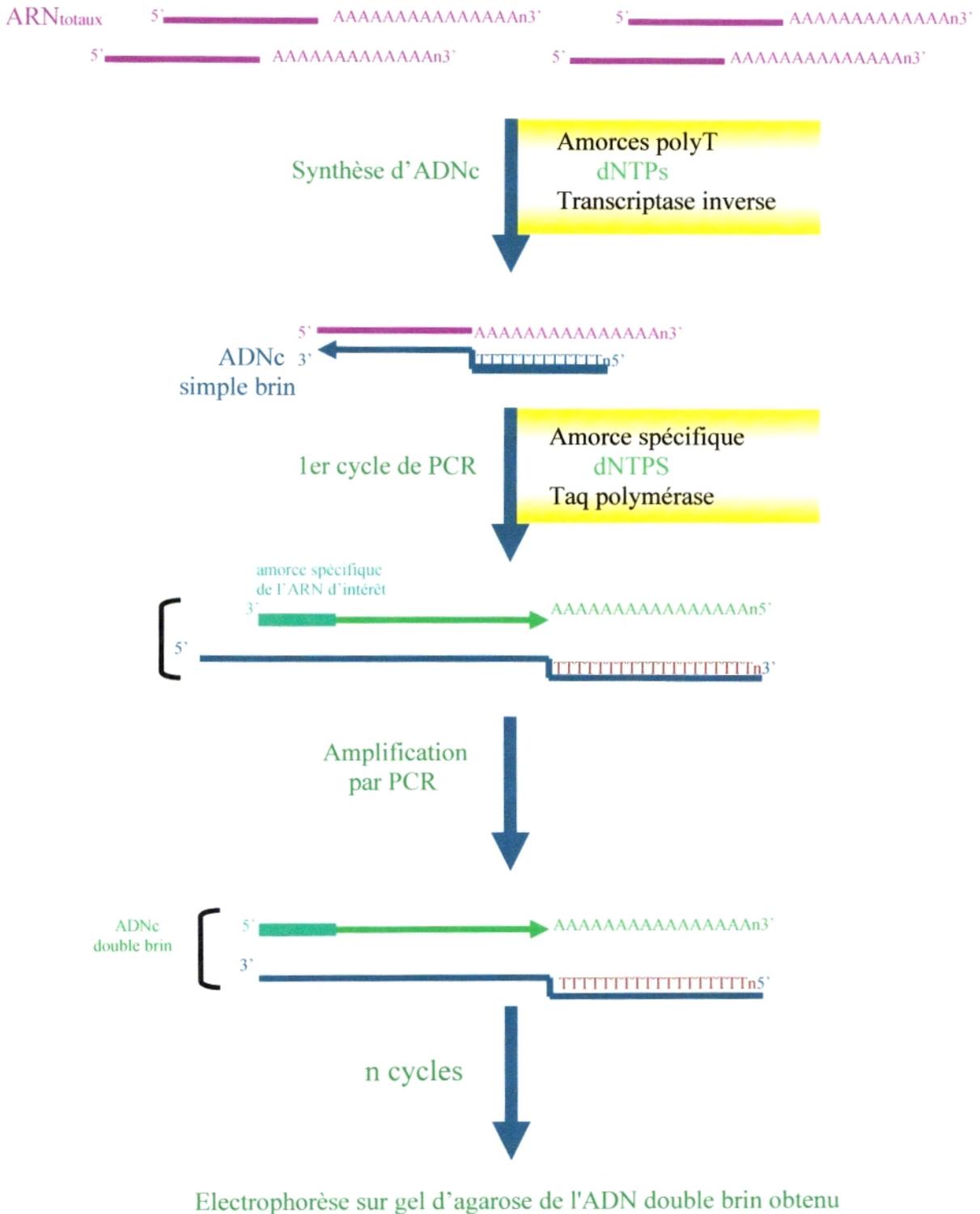


Figure 14: Principe général de la RT-PCR (adapté d'après Cohen, 2001).

Matériels et méthodes

V-1-1. Extraction des ARN totaux :

Les cellules adhérentes (HT29) sont lavées deux fois au PBS1X froid (Tampon Phosphate, EUROMEDEX). Ensuite les cellules sont détachées par trypsination et reprise dans du PBS1X et centrifugées pendant 10 min à 400g.

Les ARN totaux sont extraits à partir de 10^7 cellules selon la méthode dérivée de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et coll., 1987). Le culot cellulaire est remis en suspension dans 1ml de Trizol froid (Gibco BRL), puis incubé 5 min à température ambiante avant l'addition de 200 μ l de Chloroforme. Les tubes sont alors agités vigoureusement au vortex (pendant 20 secondes), jusqu'à obtention d'une solution homogène, puis laissé au repos 3 min à température ambiante. Le lysat est centrifugé à 12000g pendant 15 min à +4°C, étape qui permet l'individualisation de 3 phases : une phase aqueuse supérieure qui contient les ARN totaux, une phase organique inférieure et une phase protéique à l'interface. Les ARN totaux (dans phase supérieure transparente) sont prélevés délicatement avec une micropipette pour éviter d'entraîner la phase en dessous, blanche opaque, qui contient les protéines. Ces acides nucléiques sont précipités par addition de 500 μ l d'Isopropanol et homogénéisés, puis laissés 10 min dans la glace. Le précipité contenant les ARN totaux est ensuite obtenu par centrifugation à 12000g pendant 15min à +4°C. Le culot est lavé dans 1ml d'éthanol à 75% (centrifugation 5000g pendant 5min). Après élimination du surnageant, le culot est séché et repris dans 50 μ l d'eau traitée au DiEthylPyroCarbonate (DEPC Sigma. Pour 1l d'eau on utilise 1ml de DEPC 0.1% pendant une nuit à température ambiante, autoclaver 20min et conserver stérilement), exempt de RNases. Les ARN totaux sont aliquotés et conservés à -80°C.

V-1-2. Dosage des ARN totaux et vérification de leur intégrité:

Les ARN sont quantifiés et leur intégrité est contrôlée. Les ARN sont chauffés pendant 10 min à 65°C puis placés immédiatement dans la glace pour éviter les repliements des brins et l'appariement entre brins. Les échantillons sont dilués au 1/200^{ème} avec de l'eau DEPC et sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm, la contamination protéique est estimée par une lecture à 280nm. Le rapport DO_{260}/DO_{280} permet d'estimer la qualité et la pureté des ARN (>2 : contamination par l'isothiocyanate de guanidine, =1.8 : bonne qualité et pureté, <1.6 : contamination par les protéines). La concentration en ARN est calculée sachant qu'une unité de DO correspond à 40 μ g d'ARN/ml.

Matériels et méthodes

L'intégrité des ARN est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose à 2% dans du TBE 1X (89mM Tris ; 2mM EDTA ; 0.1M acide Borique) (EUROMEDEX) en présence de 0.005% de BET (Bromure d'Ethidium) (GIBCO BRL), après dilution des ARN avec le tampon échantillon* (volume contenant 2µg d'ARN/QSP 6µl de tampon échantillon), les ARN sont déposés sur le gel d'agarose et soumis à un courant électrique de 90 volts pendant 1h30. Après révélation aux ultra violets (UV), la présence de 2 bandes nettes et distinctes reflète la qualité des ARN ribosomiaux majoritaires (18S et 23S) et donc, par extrapolation, la qualité des ARN totaux. Les ARN ne répondant pas à ces normes de pureté et d'intégralité sont exclus de toute analyse des gènes pro et anti-apoptotiques par RT-PCR.

* **Composition du tampon échantillon pour l'électrophorèse des ARN** : glycerol (30%), bleu de bromophénol (12,5%), eau DEPC (42,5%).

V-1-3. Transcription inverse et Réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR):

L'expression des ARN est suivie par une réverse transcription selon le protocole décrit par Noonan (Noonan et coll., 1990) et complétée par une PCR (Polymerase Chain Reaction) réalisée au moyen d'un thermocycler «Eppendorf Mastercycler Gradient ». Cette technique se décompose en deux étapes : une phase de synthèse des ADNc correspondant aux ARN messagers exprimés et la phase d'amplification des ADNc.

V-1-3-1. Synthèse des ADNc par la Réverse Transcriptase :

La réverse transcription des ARNm est effectuée au moyen du Kit « Reverse transcription system » (Promega). Toutes les manipulations sont effectuées dans la glace. 2µg d'ARN sont prélevés et ajustés à 9.75µl avec de l'eau DEPC puis incubés pendant 10min à 70°C dans le thermocycleur (Eppendorf Masterycler Gradient), afin de dénaturer les brins appariés, ensuite sont mis immédiatement dans la glace pour éviter la renaturation des brins. Les échantillons sont complétés par 10.25µl de mélange réactionnel*. Les échantillons sont alors incubés successivement 60min à 42°C (température optimale de l'activité de l'enzyme Transcriptase réverse), 5min à 99°C afin d'inactiver l'enzyme et 5min à 0 – 5°C pour empêcher l'appariement des brins d'ADNc synthétisés. Le produit de la RT-PCR est dilué au 1/10^{ème} avec de l'eau DEPC. Les ADNc sont ensuite aliquotés et conservés à -20°C.

Matériels et méthodes

***Mélange réactionnel pour un échantillon :** 4µl de MgCl₂ à 25mM (soit 5mM final), 2µl de tampon de synthèse 10X (soit 1X final), 2µl de dNTPs à 10mM (soit 1mM final), 0.5µl d'inhibiteur de ribonucléase (soit 20 Unités), 0.75µl (soit 15 Unités) de transcriptase inverse AMV et 1µl d'Oligo(dT) à 0.5µg/µl (soit 0.025µg/µl).

V-1-3-2. Amplification des ADNc par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) :

Les produits de la RT, ADNc, sont amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR, Polymerase Chain Reaction) en utilisant des amorces oligonucléotidiques et de l'ADN polymérase thermorésistante clonée. A l'origine la Taq DNA polymérase utilisée était extraite de la bactérie *Thermophilus aquaticus*.

Cette technique permet d'amplifier de faibles quantités d'ADN in vitro. Elle impose de connaître la séquence du gène à amplifier sur laquelle s'hybrideront les amorces oligonucléotidiques de façon spécifique. Les amorces sont sélectionnées en utilisant le programme Primer3 (www.infobiogen.fr). Des tubes de 0.2 ml sont placés dans la glace, 10µl de la solution d'ADNc sont mis en présence d'une solution contenant 5µl du mélange d'amorces sens et anti-sens spécifiques du gène étudié à 5µM et 35µl du mélange réactionnel* contenant la Taq DNA polymerase (Invitrogen).

Différents cycles sont entrepris, chaque cycle comprenant 3 phases :

- Dénaturation de la matrice d'ADNc à 94°C (séparation des deux brins) ;
- Hybridation des amorces spécifiques aux extrémités 3'OH de la séquence à amplifier (la température à cette étape est spécifique de chaque couple d'amorces) ;
- Elongation des amorces dans les sens 5' → 3' en présence d'une DNA polymérase thermostable et de quatre désoxynucléotides (1 min à 72°C).

***Mélange réactionnel pour un échantillon :** 5µl de tampon de synthèse 10X (soit 1X final), 26.6µl d'eau DEPC, 3µl de MgCl₂ à 50mM (soit 3mM final), 0.4µl dNTPs à 10mM (soit 0.08mM final), 0.25 µl de Taq DNA polymerase à 5U/µl (soit 1.25U). Le volume total du mélange réactionnel est de 50 µl.

Matériels et méthodes

V-1-3-3. Contrôle et expression des résultats obtenus à partir de la RT-PCR des gènes pro et anti-apoptotiques (Caspase-3, Bax, Bcl_{x_L} et GAPDH) :

Un contrôle négatif est effectué au moyen d'un échantillon pour lequel, en début de RT, de l'eau DEPC est introduite à la place des ARN. Ce contrôle est soumis aux mêmes conditions expérimentales que les ADNc. L'obtention d'un signal indiquerait la contamination par un ARN messager étranger.

Un contrôle interne de la réaction RT est aussi réalisé en parallèle par l'amplification du gène CAT (Chloramphénicol Acetyl Transférase) (GIBCO BRL).

Un contrôle négatif de la PCR est également effectué ; de l'eau DEPC est introduite à la place des ADNc en début de PCR. Un signal obtenu indiquerait la contamination par un ADN étranger.

V-1-3-4. Amorces des gènes pro et anti-apoptotiques utilisés :

Les séquences des amorces des gènes pro-apoptotiques (Caspase-3 et Bax) et du gène anti-apoptotique (Bcl-x_L) sélectionnées grâce au programme Primer3 (www.infobiogen.fr) sont présentées dans le *tableau 3*. On amplifiera en parallèle le gène de la GAPDH (Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase) choisi comme gène ubiquitaire. Ces amorces synthétisées par GENSETOLIGO, sont obtenues à une concentration de 100µM et sont utilisées à une concentration de 0.5µM.

Matériels et méthodes

Gènes	Séquences des amorces Sens Anti-sens	Tm (°C)	Nombre de cycles d'amplification	Taille du fragment (pb)
GAPDH	5'-CTCTGCCCCCTCTGCTGATGC-3' 5'-CCATCACGCCACAGTTTCCCG-3'	60	23	234
Caspase-3	5'-GAACTGGACTGTGGCATTGA-3' 5'-GTCGGCATACTGTTTCAGCA-3'	60	33	186
Bax	5'-GGGTTGTCGCCCTTTTCTAC-3' 5'-GGTGAGGAGGCTTGAGGAGT-3'	65	35	174
Bcl-x _L	5'-GGACTGAGGCCCCAGAAGGG-3' 5'-TGGGGTGATGTGGAGCTGGG-3'	70	28	240

Tableau3 : Séquences des amorces des gènes pro et anti-apoptotiques et conditions d'utilisation.

Matériels et méthodes

V-1-4. Analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose :

Cette technique est utilisée pour analyser les ADN_C des gènes étudiés après PCR, elle est suivie de la quantification des bandes d'ADN_C mises en évidence par exposition aux UV. Cette quantification est réalisée avec l'analyseur d'images Bioprofil Vilber Lourma équipé d'une caméra qui sert à prendre les images des bandes d'ADN_C. La quantification des ADN_C pris en image se fait par le logiciel Bio1D. Le système utilise une camera monochrome CCD à haute sensibilité (10 exposant 5 lux) avec intégration du temps et mémoire équipée d'un zoom et de filtre UV/visible, couplé à un ordinateur qui permet la quantification grâce au logiciel d'analyse d'images BIO-PROFIL (BIO-1D). BIO-1D est un logiciel de traitement d'images qui permet la quantification d'électrophorèse de protéines ou d'acide nucléiques (bandes ou spots).

Principe :

Le principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose consiste à séparer les fragments d'ADN chargé négativement selon leur masse moléculaire donc leur nombre de paires de bases. La concentration du gel d'agarose doit être ajustée selon la taille des fragments à séparer. Plus la taille des fragments est petite plus la concentration doit être élevée. Le gel d'agarose est coulé à l'horizontal sur une plaque transparente aux ultraviolets.

Protocole :

2g d'agarose (EUROMEDEX DNA grade) sont dissouts dans 100ml de tampon TBE 1X (EUROMEDEX) (89mM Tris pH 7.6 ; 89mM acide borique ; 2mM EDTA). La solution est portée à ébullition, puis refroidie jusqu'à 60°C. Elle est additionnée de 5µl de Bromure d'Ethidium 10 mg/ml (GIBCO BRL) (concentration finale 0.5µg/ml). Le gel d'agarose à 2% est coulé dans une cuve (14x12cm) (FOTODYNE INCORPORATED) transparente aux UV où il se gélifie. On remplit la cuve de tampon de migration TBE 1X et on dépose dans les puits préalablement formés 20µl d'échantillon dilué dans 5µl de tampon échantillon « loading buffer* » préparé à une concentration 5X. Dans un puit parallèle on dépose 5µl de marqueur

Matériels et méthodes

de poids moléculaire à 0.1µg/µl (Ready-Load™ PhiX174 RF DNA/HaeIII fragment de 72 à 1353pb). La migration se fait pendant 1h30min à 90 volts.

Les ADN_C sont visualisés et quantifiés à l'aide de l'analyseur d'images Bioprofil (Vilber Lourma) moyennant le logiciel Bio1D.

V-2. Analyse des protéines pro et anti-apoptotiques par Western Blot :

Les protéines Bcl-x_L, Caspase-3 et Bax ont été détectées par la technique des immunoempreintes, à partir des extraits protéiques des cellules HT-29 induites ou non par 1µM de CPT et 1µM de hCPT. Cette technique a permis de mettre en évidence les protéines en combinant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à des détectations immunoenzymatiques.

Principe :

L'immunoempreinte ou Western-Blot est une méthode d'électrotransfert et de détection des protéines séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ces protéines séparées sont transférées sur une membrane de PVDF sur laquelle la détection spécifique des protéines étudiées est effectuée à l'aide d'une réaction immunologique. Un anticorps primaire reconnaît spécifiquement les antigènes immobilisés (protéines). Cet anticorps primaire est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à une enzyme transformant un substrat spécifique émettant un signal lumineux après transformation (chimiluminescence). Ce signal sera révélé sur un film (KODAK BioMax).

Réactifs :

- **Tampon de Laemmli 2X concentré :**

- SDS 4%
- Glycérol 20%
- Tris pH 8, 120mM

- **Tampon de lyse des cellules :**

- Pour 1 ml :
- Laemmli 2X : 500µl
 - Eau déminéralisée : 257µl
 - DTT 1M : 100µl

Matériels et méthodes

- Inhibiteur de protéases : 143µl

Composition de l'inhibiteur de protéases* :

- Leupeptine
- Benzamidine
- Aprotinine
- Orthophénantroline

* L'inhibiteur de protéases utilisé dans nos manipulations est un mélange de plusieurs inhibiteurs de protéases commercialisé sous forme de pastilles (Complete, Mini, EDTA-free. Roche).

Remarques :

- Le DTT (Dithiothréitol) 1M est préparé et utilisé immédiatement après préparation ou bien aliquoté et conservé à -20°C , car il est instable à des températures supérieures. Le DTT est additionné extemporanément au tampon de lyse.
- **Gel de polyacrylamide 12% (gel de séparation) :** Pour 10 ml de gel
 - Eau déminéralisée QSP 10ml : 3.4ml
 - Acrylamide 30% : 4ml
 - Tris 1.5M pH8.8 : 2.5ml
 - SDS20% : 50µl
 - Persulfate d'Ammonium 10% : 100µl
 - TEMED : 10µl
- **Gel de Polyacrylamide 4% (gel de concentration):** Pour 5 ml de gel
 - Eau déminéralisée QSP 5ml : 3.04ml
 - Acrylamide 30% : 0.650ml
 - Tris 0.5M pH6.8 : 1.25ml
 - SDS 20% : 25µl
 - Persulfate d'Ammonium 10%: 50µl
 - TEMED: 5µl
- **Tampon de migration 10X (pH 8.3):**
 - Tris Base : 30.3g (soit 250mM)
 - Glycine : 144.2g (soit 1.9M)
 - SDS : 10g
 - Eau déminéralisée : QSP 1 litre
- **Tampon de transfert :**
 - Tris Base : 3.02g (soit 25mM)
 - Glycine : 14.4g (soit 190mM)
 - Méthanol : 200ml (soit 20%)

Matériels et méthodes

- Eau déminéralisée : QSP 1 litre
- **Rouge Ponceau S (0.3%) :**
 - Ponceau S en poudre : 0.3g
 - Acide acétique pur : 1ml
 - Eau déminéralisée : QSP 100ml
- **Tampon de pré hybridation :**
 - Lait écrémé : 5g (soit 5%)
 - Tween20 : 50µl (soit 0.05%)
 - PBS 1X : 100ml
- **Tampon d'hybridation (Anticorps primaire) :**
 - Tampon de pré hybridation
 - Azide de Sodium à 0.02%
 - Anticorps primaire : sa concentration varie selon le type d'anticorps (voir le *tableau 4*).
- **Tampon d'hybridation (Anticorps secondaire) :**
 - Tampon de pré hybridation
 - Azide de Sodium à 0.02%
 - Anticorps secondaire : sa concentration varie selon le type d'anticorps (voir le *tableau 4*).
- **Tampon de lavage des membranes:**
 - PBS 1X
 - Tween 20: (0.02%)
- **Réactifs de révélation :**

Deux réactifs du kit ECL (PIERE - INTERCHIM) mélangés à volume égal en chambre noire (0.125ml/cm² de membrane). Un contact d'1 minute suffit pour l'apparition d'une fluorescence visualisant les bandes de protéines recherchées sur la membrane de PVDF.
- **bain de révélation :** (révélateur KODAK)
- **bain de fixation :** (fixateur KODAK)

Protocole :

Dix millions de cellules sont lysées dans le tampon laemmli 1X additionné de DTT et d'inhibiteurs de protéases (Complete, Mini, EDTA-free. Roche) par 3 congélations (5 min

Matériels et méthodes

à -80°C) et 2 décongelations (5 min à 100°C). La concentration protéique des échantillons est déterminée par dosage colorimétrique à l'aide du réactif commercial « Protein Assay Method » de BioRad. Les protéines totales sont concentrées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (gel de concentration à 4%) puis séparées sur gel de polyacrylamide à 12%. La concentration et la séparation des protéines totales s'effectuent à 80mA pendant 1h30min.

Après séparation, les protéines sont transférées par électrophorèse sur une membrane de PVDF à 150mA pendant 30 min à $+4^{\circ}\text{C}$.

La qualité de transfert est vérifiée par coloration au rouge ponceau S 0.3% en y incubant la membrane PVDF pendant 2h à $+4^{\circ}\text{C}$.

La membrane est lavée avec de l'eau déminéralisée et les sites non spécifiques sont saturés en incubant la membrane pendant 8h dans un tampon PBS 1X, 0.05% Tween20, 5% lait écrémé.

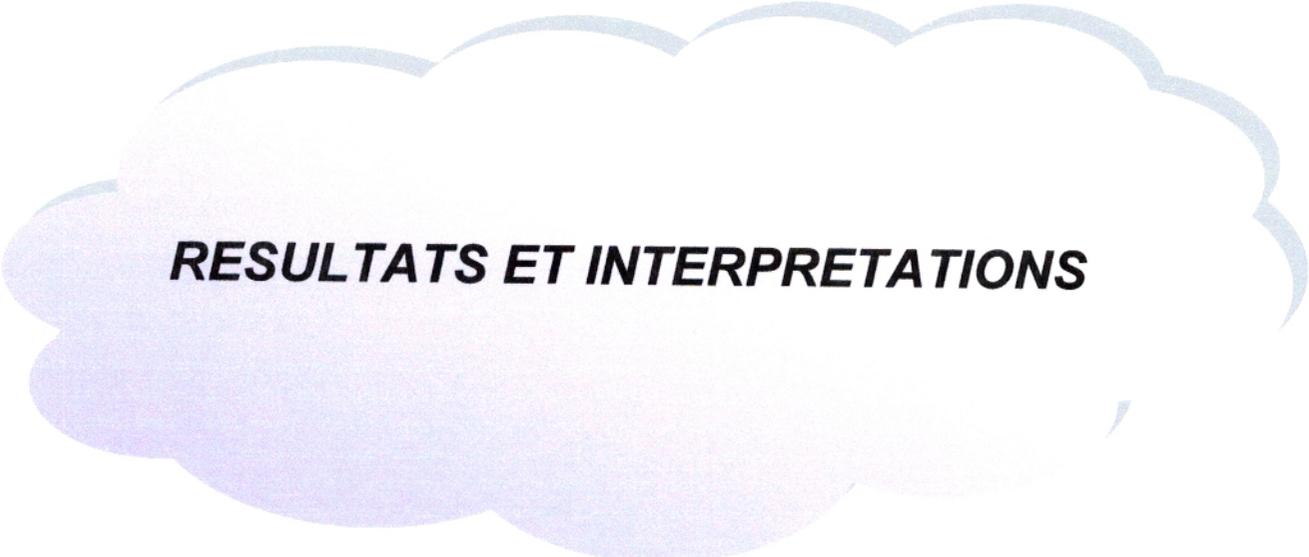
La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à $+4^{\circ}\text{C}$ en présence de l'anticorps spécifique de la protéine recherchée en solution dans du tampon PBS 1X, 0.05% Tween20, 5% lait écrémé. La membrane est lavée 3 fois 10min dans du tampon PBS1X , 0.05% Tween20, puis incubée pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire en solution dans du tampon PBS1X, 0.05% Tween20, 5% lait écrémé. La membrane est de nouveau lavée 3 fois pendant 10 min dans le tampon PBS 1X, 0.05% Tween20. La position du complexe immun sur la membrane est visualisée après action du réactif chimiluminescent ECL (PIERE – INTERCHIM) contenant le substrat de la Pyroxydase Raifort. La chimiluminescence est captée par un film KODAK Biomax à l'obscurité. Le temps de l'exposition du film au signal lumineux dans la cassette de développement est de l'ordre de 30 secondes à 1 min ou plus et varie selon l'intensité de la réaction.

Le *tableau 4* Donne les différents anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection des protéines pro et anti-apoptotiques étudiées au cours de ce travail, leurs concentrations et leurs durées d'incubation.

Matériels et méthodes

	Bax	Bcl-x_L	Caspase-3
Quantité déposée	40 µg	40 µg	40 µg
Anticorps primaire (Ac I)	Monoclonal (souris) Euromedex	Monoclonal (souris) Interchim	Monoclonal (souris) Interchim
Concentration de la solution de l'Ac I	100 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml
Dilution de la solution de l'Ac I	1/200	1/800	1/500
Concentration définitive de l'Ac I	0,5 µg/ml	0,3 µg/ml	1 µg/ml
Durée d'incubation avec l'Ac I	1 nuit à +4°C	1 nuit à +4°C	1 nuit à +4°C
Anticorps secondaire (Ac II)	Ac chèvre Anti souris Euromedex	Ac chèvre Anti souris Euromedex	Ac chèvre Anti souris Euromedex
Concentration de la solution mère de l'Ac II	2 mg/ml	2 mg/ml	2 mg/ml
Dilution de la solution mère de l'Ac II	1/1000	1/1000	1/1000
Concentration définitive de l'Ac II	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml
Durée d'incubation avec l'Ac II	1H30	1H30	1H30

Tableau 4: Protocole d'immunoempreinte.



RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Chapitre I

**Etude de l'expression des gènes et des protéines pro et anti-apoptotiques
dans les cellules HT29 traitées par la CPT et la hCPT**

Résultats et interprétations

I - Expression des gènes pro et anti-apoptotiques:

Les cellules HT-29 sont traitées avec 1 μ M de CPT ou 1 μ M de hCPT pendant 5 heures. Le milieu est renouvelé pour éliminer la drogue, les cellules sont remises en culture pour étudier les temps 24 et 48 heures. Pour le temps 5 heures, les ARNm sont extraits aussitôt la fin du traitement. Les ARNm sont extraits à la fin de chaque incubation et quantifiés. La qualité des ARN est vérifiée par migration sur un gel d'agarose avant d'être reverse transcrit.

I-1. Expression de l'ARNm du gène caspase-3

Pour des temps précoces de l'ordre de 5 heures, la quantité de caspase-3 exprimée n'est pas modifiée par rapport au témoin. Par contre à partir de 24 heures, les résultats de RT-PCR montre une augmentation de son expression identique quelque soit le traitement CPT ou hCPT. Cette « up-regulation » est encore plus importante au temps 48 heures pour les deux drogues.

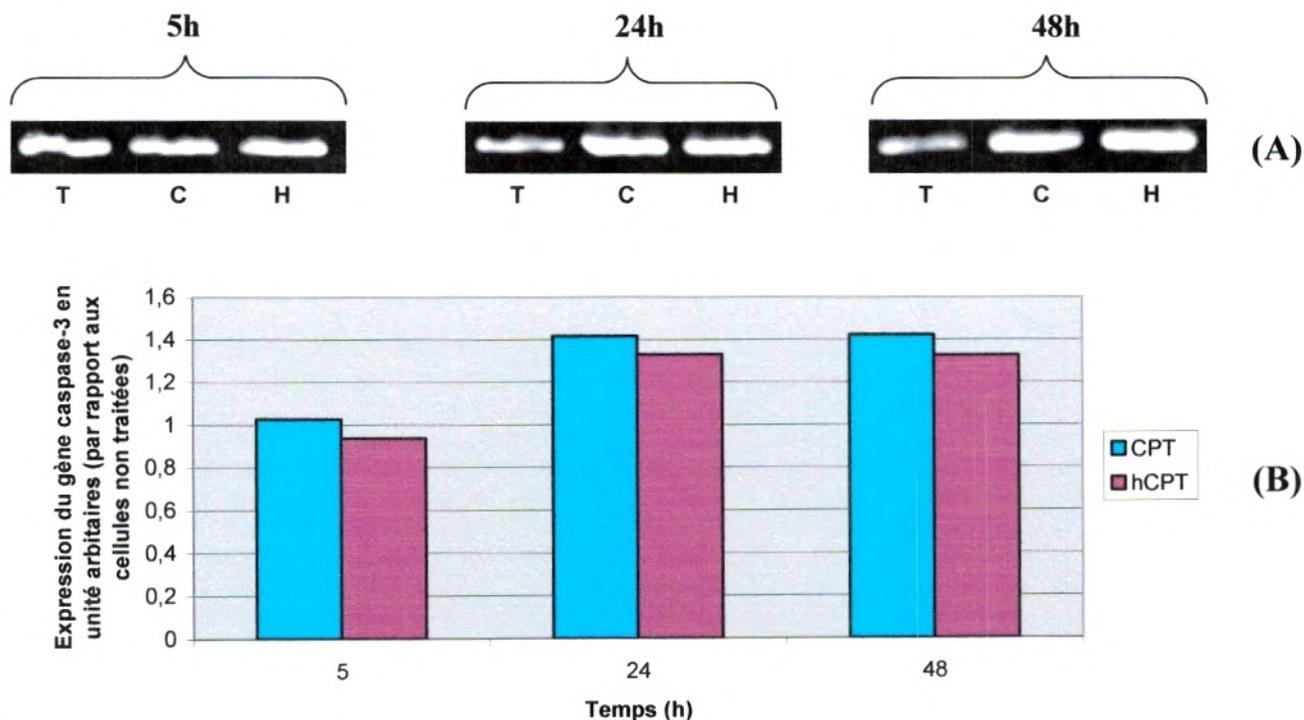


Figure 15: A/ Profils d'expression du **gène Caspase-3** dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1 μ M de CPT (C) ou de hCPT (H) ont été déterminés par RT-PCR.

B/ Quantification : les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.

Résultats et interprétation

I – 2. Expression de l'ARNm du gène pro-apoptotique Bax

Les résultats de RT-PCR concernant le suivi de l'expression du gène pro-apoptotique Bax montre une légère augmentation de son expression dès 5 heures de traitement par la CPT ou la hCPT. Cette augmentation de production du gène Bax se poursuit au cours du temps et atteint des valeurs voisines de 2 au temps 24 heures et entre 2,5 et 3 au temps 48 heures par rapport à celles observées pour les cellules non traitées.

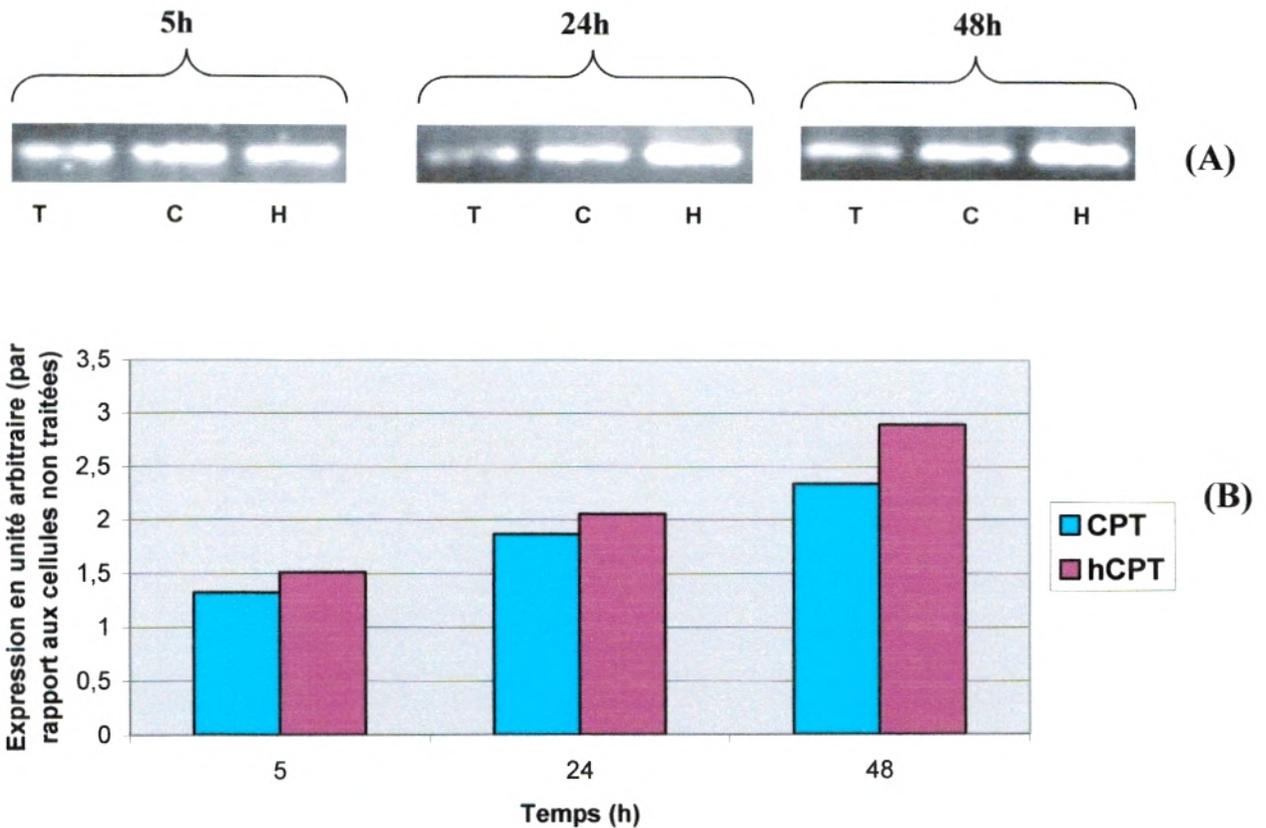


Figure 16: A/ Profils d'expression du **gène Bax** déterminés par RT-PCR dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par $1\mu\text{M}$ de CPT (C) ou de hCPT (H) ont été déterminés par RT-PCR.

B/ Quantification : les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.

Résultats et interprétation

I-3. Expression de l'ARNm du gène anti-apoptotique *Bcl-x_L*

Le profil d'expression du gène anti-apoptotique *Bcl-x_L* montre une diminution dès 5 heures de traitement qui se poursuit de manière plus significative aux temps 24 et 48 heures. Par ailleurs, nous constatons que cette « down-regulation » est plus prononcée pour la CPT que pour la hCPT.

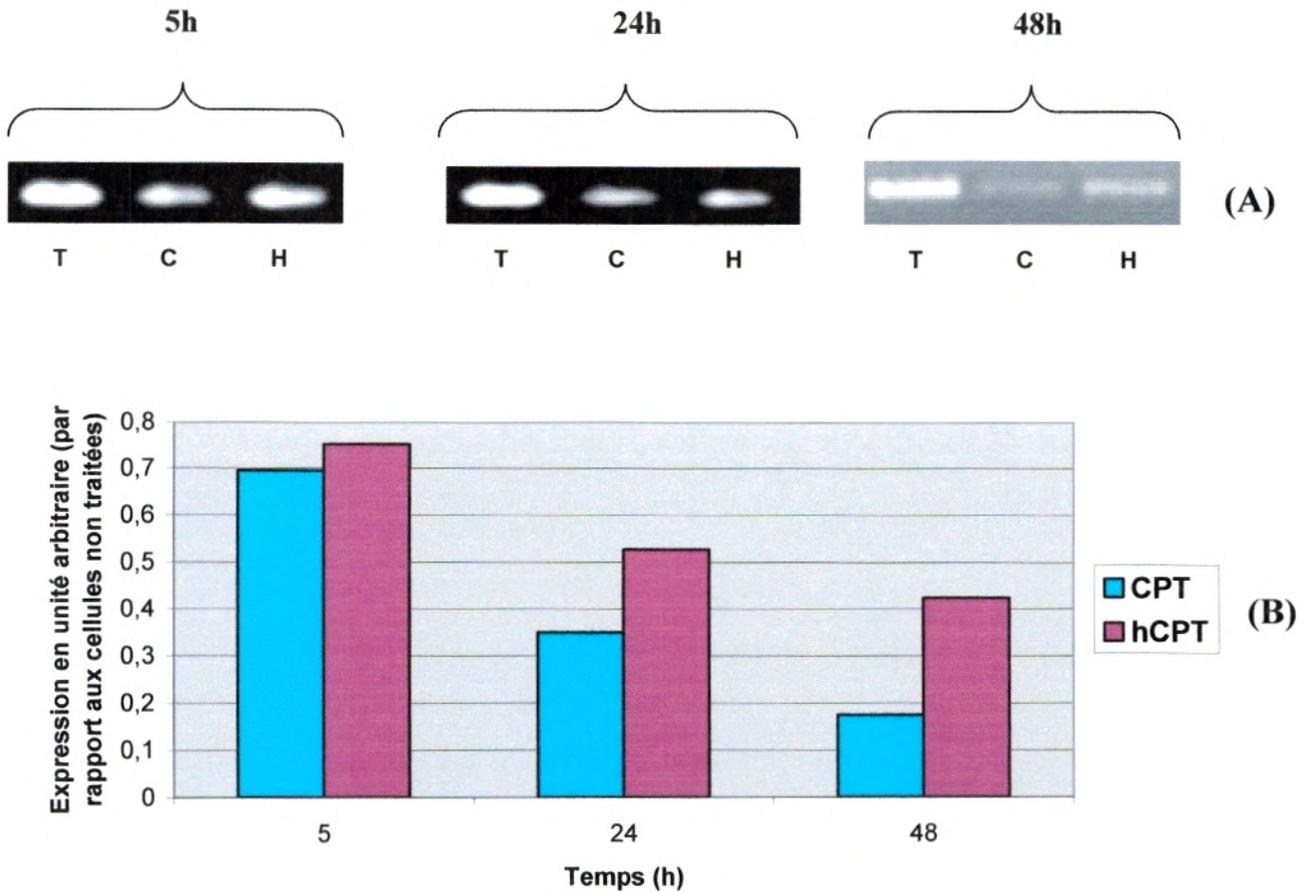


Figure 17: A/ Profils d'expression du gène *Bcl-x_L* dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1µM de CPT (C) ou hCPT (H) ont été déterminés par RT-PCR.

B/ Quantification : les résultats sont exprimés en unités arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.

Résultats et interprétation

I-4. Bilan récapitulatif de l'expression des gènes pro et anti-apoptotiques:

Globalement si on compare les profils d'expression des gènes pro-apoptotiques (Bax et casp-3) induits au cours du traitement par la CPT ou la hCPT aucune différence significative entre les deux drogues ne peut être observée. Les cellules HT-29 répondent de manière identique aux traitements par la CPT ou la hCPT.

Par contre nous notons une légère différence dans l'expression du gène Bcl-x_L entre la CPT et la hCPT pour tous les temps de traitement. Avec une « down-regulation » plus prononcée pour la CPT que pour la hCPT.

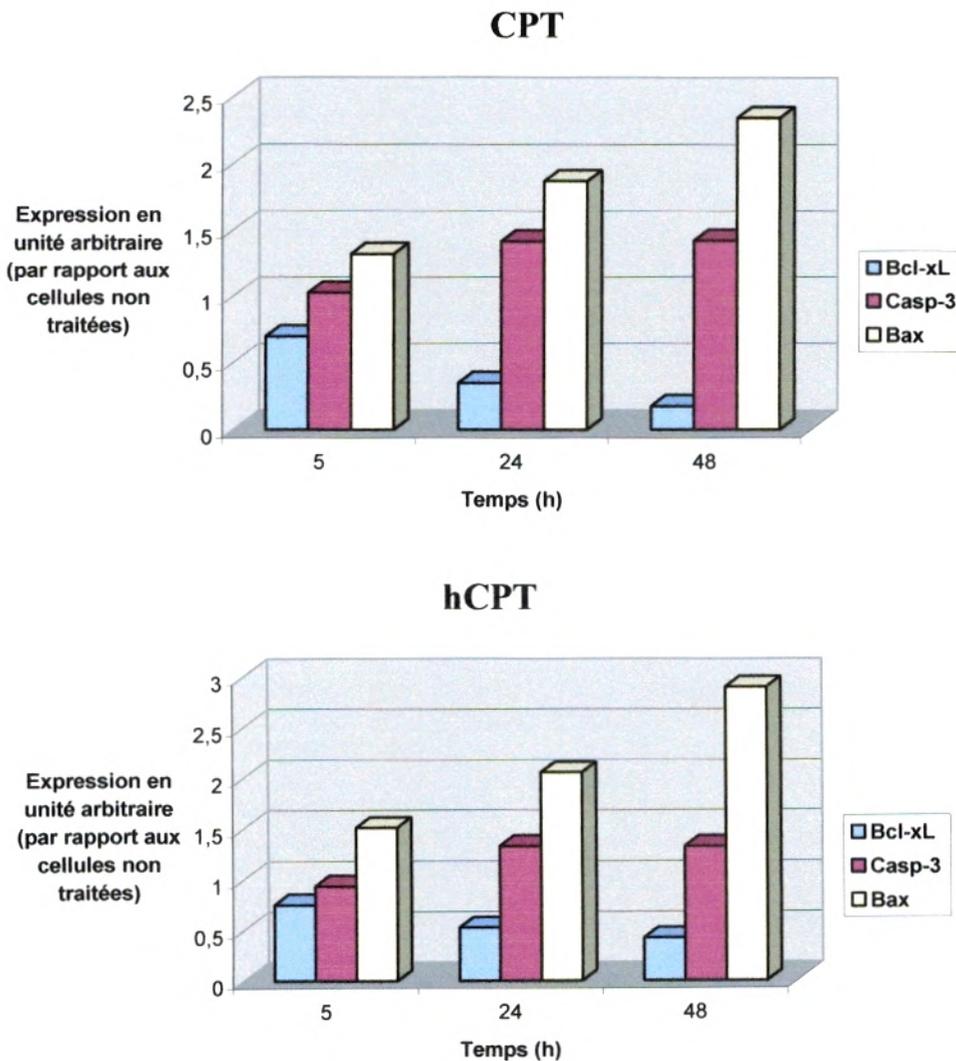


Figure 18: Bilan récapitulatif de l'expression des gènes pro et anti-apoptotiques après traitement avec la CPT et la hCPT. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées. .

Résultats et interprétation

II- Expression des protéines pro et anti-apoptotiques:

Les cellules HT-29 sont traitées avec 1 μ M de CPT ou 1 μ M de hCPT pendant 5 heures. Le milieu est changé au terme de l'incubation. Pour le temps 5 heures les protéines sont extraites aussitôt la fin de traitement pour subir le Western Blot. Pour les temps 24 et 48 heures. Le protocole de culture est identique à celui décrit pour les ARNm. A la fin de chaque période d'incubation les protéines sont extraites, les lysats cellulaires sont quantifiés et 40 μ g de protéines totales sont analysées par la technique de Western Blot. Selon le protocole décrit dans la partie matériel et méthodes.

II-1. Analyse de l'activation de la caspase-3 :

La protéine caspase-3 est fortement exprimée dans la lignée HT-29. Après 5 heures de traitement, on voit apparaître une légère bande à 20Kd qui correspond au clivage de la procaspase-3 en forme active. L'intensité de la forme active augmente avec le temps de traitement de manière équivalente tant pour la CPT que pour la hCPT (figure 19).

Résultats et interprétations

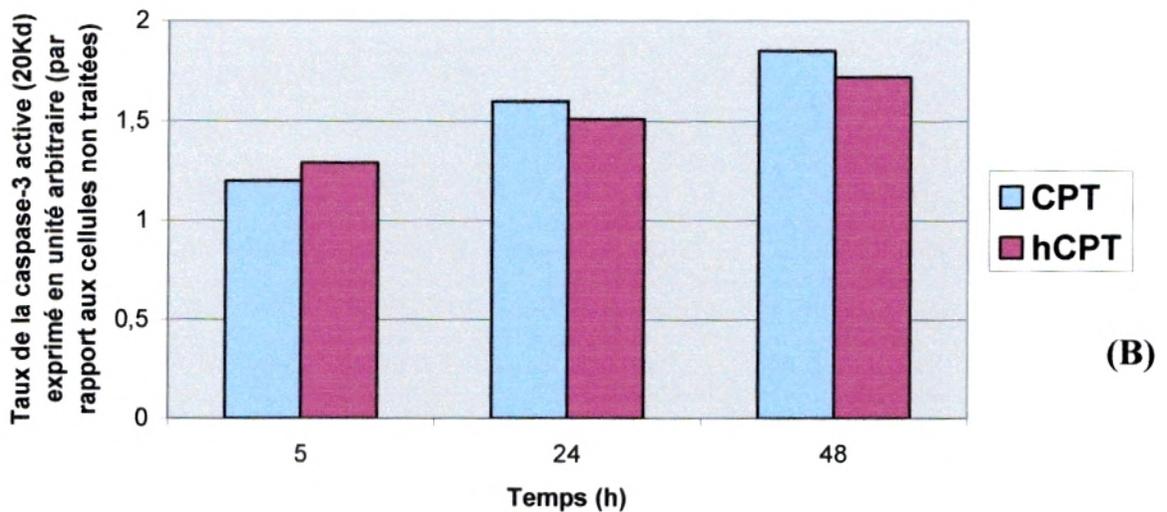
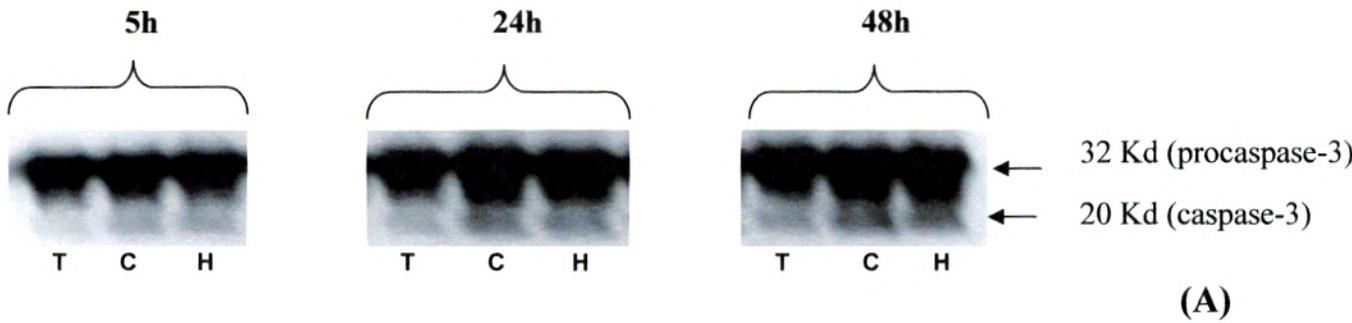


Figure 19: A/ Profils d'expression de **la protéine caspase-3** dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par $1\mu\text{M}$ de CPT (C) ou hCPT (H). Les protéines totales sont analysées par Western Blot et la caspase-3 activée est révélée par un anticorps monoclonal qui reconnaît la forme pro et la forme clivée active.

B/ Quantification : les résultats donnent le taux de **la caspase-3 active (20Kd)** et sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.

Résultats et interprétations

II-2. Analyse de l'expression de la protéine Bax :

La quantité de protéine Bax est faible dans la lignée HT-29. Toute fois, le taux d'expression de la protéine Bax augmente dès 5 heures de traitement pour les deux drogues et continue à augmenter progressivement aux temps 24 et 48 heures.

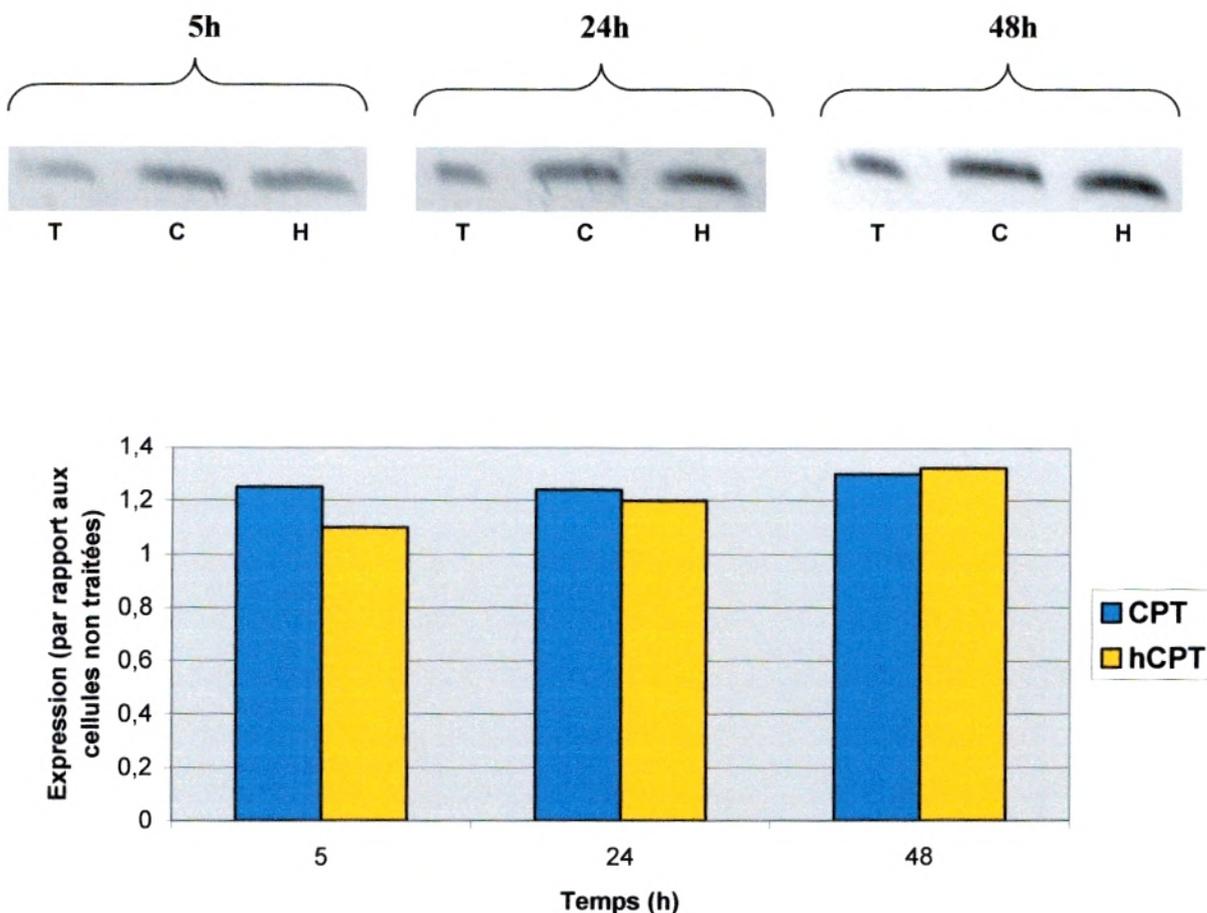


Figure 20: A/ Profils d'expression de la protéine Bax dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1µM de CPT (C) ou hCPT (H). Les protéines totales sont analysées par Western Blot et la protéine Bax est révélée par un anticorps monoclonal.

B/ Quantification : les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.

Résultats et interprétations

II-3. Analyse de l'expression de la protéine Bcl-x_L :

La protéine Bcl-x_L est exprimée à l'état basal et ne varie pas après 5 heures de traitement par la CPT. Cependant l'expression de la protéine Bcl-x_L, diminue dès 5 heures de traitement par la hCPT. Cette diminution se poursuit pour le temps 24 heures et devient plus marquée au temps 48 heures pour la CPT et la hCPT.

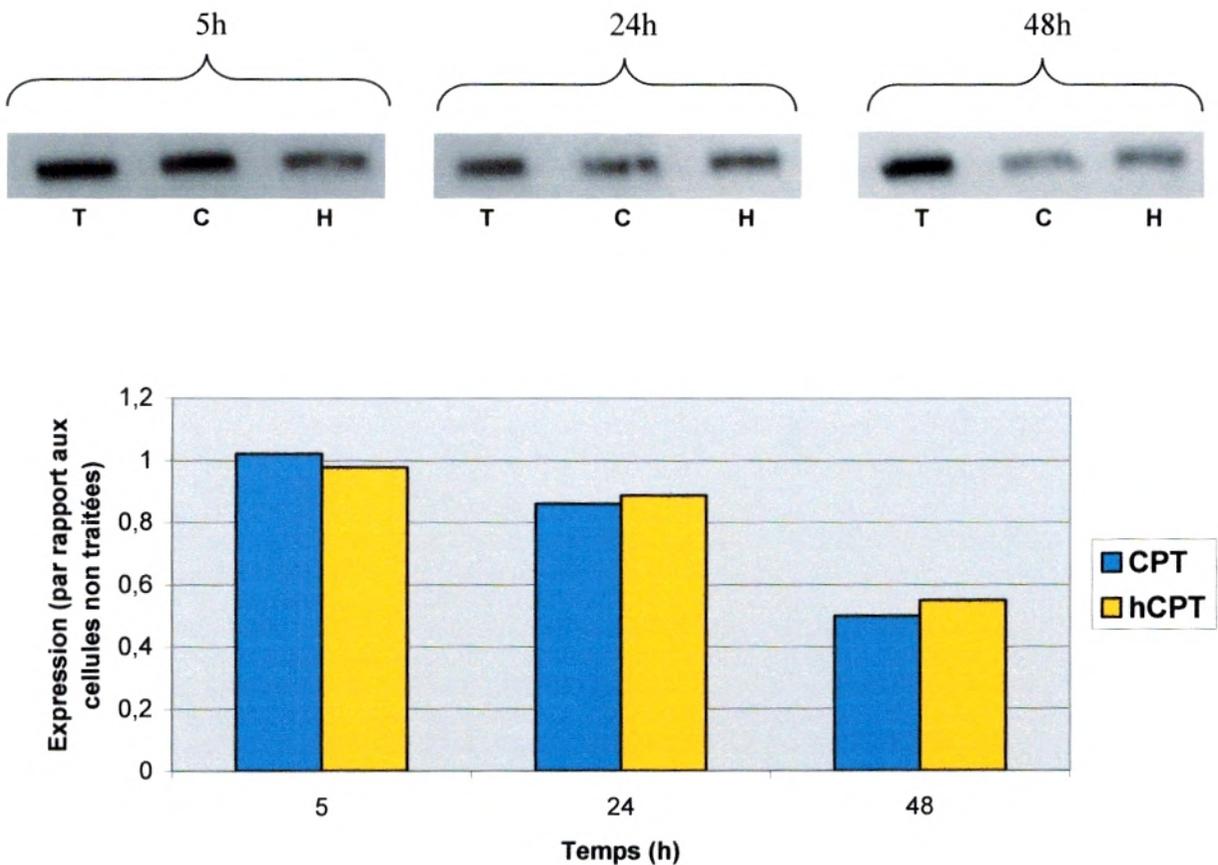


Figure 21: A/ Profils d'expression de la protéine Bcl-x_L dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par 1 μ M de CPT (C) ou hCPT (H). Les protéines totales sont analysées par Western Blot et la protéine Bcl-x_L est révélée par un anticorps monoclonal.

B/ Quantification : les résultats sont exprimés en unité arbitraire par rapport aux cellules non traitées et sont le reflet de 3 expériences reproductibles.

Résultats et interprétations

Chapitre II

La protéine Bcl-2 protège les cellules HT-29 de l'apoptose induite par la CPT

Résultats et interprétations

I- Induction de l'apoptose par la CPT chez les cellules HT29, les HT29-Bcl2 et les HT29-Vec:

Pour tester la voie mitochondriale et préciser le rôle de la balance Bcl-2 / Bax nous avons étudié l'induction de l'apoptose par CPT dans les cellules HT-29 surexprimant la protéine Bcl-2 (HT29-Bcl2).

L'induction de l'apoptose représente moins de 20% après un traitement de 24 heures par la CPT pour les trois types cellulaires HT-29, HT29-Vec et HT29-Bcl2. A partir de 48 heures, l'apoptose augmente dans les cellules HT-29 et HT29-Vecteur et atteint environ 60% après 96 heures. L'apoptose n'excède les 20% dans les HT29-Bcl2 même après 96 heures de traitement. Le taux d'apoptose chez les HT-29 et les HT29-Vec est environ 3 fois supérieur à celui obtenu pour les HT29-Bcl2 au bout du 4^{ème} jour de traitement (*figure 22*).

Ces résultats suggèrent l'effet protecteur de Bcl-2 dans l'induction du processus apoptotique et qui devra être confirmé par des expériences complémentaires.

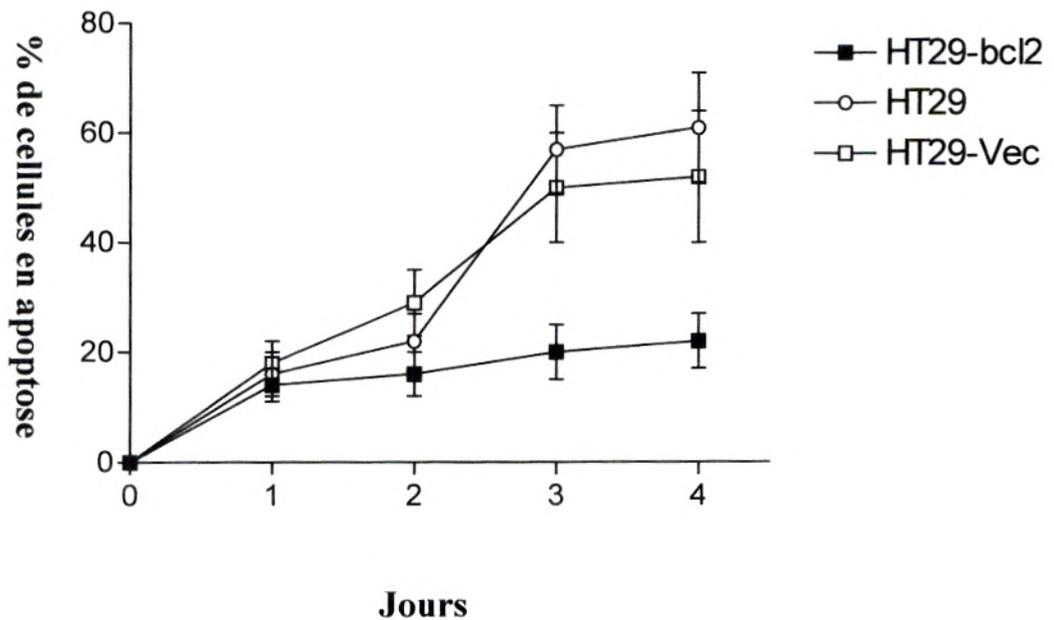


Figure 22: Induction de l'apoptose par la CPT dans les cellules HT29, HT29-Bcl2 et HT29-Vecteur. Le milieu est changé au terme de 5 heures d'incubation avec 1 μ M de CPT. L'apoptose est déterminée après 1, 2, 3 et 4 jours de la fin du traitement.

Résultats et interprétations

II- Tests de cytotoxicité de la CPT et du HA14-1 sur les cellules HT29-Bcl2 et les HT29-Vec:

Dans le but de confirmer le rôle protecteur de Bcl-2 dans l'induction du processus apoptotique, nous avons utilisé la HA14-1, un ligand de Bcl-2, qui inhibe l'hétérodimérisation de Bcl-2 avec Bax (Olivier et coll., 2007) et favorise donc l'induction d'apoptose.

Nous avons déterminé les concentrations de HA14-1 et le temps nécessaire pour obtenir un effet apoptotique sans toxicité cellulaire.

Dans la lignée HT29-Vec, à la concentration de 10 μ M pendant 48 heures, le HA14-1 n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire (résultat identique à 72 heures non montré). Ce ligand est peu toxique puisque pour 20 μ M pendant 72 heures la toxicité n'atteint pas les 20% (*figure 23*).

Dans la lignée HT29-Bcl2, les résultats sur la prolifération cellulaire sont identiques à ceux obtenus avec la lignée HT29-Vec (*figure 24*).

Etant donné que pour les études précédentes, le temps de traitement par 1 μ M de CPT était de 5 heures, nous avons vérifié la toxicité de la CPT pour 48 heures d'incubation. Quelque soit la lignée, à la concentration de 1 μ M, la CPT ne présente pas de toxicité significative (moins de 5%) (*figure 24*).

Ces résultats nous ont permis de fixer les temps d'incubation ainsi que les concentrations de médicament qui seront utilisés pour étudier l'apoptose des cellules HT29-Bcl2 et les cellules HT29-Vecteur. Nous utiliserons donc 1 μ M de CPT et / ou 10 μ M de HA14-1 pendant 48 heures d'incubation.

Résultats et interprétations

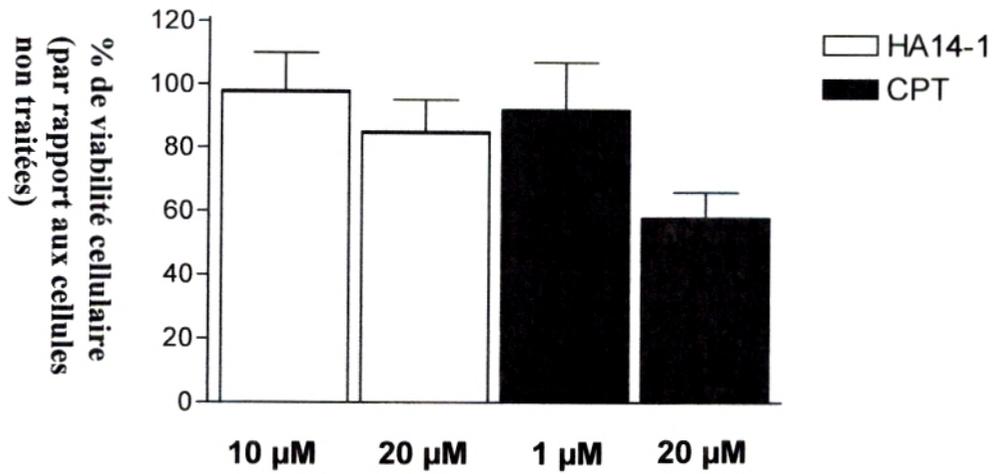


Figure 23: Cytotoxicité de la CPT et de HA14-1 sur les cellules HT29-Vec traitées pendant 48 heures.

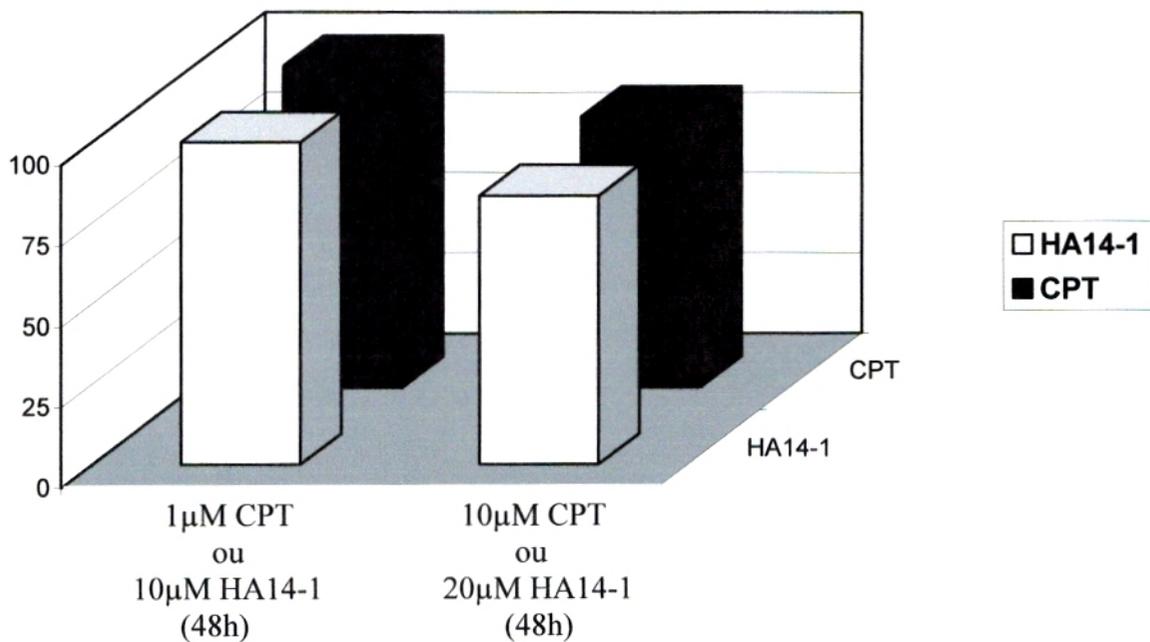


Figure 24: Cytotoxicité de la CPT et de HA14-1 dans les cellules HT29-Bcl2 traitées pendant 48 heures.

Résultats et interprétations

III- Induction de l'apoptose par la CPT et HA14-1 dans les cellules HT29-Bcl2 et HT29-Vec:

La *figure 25* montre l'induction de l'apoptose dans les cellules HT29-Bcl2 et les cellules HT29-Vec par la CPT à 1 μ M et/ ou 10 μ M de HA14-1 pendant 48 heures d'incubation. L'apoptose est déterminée à 72h après traitements.

Dans les HT29-Bcl2, le HA14-1, restaure l'apoptose à un taux environ 2,5 fois supérieur par rapport à celui induit dans les HT29-Vec.

L'apoptose induite par la CPT dans les HT29-Bcl2 est deux fois moins importante par rapport à celle induite pour les cellules HT29-Vec.

Dans la lignée HT29-Bcl2, l'association des deux médicaments donne un effet additif. Le taux de cellules apoptotiques atteint plus de 50% comme le montre la figure 11. Par contre dans les cellules HT29-Vec, cette association provoque 100% de mortalité, et c'est la raison pour laquelle l'apoptose induite par l'association dans les cellules HT29-Vec n'est pas représentée sur la *figure 25*.

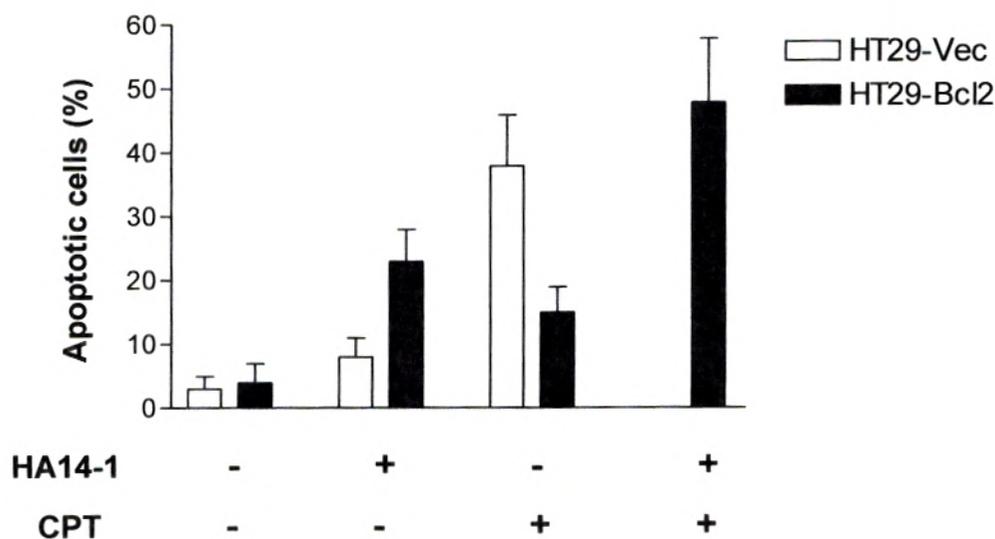


Figure 25: Induction de l'apoptose par la CPT et le ligand de Bcl-2 (HA14-1) dans les cellules HT29-Vecteur et HT29-Bcl2. Le milieu est changé au terme de 48 heures d'incubation avec 1 μ M de CPT et/ou 10 μ M de HA14-1. L'apoptose est déterminée à 72 heures depuis le début de traitement.

Chapitre III

**Etude de l'implication de la voie Fas dans l'apoptose induite par la CPT dans
les cellules HT29**

Résultats et interprétations

I- Activation des protéines Bid, caspase-8 et caspase-3 pendant l'apoptose induite par la CPT dans les HT29 :

Au bout de 24 heures de traitement des cellules HT-29 par la CPT la caspase-8 n'est pas activée, ce qui exclut la participation de la caspase-8 (qui permet l'interconnection entre la voie extrinsèque et intrinsèque) dans l'induction du processus apoptotique (*figure 26*).

De même l'étude du clivage de Bid cible de la caspase-8 n'est pas modifié au cours de l'induction du processus apoptotique ce qui confirme la non participation de la caspase-8 dans l'induction de l'apoptose par la CPT (*figure 27*).

Par contre le profil d'expression de la caspase-3 montre une activation de cette dernière dès 5 heures de traitement avec la CPT, ce qui indique l'engagement des cellules HT-29 dans le processus apoptotique malgré l'absence de l'activation de la caspase-8 et de la protéine Bid (*figure 28*).

Résultats et interprétations

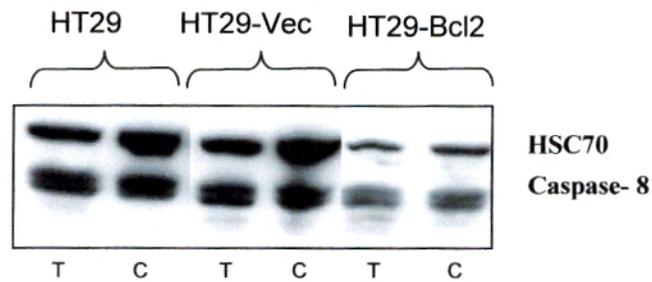


Figure 26: Profils d'expression des **protéines HSC70 et caspase-8** dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par $1\mu\text{M}$ de CPT (C) ont été déterminés par Western Blot.

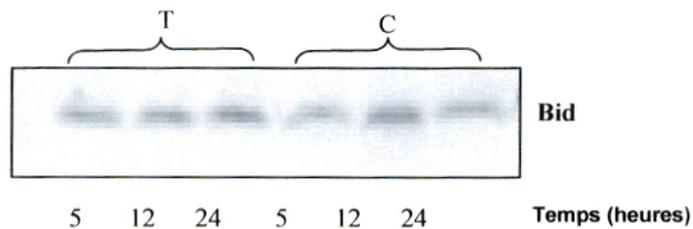


Figure 27: Profils d'expression de la **protéine Bid** dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par $1\mu\text{M}$ de CPT (C) ont été déterminés par Western Blot.

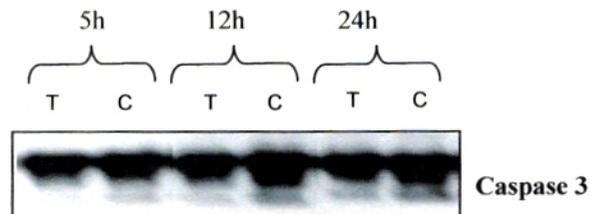


Figure 28: Profils d'expression de la **protéine caspase-3** dans les cellules HT29 sans traitement (T) et après traitement par $1\mu\text{M}$ de CPT (C) ont été déterminés par Western Blot.



DISCUSSION

Discussion

I- Etude de l'expression des gènes et des protéines pro et anti-apoptotiques dans les cellules HT29 traitées par la CPT et la hCPT.

Le cancer colorectal est une cause de mortalité très importante (Cohen et coll., 1997). La plupart des patients présentent des cancers localement avancés ou des métastases non-opérables. Ainsi, en plus de la chirurgie, la chimiothérapie a pris de l'importance dans le traitement de ces tumeurs solides.

De nouveaux médicaments de plus en plus efficaces sont développés. Le 5-fluorouracile, seul ou associé à l'acide folinique, méthotrexane ou leucovorone est le traitement le plus utilisé contre le cancer colorectal, il présente une grande efficacité contre ce cancer (Mc Cann, 1998). Par contre le CPT-11, un dérivé de CPT, induit un meilleur taux de réponse dans le traitement de 1^{ère} ligne du cancer colorectal (Douillard et coll., 2000) et dans le traitement de 2^{ème} ligne des patients résistants au 5-fluorouracil (Mitry et coll., 1998).

Depuis sa mise au point par l'institut Henri Beaufour en 1997, la hCPT (BN80767), a été le sujet de plusieurs études comparatives avec le CPT. Prévost et coll. en 2001, ont prouvé que la hCPT possède une activité anti-proliférative contre les cellules HT-29 en culture (Prévost et coll., 2001). La hCPT est plus cytotoxique que la CPT à l'encontre des tumeurs de côlon issues d'une résection chirurgicale et maintenues en culture (Philippart et coll., 2000). Il a été montré par Lavergne et coll. que la forte cytotoxicité de la hCPT est liée à l'inhibition mixte de la topoisomérase I et II dans les cellules HT-29 (Lavergne et coll., 1999). Cette activité est sans précédent pour les molécules de la série des CPTs (Bastow et coll., 1997).

Dans ce travail, nous avons réalisé une étude comparative entre CPT et hCPT, sur le plan de l'expression des gènes et des protéines pro et anti-apoptotiques.

La comparaison des profils d'expression des gènes pro-apoptotiques (Bax et Casp-3), montre que les cellules HT-29 répondent de manière identique aux traitements par les deux médicaments (*figure 18*). Par contre nous notons une légère différence dans l'expression du gène Bcl-x_L, qui est sous exprimé d'une manière plus prononcée pour la CPT que pour la hCPT.

Quant à l'étude de l'expression des protéines pro et anti-apoptotiques, elle montre que la protéine pro-apoptotique casp-3 est fortement exprimée dans la lignée HT-29 même sans traitement, mais que son activation n'est effective qu'après 5 heures de traitement avec les

Discussion

deux médicaments. Cette activation devient de plus en plus importante à des temps plus longs, sans marquer une différence significative entre les deux médicaments.

L'analyse de l'expression de la protéine Bax montre que sa quantité augmente dans les cellules HT-29 dès 5 heures de traitement avec des taux presque identiques pour la CPT et la hCPT.

La protéine Bcl-x_L qui joue un rôle identique à Bcl-2, semble diminuer plus rapidement dans les cellules traitées par la hCPT comparées aux cellules traitées par la CPT. Ces résultats demanderaient confirmation mais sont en faveur d'une efficacité de la hCPT accrue probablement du fait d'une meilleure stabilité de la molécule in vivo.

D'une manière globale, nous pouvons dire que l'expression des gènes et des protéines pro et anti-apoptotiques étudiés dans les cellules HT-29 ne présente aucune différence significative après traitement avec la CPT ou la hCPT.

II- La protéine Bcl-2 protège les cellules HT-29 de l'apoptose induite par la CPT.

La protéine Bcl-2 est un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2. Elle empêche le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme et par conséquent l'activation de la caspase-3 qui dépend de l'activation de la caspase-9 (Yang et coll., 1997 ; Shimizu et coll., 1999). Bcl-2 est normalement non exprimée dans les cellules HT-29. Les résultats de l'étude utilisant les cellules HT-29 surexprimant le gène Bcl-2, ainsi que le ligand de la protéine Bcl-2 (HA14-1) (Olivier et coll., 2007), sont en faveur du rôle protecteur de Bcl-2 dans l'apoptose induite par la CPT dans les cellules HT-29 en culture. Nos résultats appuient les résultats des travaux menés par Chauvier et coll. (Chauvier et coll., 2002) qui montrent clairement le rôle central de la mitochondrie dans l'apoptose induite par la CPT dans les cellules HT-29.

III- Etude de l'implication de la voie Fas dans l'apoptose induite par la CPT dans les cellules HT29.

La molécule Bid, un membre de la famille Bcl-2, constitue l'un des liens connus entre la voie du récepteur Fas et la voie mitochondriale (Li et coll., 1998). Dans les cellules

Discussion

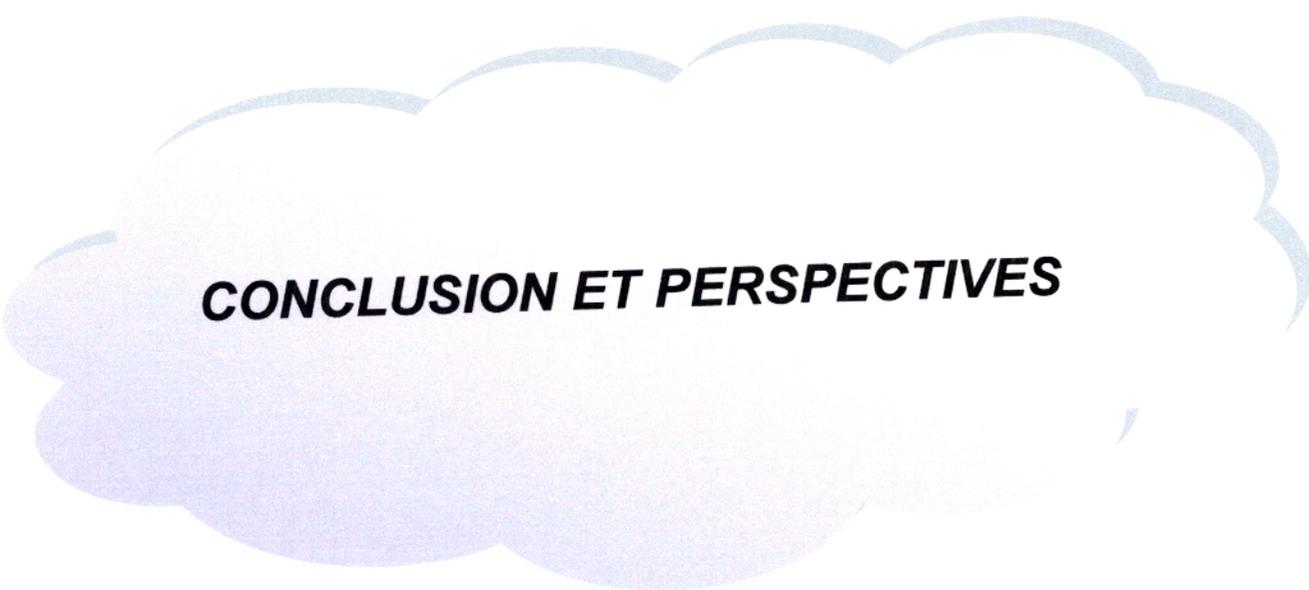
de type I, Bid est clivé par la caspase-8 préalablement activée au niveau du DISC (Death Inducing Signaling Complex). Un fragment de Bid va se lier à Bax pour favoriser la formation d'homodimères Bax-Bax (Roucou et coll., 2002).

La figure 26 montre que la caspase-8 n'est pas activée après 24 heures de traitement avec la CPT, et ce dans toutes les lignées étudiées (HT29, HT29-Vec et HT29-Bcl2). De même, Bid n'est pas clivé dans les cellules HT-29 traitées par la CPT. Ce qui confirme la non implication de la voie Fas via l'activation de la casp-8 et le clivage de Bid dans le processus apoptique induit par la CPT.

En revanche les profils d'expression de la casp-3 montrent que cette dernière est activée dès 5 heures de traitement. L'activation de la casp-3 est donc antérieure à l'activation de la casp-8 et au clivage de Bid.

Vu les données actuelles, l'apoptose induite dans les cellules HT-29, par le traitement avec la CPT, passerait directement par la voie mitochondriale, ce qui place les cellules HT-29 dans le rang des cellules de types II. Les résultats de nos travaux contrastent avec d'autres études qui ont montré que l'apoptose induite par la CPT dans les cellules HT-29 passe par l'activation de la voie Fas via l'activation de la casp-8 (Shao et coll., 2001).

Ces divergences pourraient s'expliquer par des modifications des lignées cellulaires en culture. Ces résultats demanderaient confirmation.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

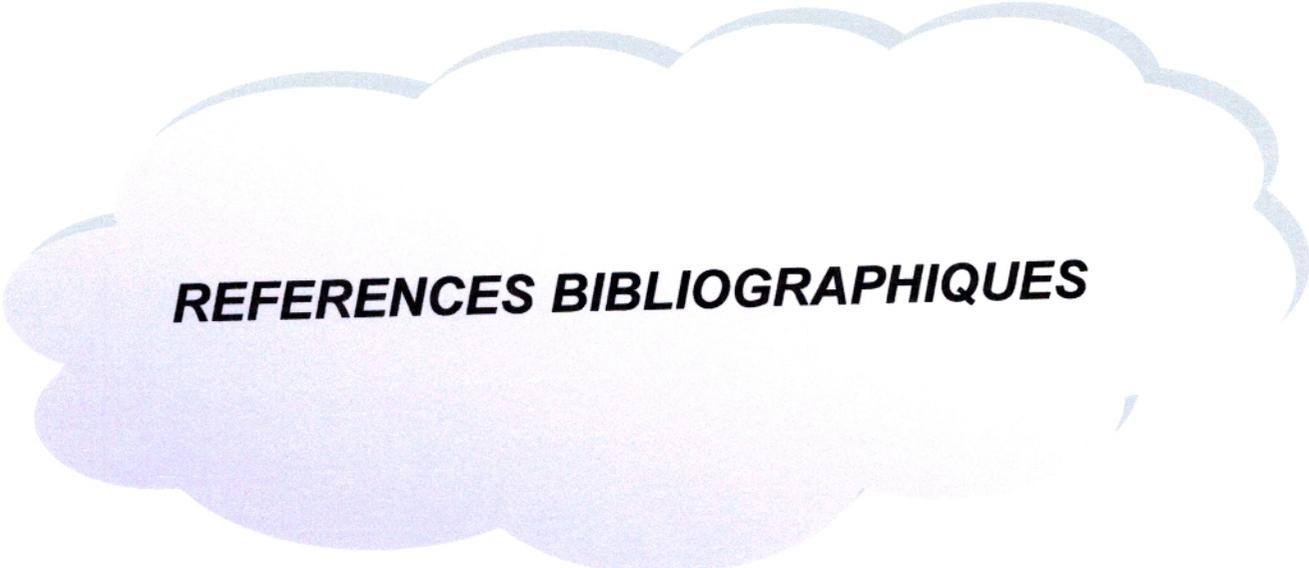
Conclusion et perspectives

La CPT et la hCPT induisent une cytotoxicité significative dans les cellules HT-29. hCPT induit une apoptose plus importante que la CPT (Chauvier et coll., 2002). Sur le plan génique et protéique, pour les gènes et protéines Bax, Bcl-x_L et casp-3, les cellules HT-29 répondent de manière identique aux traitements par la CPT et la hCPT. L'inhibition mixte de la topoisomérase I et II par la hCPT (Bastow et coll., 1997) pourrait causer plus de dommages à l'ADN que la CPT, ce qui est en faveur de l'efficacité accrue de la hCPT. Les phénomènes mitochondriaux précoces associés à l'induction de l'apoptose, notamment la chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_{mt}$), la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO), l'acidification du cytosol, ainsi que la meilleure stabilité de la hCPT *in vivo* pourraient expliquer cette différence d'apoptose.

L'effet protecteur de la protéine Bcl-2 dans l'apoptose induite par la CPT dans les cellules HT-29, confirme les résultats des travaux de Chauvier et coll. qui démontrent que la mitochondrie joue un rôle central dans l'apoptose induite par la CPT dans les cellules HT-29.

Ces travaux contrastent avec l'étude menée par Shao et coll. (Shao et coll., 2001) qui stipule que l'apoptose induite par la CPT dans les cellules HT-29 empreinte la voie Fas via l'activation de la caspase-8. D'un autre côté l'étude de Kaufmann démontre que ces deux voies peuvent s'entrecroiser (Kaufmann et coll., 2000), suggérant que l'ensemble de ces observations n'est pas incompatible. Notre travail démontre que Bid n'est impliqué dans le processus apoptotique induit par la CPT dans les cellules HT-29, ce qui laisse un grand point d'interrogation, à savoir si le récepteur Fas est indispensable à l'apoptose induite par la CPT dans les cellules HT-29 (Shao et coll., 2001).

La question posée : existe-t-il un autre acteur liant le récepteur de mort Fas et la mitochondrie, et si oui, lequel ?



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

ALGECIRAS-SCHIMNICH A, SHEN L, BARNHART BC, MURMANN AE, BURKHARDT JK, PETER ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell. Biol.* 2002, 22, 207-20.

AMEISEN J-C. Le suicide des cellules. *Pour la science*, 1996, 224, 52-59.

ANURADHA CD, KANNO S, HIRANO S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31, 367-373.

B

BAILLY C, LANSIAUX A, DASSONNEVILLE L, DEMARQUAY D, COULOMB H, HUCHET M, LAVERGNE O, BIGG DCH. Homocamptothecin, an E-ring-modified analogue, generates new topoisomerase I-mediated DNA breaks. *Biochemistry*, 1999, 38, 15556-15563.

BASANEZ G, NECHUSHTAN A, DROZHININ O, CHANTURIYA A, CHOE E, TUTT S, WOOD KA, HSU Y, ZIMMERBERG J, YOULE RJ. Bax, but not Bcl-x_L, decrease the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 1999, 96, 5492-5497.

BASTOW KF, WANG HK, CHENG YC, LEE KH. Antitumor agents CLXXIII. Synthesis and evaluation of camptothecin-4 beta-4'-O-demethyl epipodophyllotoxin conjugates as inhibitors of mammalian DNA topoisomerases and as cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem*, 1997, 5, 1481-1488

Références bibliographiques

BERNARDI P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1996, 1275, 5-9.

BERTRAND R, O'CONNOR PM, KERRIGAN D, POMMIER Y. Sequential administration of camptothecin and etoposide circumvents the antagonistic cytotoxicity simultaneous drug administration in slowly growing human colon carcinoma HT-29 cells. *Eur J Cancer*, 1992, 28A, 743-748.

BETTAIEB A, SORDET O, BELON JP, SOLARY E. Apoptose chimiothérapie. *Bulletin du Cancer*, 1999, 86, 41-46.

BEUTNER G, RUCK A, RIEDE B, WELTE W, BRDICZKA D. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat resemble the permeability transition pore. *FEBS Letters*, 1996, 396, 189-195.

BEUTNER G, RUCK A, RIEDE B, BRDICZKA D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1998, 1368, 7-18.

BICKNEL GR, COHEN GM. Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 207, 40-47.

BOLDIN MP, VARFOLOMEEV EE, PANCER Z, METT IL, CAMONIS JH, WALLICH D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 7795-8.

BRATTON DL, FADOK VA, RICHTER DA, KAILY JM, GUTHRIE LA, HENSON PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272, 261159-26165.

Références bibliographiques

BRENNER C. Coopération mortelle entre la protéine pro-apoptotique Bax et le translocateur à adénine nucléotide pour le contrôle mitochondrial de l'apoptose. *Médecine/ Sciences*, 1998, 14, 1399-1401.

BUREDEN DA, OSHEROFF N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted of the enzyme. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 1400, 139-145.

BURKE TG, BOM D. Camptothecin design and delivery approaches for elevating anti-topoisomerase I activities *in vivo*. *Ann NY Acad Sci*, 2000, 922, 36-45

BURKE TG, MI Z. The structure basis of camptothecin interaction with human serum albumin: impact on drug stability. *J Med Chem*, 1994, 37, 40-46.

C

CADENAS S, DAVIES KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Biol Med*, 2000, 29, 222-230.

CAMPLING BG, PYM J, BAKER HM, COLE SP, LAM YM. Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. *Br J Cancer*, 1991, 63, 75-83.

CARDONE MH, ROY N, STENNICKE HR, SALVESEN GS, FRANKE TF, STANBRIDGE E, FRISCH S, REED JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 1998, 282, 1318-1321.

CHAI J, DU C, WU JW, KYIN S, WANG X, SHI Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 2000, 406, 855-862.

CHAUDHARY PM, EBY M, JASMIN A, BOOKWALTER A, MURRAY J, HOOD L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*. 1997, 7, 821-30.

Références bibliographiques

CHAUVIER D, MORJANI H, MANFAIT M. Ceramide involvement in homocamptothecin- and camptothecin- induced cytotoxicity and apoptosis in colon HT29 cells. *International Journal of Oncology*, 2002, 20, 855-863.

CHINNAIYAN AM, O'ROURKE K, LANE BR, DIXIT VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*, 1997, 275, 1122-1126.

CHINNAIYAN AM, O'ROURKE K, YU GL, LYONS RH, GARG M, DUAN DR, XIANG L, GENTZ R, NI J, DIXIT VM. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*, 1996, 274, 990-2.

CHINTALACHARUVA KR, PISKURICH JF, LAMM ME, KAETZEL CS. Cell polarity regulates the release of secretory component, the epithelial receptor for polymeric immunoglobulins, from the surface of HT-29 colon carcinoma cells. *J Cell Physiol*, 1991, 148, 35-47.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step-method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162, 156-159.

CLARKE R, LUND E, JOHNSON I I, PINDER A. Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT-29 cells using annexin V binding, but not by TUNEL assay or sub-GO DNA content. *Cytometry*, 2000, 40, 252-258.

COHEN AM, MINSKY BD, SCHILSKY RL. Cancer of the colon. In: *DeVita VT Jr, Hellman S, Robertson SA eds. Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p 1144-1197.

COHEN GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 1997, 326, 1-16.

COHEN P. Génomique fonctionnelle. Site Web, http://www.univ-montp1.fr/biotech/Genomique/Genomique_contenu.htm#RTPCR (Page consultée le 10/09/2001).

Références bibliographiques

CORY S, VAUX DL, STRASSER A, HARRIS AW, ADAMS JM. Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res*, 1999, 59, 1685s- 1692.

COUZINET A, HERINCS Z, HUEBER AO. Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Médecine/ Sciences*. 2002, 18, 841-52.

COVERY JM, JAXEL C, KOHN KW, POMMIER Y. Protein linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer Res*, 1989, 49, 5016-5022

CROMPTON M, BARKSBY E, JOHNSON N, CAPANO M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie*, 2002, 84, 143-152.

D

DAUGAS E, NOCHY D, LOEFFLER M, SUSIN SA, ZAMZAMI N, KROEMER G. Apoptosis-inducing factor (AIF): an ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*, 2000b, 476, 118-123.

DAUGAS E, SUSIN SA, ZAMZAMI N, FERRI KF, IRINOPOULOU T, LAROCLETTE N, PREVOST MC, LEBER B, ANDREWS D, PENNINGER J, KROEMER G. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J*, 2000a, 14, 729-739.

DECAUDIN D, MARZO I, BRENNER C, KROEMER G. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy. *Int J Oncol*, 1998, 12, 141-152.

DEMARQUAY D, HUCHET M, COULOMB H, LESUEUR-GINOT L, LAVERGNE O, KASPRZYK PG, BAILLY C, CAMARA J, BIGG DCH. The homocamptothecin BN80915 is highly potent orally active topoisomerase I poison. *Anti-Cancer Drugs*, 2001, 12, 9-19

Références bibliographiques

DESAGHER S, MARTINOU JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biolology*, 2000, 10, 369-377.

DEVERAUX QL, REED JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes & development*, 1999, 13, 239-252.

DEVERAUX QL, ROY N, STENNICKE HR, VAN ARSDALE T, ZHOU Q, SRINIVASULA SM, ALNEMRI ES, SALVESEN GS, REED JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO Journal*, 1998, 17, 2215-2223.

DONG Z, SAIKUMAR P, WEINBERG JM, VENKATACHALAM MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol*, 1997, 151, 1205-1213.

DOUILLARD JY, CUNNINGHAM D, ROTH AD, NAVARRO M, JAMES RD, KARASEK P, JANDIK P, IVESON T, CARMICHAEL J, ALAKL M, GRUIA G, AWAD L, ROUGIER P. Irinotecan combined with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomized trial. *Lancet*, 2000, 355, 1041-1047.

DU C, FANG M, LI Y, LI L, WANG X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2001, 102, 33-42.

E

EMRSON DL, BESTERMAN JM, BROWN RJ, EVANS MG, LEITNER PP, LUZZIO MJ, SHAFFER JE, STERNBACH DD, UEHLING DE, VUONG A. In vivo antitumor activity of two new seven-sustituted water soluble camptothecin analogues. *Cancer Res*, 1995, 55, 603-609.

Références bibliographiques

ENARI M, HUG H, NAGATA S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature*. 1995, 375, 78-81.

ESKES R, DESAGHER S, ANTONSSON B, MARNITOU JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 2000, 20, 929-35.

F

FADDEL B, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. The most unkindest cut of all : on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia*, 2000, 14, 1514-1525.

FERNANDES-ALNEMRI T, ARMSTRONG RC, KREBS J, SRINIVASULA SM, WANG L, BULLRICH F, FRITZ LC, TRAPANI JA, TOMASELLI KJ, LITWACK G, ALNEMRI ES. *In vitro* activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93, 7464-7469.

FESIK SW, SHI Y. Structural biology. Controlling the caspases. *Science*, 2001, 294, 1477-1478.

FRANKE TF, CANTLEY LC. Apoptosis a Bad kinase makes good. *Nature*, 1997, 390, 116-117.

FRANKFURT OS, SECKINGER D, SUGARBAKER EV. Pleiotropic drug resistance and survival advantage in leukemic cells with diminished apoptotic response. *Int J Cancer*. 1994 59, 217-24.

FULDA S, SCAFFIDI C, PIETSCH T, KRAMMER PH, PETER ME, DEBATIN KM. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ*. 1998, 5, 884-93.

Références bibliographiques

G

GARCIA-CARBONERO R, SUPKO JG. Chercher titre article. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecin. *Clin Cancer Res*, 2002, 8, 641-661.

GARRIDO C, FORMENTIN A, BONNOTTE B ET COLL. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res*, 1998, 58, 5495- 5499.

GERVAIS FG, SINGARAJA R, XANTHOUDAKIS S ET COLL. Recrutement and activation of caspase-8 by the huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippin1. *Nat Cell Biol*, 2002, 4, 95-105. (trouver l'article pour noter le reste des auteurs)

GIOVANELLA BP, STEHLIN JS, WALL ME, WANI MC, NICHOLAS AW, LIU LF, SILBER R, POTMESIL M. DNA Topoisomerase I-targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. *Science*, 1989, 246, 1046-1048.

GOLDWASSER F, SHIMIZU T, JACKMAN J, HOKI Y, O'CONNOR P, KOHN KW, POMMIER Y. Correlations between S and G arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 1996, 56, 4430-4437.

GREEN D, KROEMER G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biology*, 1998b, 8, 267-271.

GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998a, 281, 1309-1312.

GROSS A, JOCKEL J, WEI MC, KORSMEYER SJ. Enforced dimerisation of Bax results in the translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*, 1998, 17, 3878-3885.

Références bibliographiques

GUNASEKERA P, BADAWI M, CORDELL A, FRANSWORTH R. Plant anticancer agents. X. Isolation of camptothecin and 9-metoxycamptothecin from *Ervatemia heynea*. *RS Natural Prod*, 1979, 42, 475-477

GUNTHERT AR, STRATER J, VON REYHER U, HENNE C, JOOS S, KORETZ K, MOLDENHAUER G, KRAMMER PH, MOLLER P. Early detachment of colon carcinoma cells during CD95 (APO-1/ Fas)-mediated apoptosis. I. De-adhesion from hyaluronate by shedding of CD44. *J Cell Biol*, 1996, 134, 1089-1096.

H

HALDAR S, JENA N, CROCE CM. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92, 4507-4510.

HAUSMANN G, O'REILLY LA, VAN DRIEL R, BEAUMONT JG, STRASSER A, ADAMS JM, HUANG DC. Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-xL. *Cell Biol*, 2000, 149, 623-633.

HERTZBERG RP, CARANFA MJ, HOLDEN KG, DALIA RJ, GALLAGER G, MATTERN MR, MONG S-M, O'LEARY BARTUS J, JOHNSON RK, KINGSBURY WD. Modification of the α -hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem*, 1989a, 32, 715-720.

HERTZBERG RP, CARANFA MJ, HECHT S. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry*, 1989b, 28, 4629, 4638.

HERTZBERG RP, BUSBY RW, CARANFA MJ, HOLDEN KG, HECHT SM, KINGSBURY WD. Irreversible trapping of the DNA-topoisomerase I covalent complex. Affinity labelling of the camptothecin binding site. *J Biol Chem*, 1990, 265, 19287-19295.

Références bibliographiques

HOCKENBERY DM, OLTVAI ZN, YIN XM, MILLIMAN CL, KORSMEYER SI. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993, 75, 241-251.

HSIANG HY, HERTZBERG R, HECHT S, LIU LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 1985, 260, 14873-14878.

HSIANG YH, LEROY LF, WALL ME, WANI MC, NICHOLAS AW, MANIKUMAR G, KIRSCHENBAUM S, SILBER R, POTMESIL M. DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res*, 1989, 49, 4385-4389

HSIANG YH, LIU LF. Identification of mammalian topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin, *Cancer Res*, 1988, 48, 3230-3235.

HU YM, BENEDICT MA, WU DY, INOHARA N, NUNEZ G. Interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1 dependent caspase-9 activation. *Proc Nat Acad Sci (USA)*, 1998, 95, 4386-4391.

HUETZ Philippe. Etude de la réactivité des Thiols au niveau de la protéine membranaire mitochondriale ANT. www.abct.fr/projets_contextes.htm. Site web consulté le 15/06/2006.

HUTCHINSON CR. Camptothecin: chemistry, biogenesis and medicinal chemistry. *Tetrahedron*, 1981, 37, 1047-1065.

I

IRANI K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signalling. *Circ Res*, 2000, 87, 179-183.

ITOH N, YONEHARA S, ISHII A, YONEHARA M, MIZUSHIMA S, SAMESHIMA M, HASE A, SETO Y, NAGATA S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 1991, 66, 233-43.

Références bibliographiques

J

JÄÄTTELÄ M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*, 1999, 248, 30-43.

JAXEL C, KOHN KW, WANI MC, WALL ME, POMMIER Y. Structure-activity study of the action of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and relation to antitumor activity. *Cancer Res*, 1989, 49, 1465-1469.

JOHNSON D, LANAHAN A, BUCK CR, SEHGAL A, MORGAN C, MERCER E, BOTHWELL M, CHAO M. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*. 1986, 47, 545-54.

JONES PA. Death and methylation. *Nature*, 2001, 409, 141-144.

JOSA N, SUSIN SA, DAUGAS E, STANFORD WL, CHO SK, LI CYJ, SASAKI T, ELIA AJ, CHENG H-YM, RAVAGNAN L, FERRI KF, ZAMZAMI A, WAKEHAM A, HAKEM R, YOSHIDA H, KONG Y-Y, MAK TW, ZUNIGA-PFULCKER JC, KROEMER G, PENNINGER JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 2001, 410, 549-554.

K

KASPRZYK PG, LAUER J, SAVOLA A, ALFORD T, LOMBARDI G, HOLLISTER BA, CHEN S-F, DEXTER DL, PRINCIPE P. Activity of BN80915 on five different schedules in three human tumor xenograft models. *Proceeding of American Association for Cancer Research*, 2001, 42, 719, poster 3864

KASS GE, ERIKSSON JE, WEIS M, ORRENIUS S, CHOW SC. Chromatin condensation during a requires ATP. *Biochem J*, 1996, 318, 749-752.

Références bibliographiques

KAUFFMANN S, EARNSHAW WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 2000, 256, 42-49.

KELEKAR A, CHANG BS, HARLAN JE, FESIK SW, THOMPSON CB. Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-x_L. *Mol Cell Biol*, 1997, 17, 7040-7046.

KERR JFR, SEARLE J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol*, 1972, 107, 41-44.

KERR JFR, WINTERFORD CM, HARMON BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994, 73, 2013- 2026.

KHON KW, POMMIER Y, Molecular and biological determinants of the cytotoxic actions of camptothecins. Perspectives for the development of new topoisomerase I inhibitors. *Ann NY Acad Sci*, 2000, 33, 175-179

KIDD VJ. Proteolytic activities that mediated apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60, 533-573.

KIM HJ, MUN JY, CHUN YJ, CHOI KH, KIM MY. Bax-dependent apoptosis induced by ceramide in HL-60 cells. *FEBS Letters*, 2001, 505, 264-268.

KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, NEWMAYER DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 1997, 275, 1132-1136.

KOCH M. Principaux anticancéreux d'origine végétale. *CR Soc Biol*, 1992, 186, 441, 457.

KOHLER C, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 265, 97-110.

Références bibliographiques

KROEMER G, DALLAPORTA B, RIGON-RESCHE M. The mitochondrial death/ life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60, 619-642.

KROEMER G, REED JC. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*, 2000, 6, 513-519.

KROEMER G, ZAMZAMI N, SUSIN SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, 1997, 18, 44-51.

KUMAZAWA E, JIMBO T, OCHI Y, TOGHO A. Potent and broad antitumor effects of DX-8951f, a water-soluble camptothecin derivative, against various human tumors xenografted in nude mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1998, 42, 210-220

L

LACKY K, BESTERMAN JM, FLETCHER W, LEITNER P, MORTON B, STERNBACH DD. Rigid analogs of camptothecin as DNA topoisomerase I inhibitors. *J Med Chem*, 1995, 38, 906-911.

LACOUR L, MICHEAU O, HAMMANN A, DROUINEAUD V, TSCHOPP J, SOLARY E, DIMANCHE-BOITREL MT. Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene*, 2003, 22, 1807-1816.

LARSEN AK, GILBERT C, CHYZAK G, PLISOV SY, NAGUIBNEVA I, LAVERGNE O, LESUEUR-GINOT L, BIGG DCH. Unusual potency of BN80915, a novel fluorinated E-ring modified camptothecin, toward human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 2001, 61, 2961-2967.

LAVERGNE O, BIG DCH. Les autres camptothécines: avancées récentes sur les analogues de la camptothécine autres que l'irinotecan et le topotecan. *Bull Cancer*, 1998b, numéro spécial de décembre, 51-58.

Références bibliographiques

LAVERGNE O, DEMARQUAY D, BAILLY C, LANCO C, ROLLAND A, HUCHET M, COULOMB H, MULLER N, BAROGGI N, CAMARA J, LE BRETON C, MANGINOT E, CAZAUX J-B, BIGG DCH. Topoisomerase I-mediated antiproliferative activity of enantiomerically pure flurinated homocamptothecins. *J Med Chem*, 2000, 43, 2285-2289

LAVERGNE O, HARNETT J, ROLLAND A, LANCO C, LESUEUR-GINOT L, DEMARQUAY D, HUCHET M, COULOMB H, BIGG DCH. BN80927: a novel homocamptothecin with inhibitory activities on both topoisomerase I and topoisomerase . *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9, 2599-2602.

LAVERGNE O, LASUEUR-GINOT L, PLA RODAS F, KASPRZYK PG, POMMIER J, DEMARQUAY D, PREVOST G, ULIBARRI G, ROLLAND A, SCHIANO-LIBERATORE A-M, HARNETT J, PONS D, CAMARA J, BIGG DCH. Homocamptothecins: synthesis and antitumor activity of novel E-ring-modified camptothecin analogues. *J Med Chem*, 1998a, 41, 5410-5419.

LAVERGNE O, LESUEUR-GINOT L, PLA RODAS F, BIGG DCH. BN80245: an E-ring modified camptothecin with potent antiproliferative and topoisomerase I inhibitory activities. *Bioorg Med Chem Lett*, 1997, 7, 2235-2238.

LEE HC, WEI YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *Biomed Sci*, 2000, 7, 2-15.

LEMASTER JJ, NIEMINEN AL, QIAN T, TROST LC, ELMORE SP, NISHIMURA Y, CROWE RA, CASCIO WE, BRADHAM CA, BRENNER DA, HERMAN B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 1366, 177-196.

LESUER-GINOT L, DEMARQUAY D, KISS R, KASPRZKY P, DASSONVILLE L, BAILLY C, CAMARA J, LAVERGNE O, BIGG DCH. Homocamptothecin, an E-ring modified camptothecin with enhanced lactone stability, retains topoisomerase I-targeted activity and antitumor properties. *Cancer Res*, 1999, 59, 2939-2944.

Références bibliographiques

LESUFLEUR T, KORNOWSKI A, LUCCIONI C, MULERIS M, BARBAT A, BEAUMATIN J, DUSSAULX E, DUTRILLAUX B, ZWEIBAUM A. Adaptation to 5-fluorouracil of the heterogenous human colon tumor cell line HT-29 results in the selection of cells committed to differentiation. *Int J Cancer*, 1991, 49, 721-730.

LI P, NIJHAWAN D, BUDIHardJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, YANG X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, 91, 479-489.

LI HL, ZHU H, XU CJ, YUAN JY. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998, 94, 491-501.

LIU H, YE H, DOGAN A, RANALDI R, HAMOUDI RA, BEARZI I, ISAACSON PG, DU MQ. T(11 ;18)(q21 ;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear Bcl-10. *Blood*, 2001, 98, 1182-1187.

LOETSHER H, PAN YC, LAHM HW, GENTZ R, BROCKHAUS M, TABUCHI H, LESSLAUER W. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 1990, 61, 351-359.

LONGTHORNE VL, WILLIAMS GT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J*, 1997, 16, 3805-12.

LUO X, BUDIHardJO I, ZOU H, SLAUGTHER C, WANG XD. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998, 94, 481-490.

LUZZIO MJ, BESTERMAN JM, EMERSON DL, EVANS MG, LACKY K, LEITNER PL, Mc INTYRE G, MORTON R, MYERS PL, PEEL M, SISCO JM, STERNBACH DD, TONG WQ, TRUESDALE A, UEHLING DE, VUONG A, YATES J. Synthesis and antitumor activity of novel water soluble derivatives of camptothecin and specific inhibitor of topoisomerase I. *J Med Chem*, 1995, 38, 395-401

Références bibliographiques

M

MANSAT-DE-MAS V, BEZOMBES C, QUILLET-MARY A, DE THONEL D'ORGEIX A, LAURENT G, JAFFREZOU J-P. Implication of radical oxygen species in ceramide generation, c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis induced by donorubicin. *Mol Pharmacol*, 1999, 56, 867-874.

MARTIN LM, KOTTKE TJ, KAUFMANN SH, EARNSHAW WC. Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Blood*, 1998, 92, 3042- 3049.

MARTIN SJ, NEWMYER DD, MATHIAS S, FARSCHEON DM, WANG HG, REED JC, KOLESNICK RN, GREEN DR. Cell-free reconstitution of Fas-, UV radiation- and ceramide-induced apoptosis. *The EMBO Journal*, 1995, 14, 5191-5200.

MARZO I, BRENNER C, ZAMZAMI N, JURGENSMEIR JM, SUSIN SA, VIEIRA HLA, PREVOST MC, XIE ZH, MATSUYAMA S, REED JC, KROEMER G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, 1998, 281, 2027-2031.

MARZO I, BRENNER C, ZAMZAMI N, SUSIN SA, BEUTNER G, BRIDCZKA D, REMY R, XIE ZH, REED JC, KROEMER G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J Exp Med*, 1998, 187, 1261-1271.

MATSURA T, KAI M, FUJII Y, YAMADA K. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires, caspase-3 activation. *Free Radi Res*, 1999, 30, 73-83.

MATTERN MR, MONG SM, BARTUS HF, MIRABELLI CK, CROOKE ST, JOHNSON RK. Relationship the intracellular effects of camptothecin and the inhibition of DNA topoisomerase I in cultured L1210 cells. *Cancer Res*, 1987, 47, 1793- 1798

Références bibliographiques

Mc CANN J. Colon cancer: new drug options improve on 5-FU. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90, 963-965.

McCARTHY NJ, WHYTE MK, GILBERT CS, EVAN GI. INHIBITION OF Ced-3/ICE-related proteases do not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol*, 1997, 136, 215-227.

McCONKEY DJ. Calcium-dependent, interleukin 1-converting enzyme inhibitor-intensive degradation of lamin B1 and DNA fragmentation is isolated thymocyte nuclei. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271, 22398-22406.

MENG XW, LEE SH, KAUFMANN SU. Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept? *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18, 668-676.

METZSTEIN MM, STANFIELD GM, HORVITZ HR. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet*, 1998, 14,410-416.

MICHEAU O, SOLARY E, HAMMANN A, DIMANCHE-BOITREL MT. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem*, 1999, 274, 7987-7992.

MICHEAU O, SOLARY E, HAMMANN A, MARTIN F, DIMANCHE-BOITREL MT. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to Fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89, 783-788.

MIGNON A, ROUQUET N, JOULIN V. Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain ? *Médecine/ Sciences*, 1998, 14, 9-17.

THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases : enemies within. *Science*, 1998, 281, 1312-1316.

Références bibliographiques

MIOSSEC C, DUTILLEUL V, FASSY F, DIU-HERCEND A. Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation . *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272, 13459-13462.

MITCHELL P. Keilin's Respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science*, 1979, 206, 1148-1159.

MITRY E, DUCREUX M, ROUGIER P. Irinotecan as a second-line chemotherapy after failure to 5FU for metastatic colorectal cancer: phase III trials. *Bull Cancer*, 1998, numéro special de décembre, 38-42.

MOLENAAR JJ, GERARD B, CHAMBON-PAUTAS C ET COLL. Microsatellite instability and frameshift mutations in Bax and transforming growth factor-beta RII genes are very uncommon in acute lymphoblastic leukemia *in vivo* but not in cell lines. *Blood*, 1998, 92, 230-233.

MOERTEL CG, SCHUTT AJ, REITEMEIR RJ, HAHN RG. Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother Rep*, 1972, 56, 95-101.

MUGGIA FM, CREAVER PJ, HANSEN HH, COHEN MH, SEALWRY OS. Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies. *Cancer Chemother Rep*, 1972, 56, 515-521

MUZIO M, CHINNAIYAN AM, KISCHKEL FC, O'ROURKE K, SHEVCHENKO A, NI J, SCAFFIDI C, BRETZ JD, ZHANG M, GENTZ R. FLICE, a novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death-Inducing Signalling Complex. *Cell*, 1996, 85, 817-827.

Références bibliographiques

N

NAKAMURA T, SAKMOTO K. Reactive oxygen species up-regulates cycooxydase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284, 203-210.

NECHUSHTAN A, SMITH CL, HSU YT, YOULE RJ. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J*, 1999, 18, 2330-2341.

NEWMEYER DD, FARSCHON DM, REED JC. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell*, 1994, 79, 353-364.

NICHOLAS AW, WANI MC, MANIKUMAR G, WALL ME, KOHN KW, POMMIER Y. Plant antitumor agents. 19. Synthesis and biological activity of ring D and ring E modified analogues of camptothecin. *J Med Chem*, 1990, 33, 972-978

NICHOLSON DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 1999, 6, 1028-1042 (Nicholson 1999)

NOMURA M, SHIMIZU S, ITO T, NARITA M, MATSUDA H, TSUJIMOTO Y. Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res*, 1999, 59, 5542-5548.

O

O'CONNOR PM, NIEVES-NEIRA W, KERRIGAN D, BERTRAN R, GOLDMAN J, KOHN K.W, POMMIER Y. S-Phase population analysis does not correlate with the cytotoxicity of camptothecin and 10,11-methylenedioxycamptothecin in human colon carcinoma (HT-29) cells. *Cancer Commun*, 1991, 3, 233-240.

OEHM A, BEHRMANN I, FALK W, PAWLITA M, MAIER G, KLAS C, LI-WEBER M, RICHARS S, DHEIN J, TRAUTH BC, et COLL. Purification and molecular cloning of the

Références bibliographiques

APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 10709-10715.

OLIVIER L, MAHE B, GREE R, VALLETTE MF, JUIN P. HA14-8, a small inhibitor of Bcl-2 bypasses chemoresistance in leukaemia cells. *Leuk Res*, 2007.

P

PAN G, BAUER JH, HARIDAS V, WANG S, LIU D, YU G, VINCENZ C, AGGARWAL BB, NI J, DIXIT VM. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett*, 1998, 431, 351-6.

PARRISH J, LI L, KLOTZ K, LEDWICH D, WANG X, XUE D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*, 2001, 412, 90-94.

PETIT PX, GOUBERN M, DIOLEZ P, SUSIN SA, ZAMZAMI N, KROEMER G. Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett*, 1998, 426, 111-116.

PHILIPPART P, HARPER L, CHABOTEAUX C, DECAESTECKER C, BRONCKART Y, GORDOVER L, LESUEUR-GINOT L, MALONNE H, LAVERGNE O, BIGG DCH, DA COSTA PM, KISS R. Homocamptothecine, an E-ring modified camptothecin, exerts more potent antiproliferative activity than other topoisomerase I inhibitors in human colon cancers obtained from surgery and maintained in vitro under histotypical culture conditions. *Clin Cancer Res*, 2000, 6, 1557-1562.

PRATESI G, PEREGO P, ZUNINO F. Role of Bcl-2 and its post-transcriptional modification in response to antitumor therapy. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61, 381-386.

Références bibliographiques

PREVOST GP, CHAUMRON S, GOERE D, SYMPHORIEN C, PENNA C, MALKAFOSSE R, ORINCIPE P, COULOMB H, NORDLINGER B, FRANC B. The novel topoisomerase I poison BN80915 reduces the Ki-67 labeling in human digestive tumors treated in three dimensions. *Proceeding of American Association for Cancer Research*, 2001, 42, 180, poster 967.

R

RAMPINO N, YAMAMOTO H, LONOV Y, ET COLL. Somatic frameshift mutations in the Bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, 1997, 275, 967-969.

RAY CA, BLACK RA, KRONHEIM SR, GREENSTREET TA, SLEATH PR, SALVESEN GS, PICKUP DJ. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*, 1992, 69, 597-604.

RICCI JE. Les mécanismes moléculaires de l'apoptose. Site web, <http://www.123bio.net/revues/jericci/iapoptose.html> (page web consultée le 20/06/2006).

RIVORY LP, ROBERT J. Pharmacologie de la camptothécine et de ses dérivés. *Bull Cancer*, 1995, 82, 265-285.

ROBERTSON JD, GOGVADZE V, ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S. Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide. *J Biol Chem*, 2000b, 275, 32438-32443.

ROBERTSON JD, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol*, 2000a, 129, 346-358.

ROTONDA J, NICHOLSON DW, FAZIL KM, GALLANT M, GAREAU Y, LABELLE M, PETERSON EP, RASPER DM, RUEL R, VAILLANCOURT JP, THORNBERRY NA,

Références bibliographiques

BECKER JW. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*, 1996, 3, 619-625.

ROUCOU X, ROSTOVTSEVA T, MONTESSUIT S, MARTINOU JC, ANTONSSON B. Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes. *Biochem J*. 2002, 363, 547-552.

S

SATTLER M, LIANG H, NETTESHEIM D, MEADOWS RP, HARLAN JE, HEBERSTAD TM, YOON HS, SHUKER SB, CHANG BS, MINN AJ, THOMPSON CB, FESIK SW. Structure of Bcl-x_L-Bak peptid complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 1997, 275, 983-986.

SAWADA S, OKAJIMA S, AIYAMA R, NOKATA KI, FURUTA T, YOKOKURA T, SUGINO E, YAMAGUCHI K, MIYASAKA T. Synthesis and antitumor activity of 20(S)-camptothecin derivatives: carbamate-linked, water-soluble derivatives of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39, 1446-1450.

SAWADA S, YOKOKURA T, MIYASAKA T. Synthesis of CPT-11 (irinotecan hydrochloride trihydrate). *Ann N Y Acad Sci*. 1996, 803, 13-28.

SCAFFIDI C, FULDA S, SRINIVASAN A. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, 1998, 17, 1675-87.

SCHALL TJ, LEWIS M, KOLLER KJ, LEE A, RICE GC, WONG GH, GATANAGA T, GRANGER GA, LENTZ R, RAAB H. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*, 1990, 61, 361-370.

SHAO RG, CAO CX, NIEVES-NEIRAW, DIMANCHE-BOITREL MT, SOLARY E, POMMIER Y. Activation of the Fas pathway independently of Fas ligand during apoptosis

Références bibliographiques

induced by camptothecin in p53 mutant human colon carcinoma cells. *Oncogene*, 2001, 20, 1852-1859.

SHENDEL SL, MONTAL M, REED JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ*, 1998, 5, 372-380.

SHI Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nature Structural Biology*, 2001, 8, 394-401.

SHIMIZU S, IDE T, YANAGIDA T, TSUJIMOTO Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000a, 275, 12321-12325.

SHIMIZU S, KONISHI A, KODAMA T, TSUJIMOTO Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad (USA)*, 2000b, 97, 3100-3105.

SHIMIZU S, MATSUOKA Y, SHINOHARA Y, YONEDA Y, TSUJIMOTO Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 152, 237-250.

SHIMIZU S, NARITA M, TSUJIMOTO Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 1999, 399, 483-487.

SHIMIZU S, TSUJIMOTO Y. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 2000, 97, 577-582.

SHIN MS, KIM HS, LEE SH ET COLL. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res*, 2001, 61, 4942-4946.

Références bibliographiques

SIEGEL RM, CHAN FK, CHUN HJ, LENARDO MJ. The multifaceted role of Fas signalling immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol*, 2000, 1, 469-474.

SKULACHEV VP. Mitochondria in the programmed death phenomena ; a principle of biology : « it is better ti die than to be wrong ». *International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Life*. 2000, 49, 365-373.

SOENGAS MS, CAPODIECI P, POLSKY D, ET COLL. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 2001, 409, 207-211.

SOLARY E, BETTAIEB A, L DUBREZ-DALOZ L, GARRIDO C. Implications physiopathologiques des altérations des gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire. *Médecine/ Sciences*, 2002, 18, 861-873.

SUSIN SA, ZAMZAMI N, KROEMER G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366, 151-165.

STENNICKE HR, SALVESEN GS. Properties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1387, 17-31.

SUGIMORI M, EJIMA A, OHSUKI S, UOTO K, MITSUI I, KAWATO Y, HIRATO Y, SATO K, TERASAWA H. Synthesis and antitumor activity of ring A and F modified hexacyclic camptothecin analogues. *J Med Chem*, 1998, 41, 2308-2318

SUSIN SA, ZAMZAMI N, KROEMER G. Mitochondria as regulator of apoptosis : doubt no more. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1366, 151-165.

Références bibliographiques

T

TANIZAWA A, FUJIMORI A, FUJIMORI Y, POMMIER Y. Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *J Natl Can Inst*, 1994, 86, 836-842.

TE POELE RH, JOEL SP. Schedule-dependent cytotoxicity of SN-38 in p53 wild-type and mutant colon adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer*, 1999, 81, 1285-1293.

THOMPSON CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, 267, 1456- 1462.

TSHOPP J, IRMLER M, THOME M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10, 552-558.

TSUJIMOTO Y, SCHIMIZU S. Bcl-2 family : life-or-death switch. *FEBS Lett*, 2000, 466, 6-10.

U

UREN AG, O'ROURKE K, ARAVIND LA ET COLL. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell*, 2000, 6, 961-967.

V

VAYSSIERE JL, PETIT PX, PETIT Y, MIGNOTTE B. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1994, 91, 11752-11756.

Références bibliographiques

VERHAGEN AM, EKERT PG, PAKUSCH M, SILKE J, CONNOLLY LM, REID GE, MORITZ RL, SIMPSON RJ, VAUX DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000, 102, 43-53.

VILLA P, KAUFMANN SH, EARNSHAW WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997, 22, 388-393.

VOUSDEN KH. p53: death star. *Cell*, 2000, 103, 691-704.

W

WALKER NP, TALANIAN RV, BRADY KD, DANG LC, BUMP NJ, FERENZ CR, FRANKLIN S, GHAYUR T, HACKET MC, HAMMILL LD. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10) homodimer. *Cell*, 1994, 78, 343-352.

WALL ME, WANI MC, COOK CE, PALMER KH, McPHAIL HT, SIM GA. Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc*, 1966, 88, 3888-3890.

WALL ME, WANI MC, NICHOLAS AW, MANIKUMAR G, TELE C, MOORE L, TRUESDALE A, LEITNER P, BESTMAN JM.P. Plant antitumor agents. 30. Synthesis and structure-activity of a novel camptothecin analogues. *J Med Chem*, 1993, 36, 2689-2700.

WANG HK, LIU SY, HWANO KM, Mc PHAIL AT, LEE KH. The synthesis of 5-substituted camptothecins as potential inhibitors of DNA topoisomerase I. *Bioorg Med Chem Leu*, 1995, 5, 77, 82.

WANG HG, PATHAN N, ETHELL IM, KRAJEWSKI S, YAMAGUCHI Y, SHIBASAKI F, McKEON F, BOBO T, FRANKE F REED JC. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, 1999, 284, 339-343.

Références bibliographiques

WANI MC, NICHOLAS AW, MANIFUMAR G, WALL ME. Plant antitumor agents. 28. Resolution of a key tricyclic synthon, 5' (RS)-1,5-dioxo-5'-hydroxy-2'H,5'H,6'H-6'-oxopyranol [3', 4'-f] Δ 6,8-tetrahydroindolisine: total synthesis and antitumor activity of 20(S)- and 20(R)-camptothecin. *J Med Chem*, 1987, 30, 2317-2319

WARDMAN P, CANDEIAS LP. Fenton chemistry : an introduction. *Radiat Res*, 1996, 145, 523-531.

WILSON KP, BLACK JA, THOMSON JA, KIM EE, GRIFFITH JP, NAVIA MA, MURCKO MA, CHAMBER SP, ALDAPE RA, RAYBUCK SA. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, 1994, 370, 270-275.

WU TS, LEU YL, HSU HC, OU LF, CHEN CC, OU JC, WU YC? Constituents and cytotoxic principles of *Notogapodytes foetida*. *Phytochemistry* 1995, 39, 383-385.

WYLLIE AH, MORRIS RG, SMITH AL, DUNLOP D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*, 1984, 142(1):67-77.

X

XIANG J, CHAO DT, KORSMEYER SJ. Bax-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93, 14559-14563.

Y

YANG E, KORSMEYER SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*, 1996, 88, 386-401.

Références bibliographiques

YANG E, ZHA J, JOCKEL J, BOISE LH, THOMPSON CB, KORSMEYER SJ. Bad, heterodimeric partner for Bcl-x_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 1995, 80, 285-291.

YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG TI, JONES DP, WANG XD. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 1997, 275, 1129-1132.

Z

ZAMZAMI N, KROEMER G. The mitochondrion in apoptosis : how pandora's box opens. *Nat Rev Mol*, 2001, 2, 67-71.

ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M, DECAUDIN D, MACHO A, HIRSCH T, SUSIN SA, PETIT PX, MIGNOTTE B, KROEMER G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med*, 1995, 182, 367-377.

ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M, HIRSCH T, SUSIN SA, MASSE B, KROEMER G. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Letters*, 1996a, 384, 53- 57.

ZAMZAMI N, SUSIN SA, MARCHETTI P, HIRSCH T, GOMEZ-MONTERREY I, CASTEDO M, KROEMER G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 1996b, 183, 1533-1544.

ZHANG H, XU Q, KRAJEWSKI S, *et COLL*. BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 2597-602.

Références bibliographiques

ZHANG Q, SIEBERT R, YAN M ET COLL. Inactivating mutations and overexpression of Bcl-10, a caspases recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet*, 1999, 22, 63-68.

ZHOU BN, HOCH JM, JOHNSON RK, MATTERN MR, ENG WK, MA J, HECHT SM, NEWMAN DJ, KINGSTON DG. Use of compare analysis to discover new natural product drugs: isolation of camptothecin and 9-metoxycamptothecin from a new source, *J Nat Prod*, 2000, 63, 1273-1276.

ZORATTI M, SZABO I. The mitochondrial permeability transition. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1995, 1241, 139-176.

ZOROV DB, FIBURN CR, KLOTZ L-O, ZWEITER JL, SOLOTT SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*, 2000, 192, 1001-1014.

ZOU H, LI Y, LIU X, WAG X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 1999, 274, 11549-11556.

ZWEIBAUM A, LABURTHE M, GRASSET E, LOUVARD D. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. In: Handbook of Physiology, The gastrointestinal system, volume IV: Intestinal absorption and secretion. Ed Field M, Frizzel RA. Bethesda: Am Physiol Soc, 1991,223-255.

ZWEIBAUM A. Differentiation of human colon cancer cells: a new approach to colon cancer. *Bull Acad Natl Med*, 1993,177, 71-73.

ملخص

الكامبتوتيسين (CPT) مانع فعال لتوبويسميراز I. يقل مفعول التسمم الخلوي الناتج عن المعالجة بـ CPT بسبب التحلل المائي السريع في pH فيزيولوجي لحلقة α -هيدروكسيلاكتون E على هيئة كربوكسيلات. تملك الهيموكامبتوتيسين (hCPT) حلقة β -هيدروكسيلاكتون التي تتميز باستقرار أكبر في الوسط المائي ذو الـ pH الفيزيولوجي، مما يعطيها مفعولا أكبر من CPT في التسمم الخلوي. رغم ان السلالة الخلوية لسرطان القولون والمستقيم HT29 تملك مقاومة كبيرة للعلاج الكيميائي، فإن CPT و hCPT فعالتان ضد الإنتشار الخلوي لهذه السلالة. hCPT تحث بفعالية أكبر من CPT على الإستموات عند خلايا HT29. خلال عملنا، درسنا تنسيق نسخ و ترجمة الجينات و البروتينات الحاتة أو المانعة للإستموات و وجدنا ان خلايا HT29 تتجاوب بصورة متماثلة لتأثير CPT أو hCPT. اثبتنا أيضا التأثير الواقفي لبروتين Bcl-2 باستعمال خلايا HT29 معدلة وراثيا بحيث يمكنها إنتاج هذا البروتين، علما ان خلايا HT29 الاصلية لا تنتج تلقائيا بروتين Bcl-2. و في الأخير، دراسة الإستموات المستحث بـ CPT عند خلايا HT29 اثبتت أن طريق Fas بواسطة تنشيط caspase-8 و كسر Bid ليس مسلوكا.

كلمات مفتاحية : الكامبتوتيسين، الهيموكامبتوتيسين، الإستموات، السرطان، خلايا HT29، سلسلة التفاعل العكسي لنسخ و مضاعفة الأحماض النووية، واسترن بلوت، مطياف، زراعة خلوية، مجهر لاصف.

Résumé

La camptothécine (CPT) est un inhibiteur de topoisomérase I dont la cytotoxicité est réduite car l'hydrolyse de son cycle α -hydroxylactone E en forme de carboxylate, est rapide en milieu aqueux à pH physiologique. L'homocamptothécine (hCPT) possède un cycle β -hydroxylactone qui lui confère une plus grande stabilité et présente une cytotoxicité supérieure à celle de la CPT. Bien que les lignées colorectales soient fortement résistantes à la chimiothérapie, la CPT et la hCPT sont particulièrement actives sur la prolifération des cellules HT-29. La hCPT induit une apoptose plus importante que CPT dans cette lignée. La régulation de l'expression des gènes et des protéines pro et anti-apoptotiques a été mise en évidence. D'une manière globale, les cellules HT-29 répondent de manière identique aux traitements par la CPT ou la hCPT. L'effet protecteur de Bcl-2 dans l'apoptose induite par la CPT a été étudié. Bcl-2 n'est pas exprimé dans les cellules HT-29. Des cellules HT-29 transfectées par le gène Bcl-2 ont été utilisées pour préciser le rôle de Bcl-2. Cette protéine protège les cellules vis-à-vis de l'apoptose induite par la CPT. Enfin, l'étude de l'induction de l'apoptose par la CPT, dans les cellules HT-29, montre que la voie Fas via l'activation de la caspase-8 et le clivage de Bid n'est pas impliquée dans le processus apoptotique.

MOTS- CLES : camptothécine, homocamptothécine, apoptose, cancer, cellules HT29, RT-PCR, Western Blot, spectroscopie, culture cellulaire et microscopie de fluorescence.

Summary

Camptothecin (CPT) is a topoisomerase I inhibitor whose cytotoxicity is reduced due to the rapid hydrolysis of the α -hydroxylactone E cycle to carboxylate in aqueous medium at physiological pH. Homocamptothecin (hCPT) has a β -hydroxylactone structure which confers a better stability and a higher cytotoxicity than CPT. As the human colorectal cell line (HT-29) has a high resistance to chemotherapy, CPT and hCPT inhibit HT-29 cell proliferation. hCPT has a more apoptotic effect than CPT in this lineage. The regulation of gene expression coding for pro and anti-apoptotic protein has been reported. Overall, HT-29 cells respond equally to CPT or hCPT treatment. The protective effect of Bcl-2 in the apoptotic mechanism induced by CPT has been investigated. Bcl-2 is not expressed in HT-29 cell line. HT-29 cells transfected with the Bcl-2 gene have been used to identify the role of Bcl-2. This protein protects the cells against apoptosis induced by CPT. Finally the study of the apoptosis induced by CPT in the HT-29 cell line shows that the signalling Fas pathway via the activation of caspase-8 and the cleavage of Bid is not involved in the apoptotic process.

KEY WORDS: camptothecin, homocamptothecin, apoptosis, cancer, HT29 cells, RT-PCR, Western Blot, spectroscopy, cell culture and fluorescent microscopy.

ملخص

الكامبتوتيسين (CPT) مانع فعال لتبويسميراز I. يقل مفعول التسسم الخلوي الناتج عن المعالجة بـ CPT بسبب التحلل المائي السريع في pH فيزيولوجي لحلقة α -هيدروكسيلاكتون E على هيئة كربوكسيلات. تملك الهيموكامبتوتيسين (hCPT) حلقة β -هيدروكسيلاكتون التي تتميز باستقرار اكبر في الوسط المائي ذو الـ pH الفيزيولوجي، مما يعطيها مفعولا اكبر من CPT في التسسم الخلوي. رغم ان السلالة الخلوية لسرطان القولون والمستقيم HT29 تملك مقاومة كبيرة للعلاج الكيميائي، فإن CPT و hCPT فعالتان ضد الإنتشار الخلوي لهذه السلالة. hCPT تحث بفعالية اكبر من CPT على الإستموات عند خلايا HT29. خلال عملنا، درسنا تسميق نسخ و ترجمة الجينات و البروتينات الحاتة أو المانعة للإستموات و وجدنا أن خلايا HT29 تتجاوب بصورة متمثلة لتأثير CPT أو hCPT. اثبتنا أيضا التأثير الوقائي لبروتين Bcl-2 باستعمال خلايا HT29 معدلة وراثيا بحيث يمكنها إنتاج هذا البروتين، علما أن خلايا HT29 الاصلية لا تنتج تلقائيا بروتين Bcl-2. و في الأخير، دراسة الإستموات المستحث بـ CPT عند خلايا HT29 أثبتت أن طريق Fas بواسطة تنشيط caspase-8 و كسر Bid ليس مسلوكا.

كلمات مفتاحية : الكامبتوتيسين، الهيموكامبتوتيسين، الإستموات، السرطان، خلايا HT29، سلسلة التفاعل العكسي لنسخ و مضاعفة الأحماض النووية، واسترن بلوت، مطياف، زراعة خلوية، مجهر لاصف.

Résumé

La camptothécine (CPT) est un inhibiteur de topoisomérase I dont la cytotoxicité est réduite car l'hydrolyse de son cycle α -hydroxylactone E en forme de carboxylate, est rapide en milieu aqueux à pH physiologique. L'homocamptothécine (hCPT) possède un cycle β -hydroxylactone qui lui confère une plus grande stabilité et présente une cytotoxicité supérieure à celle de la CPT.

Bien que les lignées colorectales soient fortement résistantes à la chimiothérapie, la CPT et la hCPT sont particulièrement actives sur la prolifération des cellules HT-29. La hCPT induit une apoptose plus importante que CPT dans cette lignée.

La régulation de l'expression des gènes et des protéines pro et anti-apoptotiques a été mise en évidence. D'une manière globale, les cellules HT-29 répondent de manière identique aux traitements par la CPT ou la hCPT.

L'effet protecteur de Bcl-2 dans l'apoptose induite par la CPT a été étudié. Bcl-2 n'est pas exprimé dans les cellules HT-29. Des cellules HT-29 transfectées par le gène Bcl-2 ont été utilisées pour préciser le rôle de Bcl-2. Cette protéine protège les cellules vis-à-vis de l'apoptose induite par la CPT.

Enfin, l'étude de l'induction de l'apoptose par la CPT, dans les cellules HT-29, montre que la voie Fas via l'activation de la caspase-8 et le clivage de Bid n'est pas impliquée dans le processus apoptotique.

MOTS- CLES : camptothécine, homocamptothécine, apoptose, cancer, cellules HT29, RT-PCR, Western Blot, spectroscopie, culture cellulaire et microscopie de fluorescence.

Summary

Camptothecin (CPT) is a topoisomerase I inhibitor whose cytotoxicity is reduced due to the rapid hydrolysis of the α -hydroxylactone E cycle to carboxylate in aqueous medium at physiological pH. Homocamptothecin (hCPT) has a β -hydroxylactone structure which confers a better stability and a higher cytotoxicity than CPT.

As the human colorectal cell line (HT-29) has a high resistance to chemotherapy, CPT and hCPT inhibit HT-29 cell proliferation. hCPT has a more apoptotic effect than CPT in this lineage.

The regulation of gene expression coding for pro and anti-apoptotic protein has been reported. Overall, HT-29 cells respond equally to CPT or hCPT treatment.

The protective effect of Bcl-2 in the apoptotic mechanism induced by CPT has been investigated. Bcl-2 is not expressed in HT-29 cell line. HT-29 cells transfected with the Bcl-2 gene have been used to identify the role of Bcl-2. This protein protects the cells against apoptosis induced by CPT.

Finally the study of the apoptosis induced by CPT in the HT-29 cell line shows that the signalling Fas pathway via the activation of caspase-8 and the cleavage of Bid is not involved in the apoptotic process.

KEY WORDS: camptothecin, homocamptothecin, apoptosis, cancer, HT29 cells, RT-PCR, Western Blot, spectroscopy, cell culture and fluorescent microscopy.