

2m11.2810.1

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**ÉTUDE DES EFFETS DE MCC EN COMBINAISON AVEC TROIS  
DROGUES ANTICANCÉREUSES AU NIVEAU DE LIGNÉES  
CELLULAIRES**

**PAR  
ISABELLE MÉNARD  
FACULTÉ DE PHARMACIE**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À LA FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES  
EN VU DE L'OBTENTION DU GRADE DE  
MAÎTRE ÈS SCIENCES (M.Sc.)  
EN SCIENCES PHARMACEUTIQUES  
OPTION TECHNOLOGIE PHARMACEUTIQUE**

**NOVEMBRE, 2000**

©ISABELLE MÉNARD, 2000



QV  
705  
H58  
2000  
N. 010

**UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL  
FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES**

**CE MÉMOIRE INTITULÉ :**

**ÉTUDE DES EFFETS DE MCC EN COMBINAISON AVEC TROIS  
DROGUES ANTICANCÉREUSES AU NIVEAU DE LIGNÉES  
CELLULAIRES**

**PRÉSENTÉ PAR :**

**ISABELLE MÉNARD**

**A ÉTÉ ÉVALUÉ PAR UN JURY COMPOSÉ DES PERSONNES  
SUIVANTES :**

**NIGEL C. PHILLIPS, DIRECTEUR DE RECHERCHE**

**PATRICE HILDGEN, PRÉSIDENT RAPPORTEUR**

**MURRAY DUCHARME, MEMBRE DU JURY**

**MÉMOIRE ACCEPTÉ LE : \_\_\_\_\_**

## SOMMAIRE

Ce mémoire résume les travaux qui ont été réalisés dans le but de déterminer les effets de combinaisons entre le MCC, une préparation de murs mycobactériens à activité anticancéreuse, et trois autres drogues anticancéreuses, au niveau de l'inhibition de la prolifération cellulaire et de l'induction de l'apoptose de deux lignées leucémiques *in vitro*.

L'introduction constitue le premier chapitre du mémoire, et elle est divisée en trois grandes parties. Tout d'abord, elle traite du mécanisme d'action de chacune des drogues utilisées seules et en combinaison lors des travaux de recherche, étant donné que la nature des interactions observées entre drogues en combinaison dépend des mécanismes d'action respectifs de chaque drogue. Dans un deuxième temps, elle traite des différentes méthodes utilisées pour déterminer la nature des interactions observées entre drogues en combinaison, ainsi que des raisons qui nous ont poussés à en choisir une en particulier pour l'analyse des résultats des présents travaux. Finalement, elle traite des principaux joueurs dans l'apoptose et de la place qu'ils occupent dans les voies biochimiques empruntées lors de ce processus.

Le deuxième chapitre, quant à lui, est constitué d'un article soumis pour publication dans une revue scientifique, qui résume le matériel et les méthodes utilisés lors des travaux de recherche, ainsi que les principaux résultats obtenus. Brièvement, il démontre que le MCC agit de façon additive avec la cytosine arabinoside et le mitoxantrone pour inhiber la prolifération cellulaire des cellules HL-60 et Jurkat à toutes les concentrations étudiées, et de façon additive ou synergique avec la vincristine pour inhiber la prolifération cellulaire et/ou induire l'apoptose, selon la lignée cellulaire et les concentrations étudiées. Il démontre également qu'une méthode utilisée pour quantifier les cellules apoptotiques par cytométrie de flux peut être utilisée pour étudier les effets de combinaisons de drogues au niveau de l'induction de l'apoptose.

Enfin, le troisième et dernier chapitre fait la discussion générale des principaux résultats obtenus, en proposant plusieurs mécanismes pour la synergie observée entre la vincristine et le MCC chez les cellules Jurkat.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
CHAPITRE 1	
INTRODUCTION	
1.1 LE MÉCANISME D'ACTION DES 4 DROGUES ÉTUDIÉES.....	3
1.1.1 MCC.....	3
1.1.2 Cytosine arabinoside.....	6
1.1.3 Mitoxantrone.....	7
1.1.4 Vincristine.....	10
1.2 LA SYNERGIE.....	13
1.2.1 Méthode de sommation des effets.....	14
1.2.2 Méthode du produit des fractions de survie de Webb.....	14
1.2.3 Méthode de Valériote et Lin.....	15
1.2.4 Méthode de Drewinko et al.....	16
1.2.5 Méthodes utilisant des isobogrammes.....	16
1.2.5.1 Méthode classique des isobogrammes.....	16
1.2.5.2 Méthode de Steel et Peckham.....	17
1.2.6 Méthode de l'index d'interaction de Berenbaum.....	21
1.2.7 Méthode d'effet médian de Chou et Talalay.....	22
1.2.8 Choix de la méthode.....	24
1.3 L'APOPTOSE.....	26
1.3.1 Morphologie de l'apoptose.....	27
1.3.2 Génétique de l'apoptose.....	30
1.3.2.1 Caspases.....	32
1.3.2.1.1 Structure.....	32
1.3.2.1.2 Rôle.....	36

1.3.2.1.3 Régulation.....	38
1.3.2.2 Membres de la famille bcl-2.....	39
1.3.2.2.1 Structure.....	39
1.3.2.2.2 Rôle.....	39
1.3.2.2.3 Régulation.....	41
1.3.2.3 Apaf-1.....	42
1.3.3 Voies biochimiques de l'apoptose.....	43
1.3.3.1 Récepteurs de mort cellulaire.....	43
1.3.3.1.1 Fas.....	44
1.3.3.1.2 TNFR1 et DR3.....	44
1.3.3.1.3 DR4 et DR5.....	47
1.3.3.1.4 Régulation.....	47
1.3.3.2 Mitochondrie.....	48

## CHAPITRE 2

### PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

#### EFFECTS OF A MYCOBACTERIAL CELL WALL PREPARATION IN COMBINATION WITH OTHER ANTICANCER AGENTS ON HUMAN LEUKEMIA CELL LINES

2.1 Abstract.....	55
2.2 Introduction.....	56
2.3 Materials and Methods.....	58
2.4 Results.....	61
2.5 Discussion.....	64
2.6 Acknowledgments.....	67
2.7 References.....	68

## CHAPITRE 3

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	78
--------------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE.....	82
--------------------	----

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1

#### Figure

1.1	Structure du MCC.....	5
1.2	Structure de l'Ara-C, du Mit et de la Vcr.....	8
1.3	Cycle catalytique de la topoisomérase II.....	11
1.4	Isobogramme classique.....	18
1.5	Isobogramme selon Steel et Peckham.....	19
1.6	Graphiques de la méthode d'effet médian de Chou et Talalay.....	23
1.7	Étapes dans les changements morphologiques associés à l'apoptose...	28
1.8	Fragmentation de l'ADN révélée par électrophorèse sur gel d'agarose.....	29
1.9	Quantification de l'apoptose par cytométrie de flux.....	31
1.10	Structure des caspases.....	35
1.11	Structure des membres de la famille bcl-2.....	40
1.12	Les voies de signalisation de l'apoptose à partir de Fas.....	45
1.13	Les voies de signalisation de l'apoptose à partir de TNFR1.....	46
1.14	Les voies de signalisation de l'apoptose à partir de la mitochondrie...	49
1.15	Les caspases et la mitochondrie dans les décisions mort/vie et nécrose/apoptose.....	52

### CHAPITRE 2

#### Figure

2.1	Cell proliferation inhibition dose-response curves for MCC, Ara-C, Mit and Vcr in A) HL-60 and B) Jurkat cells.....	75
2.2	Scatter distributions (experiment no. 10) of Jurkat cells treated for 48 h with Vcr 0.05 µg/ml, MCC 100 µg/ml and 0.05 µg/ml Vcr + MCC 100 µg/ml.....	76

2.3 Synergistic apoptosis induction between 0.05  $\mu\text{g/ml}$  Vcr + MCC 100  
 $\mu\text{g/ml}$  in Jurkat cells..... 77

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1

#### Tableau

1.1 Caractéristiques des caspases.....	33
1.2 Substrats des caspases.....	37

### CHAPITRE 2

#### Tableau

2.1 The drug combinations tested using the MTT assay.....	74
---	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique/deoxyribonucleic acid
ADP	Adénosine diphosphate
AIF	Apoptosis-inducing factor
Apo2L	Apo2 ligand
Apo3L	Apo3 ligand
Ara-C	Cytosine arabinoside
Ara-CDP	Ara-C diphosphate
Ara-CMP	Ara-C monophosphate
Ara-CTP	Ara-C triphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
Bases G et C	Bases guanine et cytosine
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
BH	Bcl-2 homology domain
CAD	Caspase-activated deoxyribonuclease
CARD	Caspase recruitment domain
CI	Combination index (méthode d'effet médian)
cPLA <sub>2</sub>	Cytoplasmic phospholipase A <sub>2</sub>
dADP	Désoxyadénosine diphosphate
dCDP kinase	Désoxycytosine diphosphate kinase
dCMP kinase	Désoxycytosine monophosphate kinase
DcR	Decoy receptor
DD	Death domain
DED	Death effector domain
D <sub>max</sub>	LCS de la drogue la plus efficace des deux drogues en combinaison, lorsque utilisée seule
DMEM	Dubelco's minimal essential medium
DNA-PK <sub>cs</sub>	DNA protein kinase catalytic subunit
DR	Death receptor
FADD	Fas-associated death domain

Fas	Récepteur de FasL
FasL	Fas ligand
FLIP	FADD-like ICE inhibitory proteins
FSC	Forward light scatter
GDI	GDP dissociation inhibitor
HnRNP	Heteronuclear ribonucleoproteins
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IC <sub>50</sub>	Concentration de drogue nécessaire pour inhiber 50% de la prolifération cellulaire
ICAD	Inhibitor of CAD
IL	Interleukine
LCS	Leukemic cell survival
MCC	Mycobacterial cell wall-DNA complex
MEKK1	MEK kinase 1
Mg <sup>+2</sup>	Magnésium <sup>+2</sup>
Mit	Mitoxantrone
MORT1	Mediator of receptor-induced toxicity
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NGF	Nerve growth factor
NuMA	Nuclear mitotic apparatus protein
OD	Optical density
PAK2	p21-activated kinase 2
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PGP	Pleiotropic glycoprotein
PKC $\delta$	Protéine kinase C $\delta$
PTP	Permeability transition pore
RAIDD	RIP-associated Ich-1/CED-3 homologous protein with a death domain
RFC-140	Replication factor C
RIP	Receptor interaction protein
ROS	Reactive oxygen species

S.D.	Standard deviation
SAF-A	Scaffold attachment factor A
SODD	Silencer of death domain
SSC	Side light scatter
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR-1	Tumor necrosis factor receptor 1
TRADD	TNFR-associated death domain
U1-70K	U1-specific 70-Kda protein
Vcr	Vincristine

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

L'utilisation de drogues en combinaison peut être avantageuse dans le traitement de diverses affections tel que l'hypertension sévère [Moser, 1989], l'asthme [Shenfield, 1982; Dahl et al., 1989; Horn et al., 1989], l'insuffisance cardiaque [Taylor et al., 1982; Rahimtoola, 1989], l'infarctus du myocarde [Collen et al., 1986; Collen et al., 1987; Collen, 1988], les infections sévères [Klastersky et al., 1972; Tattersall et al., 1973; Fox et al., 1975; Klastersky et al., 1976; Klastersky et al., 1977; Klastersky, 1979; Klastersky et al., 1982; D'esopo, 1982; Young, 1988] et le cancer. Dans le traitement du cancer par exemple, l'utilisation de combinaisons de drogues anticancéreuses permet d'atteindre des taux de rémission plus élevés que l'utilisation de drogues en monothérapie.

En effet, chez les enfants atteints de leucémie lymphatique aiguë, l'utilisation d'une combinaison de trois drogues anticancéreuses entraîne une rémission chez 94-95% des enfants, alors que l'utilisation d'une seule drogue anticancéreuse entraîne une rémission chez seulement 40-50% des enfants [Simone, 1979]. De la même façon, le traitement avec deux à quatre drogues anticancéreuses entraîne une rémission chez 25% des patients atteints du cancer du poumon à petites cellules, alors que le traitement avec une seule drogue entraîne une rémission complète chez seulement 2.5% des patients [Bunn et al., 1977; Greco et al., 1985].

Il semble également qu'il soit possible de sélectionner les combinaisons de drogues susceptibles d'apporter un véritable avantage thérapeutique lors du traitement d'affections chez l'humain, en les étudiant *in vitro*. En effet, il a été démontré que les combinaisons d'antibiotiques démontrant une synergie *in vitro* sont plus efficaces pour traiter les infections chez l'humain que les combinaisons

ne démontrant pas de synergie *in vitro* [Klastersky et al., 1972; Klastersky et al., 1976; Klastersky et al., 1977; Klastersky, 1979; Klastersky et al., 1982].

C'est dans le but d'identifier des combinaisons de drogues potentiellement avantageuses dans le traitement des leucémies chez l'humain, que nous avons étudié les effets du MCC, une préparation de murs mycobactériens à activité anticancéreuse, en combinaison avec trois autres drogues anticancéreuses, au niveau de l'inhibition de la prolifération cellulaire et de l'induction de l'apoptose de cellules leucémiques *in vitro*.

## 1.1 LE MÉCANISME D'ACTION DES 4 DROGUES ÉTUDIÉES

### 1.1.1 MCC

Le bacille de Calmette-Guérin (BCG) est une mycobactérie dont les propriétés anticancéreuses ont permis l'utilisation dans le traitement et la prophylaxie des carcinomes transitionnels de la vessie depuis 1976 [Morales et al., 1976]. Au cours des années, plusieurs études ont démontré que le BCG est supérieur à la chimiothérapie dans le traitement et la prophylaxie de ce type de cancer, et qu'il offre une protection à long terme contre la progression et la récurrence de ces tumeurs, ainsi que contre la mortalité causée par celles-ci [Lamm, 1992].

Son mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé, mais il semble impliquer des effets directs et immunomodulateurs indirects. En effet, mis à part les effets cytotoxiques directs du BCG, le *Mycobacterium bovis* semble induire le recrutement local de lymphocytes T et la production de diverses cytokines. D'ailleurs, plusieurs d'entre elles sont retrouvées dans l'urine des patients dans les 24 heures suivant l'instillation intravésicale de BCG (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$ ) [Haaff et al., 1986; Fleishmann et al., 1989; Böhle et al., 1990; Bettex-Galland et al., 1991; De Boer et al., 1992].

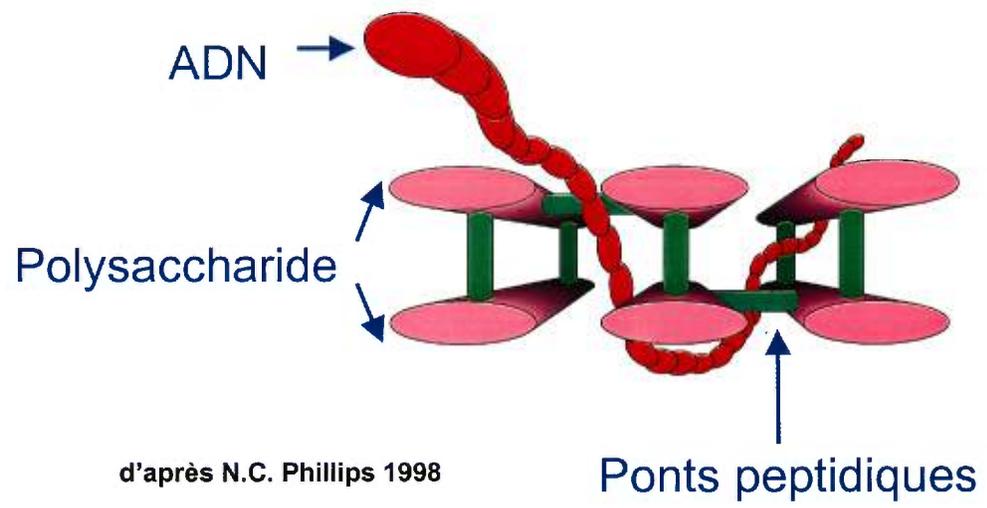
Bien que le BCG soit un agent dont l'activité anticancéreuse au niveau des carcinomes transitionnels de la vessie est bien établie, il entraîne des effets secondaires locaux et systémiques potentiellement graves, qui limitent son utilisation [Lamm et al., 1992]. Les effets secondaires locaux rapportés sont la cystite, l'hématurie, la prostatite granulomateuse, l'épididymo-orchite, l'obstruction urétrale ainsi que les abcès rénaux. Les effets secondaires systémiques quant à eux, incluent la fièvre, les symptômes grippaux, le malaise, la pneumonie, l'hépatite, l'arthralgie, la myalgie, les éruptions cutanées et la septicémie, qui peut être mortelle [Van Der Meijen, 1995]. De plus, le BCG étant sous forme de bactéries vivantes atténuées dans ces préparations, il existe de la

variabilité dans la viabilité et dans l'immunogénicité de ce produit d'une fois à l'autre [Lagranderie et al., 1996].

Les nombreux inconvénients reliés à l'utilisation du BCG comme produit anticancéreux chez l'humain ont donc entraîné le développement d'autres modulateurs de la réponse biologique, moins toxiques.

Le MCC (mycobacterial cell wall-DNA complex) est dérivé du *Mycobacterium phlei*, une mycobactérie gram-positif non pathogène pour les poissons, les amphibiens, les oiseaux et les mammifères, et retrouvée communément dans le sol, les plantes et dans l'eau potable [Mallick et al., 1985; Papapetropoulou et al., 1997]. Il s'agit d'un complexe de parois mycobactériennes formées essentiellement de deux composants majeurs, soit de peptidoglycane et de glycolipides [Filion et al., 1999]. Également, jumelé à ce complexe se trouve de l'ADN de mycobactérie sous forme d'oligonucléotides (voir figure 1.1) [Filion et al., 1997].

Il a été démontré que les préparations de parois cellulaires, comme les préparations provenant du *Mycobacterium bovis* (BCG) et du *Nocardia rubra*, ont une activité anticancéreuse et l'exerce en stimulant les cellules immunitaires [Sugimura et al., 1977; Zlotta et al., 1997; Rohde et al., 1997]. En effet, le MCC possède une activité anticancéreuse directe en induisant l'apoptose de lignées cellulaires vésicales et il stimule la production de cytokines à activité anticancéreuse, comme l'IL-12, par les monocytes et les macrophages [Filion et al., 1997; Filion et al., 1999]. De plus, il semble que sa phagocytose par les cellules monocytiques humaines THP-1 soit nécessaire à son activité au niveau de la stimulation de la production de l'IL-12 par ces cellules [Filion et al., 1997].



**Figure 1.1.** Structure du MCC.

### 1.1.2 Cytosine arabinoside (Ara-C)

L'Ara-C est une molécule qui fait partie de la classe des antimétabolites. Elle diffère du nucléoside désoxycytidine par la présence d'un groupement  $\beta$ -hydroxyl en position 2' sur le sucre (voir figure 1.2), qui interfère avec la rotation de l'anneau cytosine autour du lien glycosidique [Adler et al., 1968] et permet la formation d'un lien solide avec l'oxygène situé en 5' sur l'anneau cytosine [Chwang et al., 1973].

L'Ara-C pénètre dans les cellules par le mécanisme de diffusion facilitée des nucléosides [Kessel et al., 1967; Plagemann et al., 1978]. Ensuite, elle est transformée en Ara-CMP par l'enzyme désoxycytidine kinase [Plagemann et al., 1978; Kufe et al., 1985], puis en Ara-CDP et en Ara-CTP par les enzymes dCMP kinase et dCDP kinase respectivement [Hande et al., 1978]. L'Ara-CTP est responsable de l'activité pharmacologique de l'Ara-C [Furth et al., 1968; Graham et al., 1970] et sa disponibilité pour l'activité cytotoxique dépend de l'équilibre entre les kinases qui activent l'Ara-C et les désaminases qui dégradent l'Ara-C en Ara-U (cytidine désaminase [Chabner et al., 1974]), ainsi qu'en Ara-CMP et en Ara-UMP (désoxycytidylate désaminase [Mancini et al., 1982]).

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels l'Ara-C exerce son activité cytotoxique. Tout d'abord, l'Ara-C inhibe les ADN polymérases  $\alpha$  et  $\beta$ , des enzymes nécessaires respectivement à la synthèse de l'ADN et à sa réparation [Chu et al., 1965; Furth et al., 1968; Momparler, 1969; Graham et al., 1970; Yoshida et al., 1977; Matsukage et al., 1978]. Par contre, plusieurs observations portent à croire que ce mécanisme n'est pas le principal mécanisme responsable de son activité cytotoxique [Momparler, 1969; Graham et al., 1970].

En effet, le principal mécanisme responsable de l'activité cytotoxique de l'Ara-C semble être son incorporation dans l'ADN. Par exemple, certaines études ont démontré que l'incorporation de l'Ara-C dans les brins d'ADN interfère avec

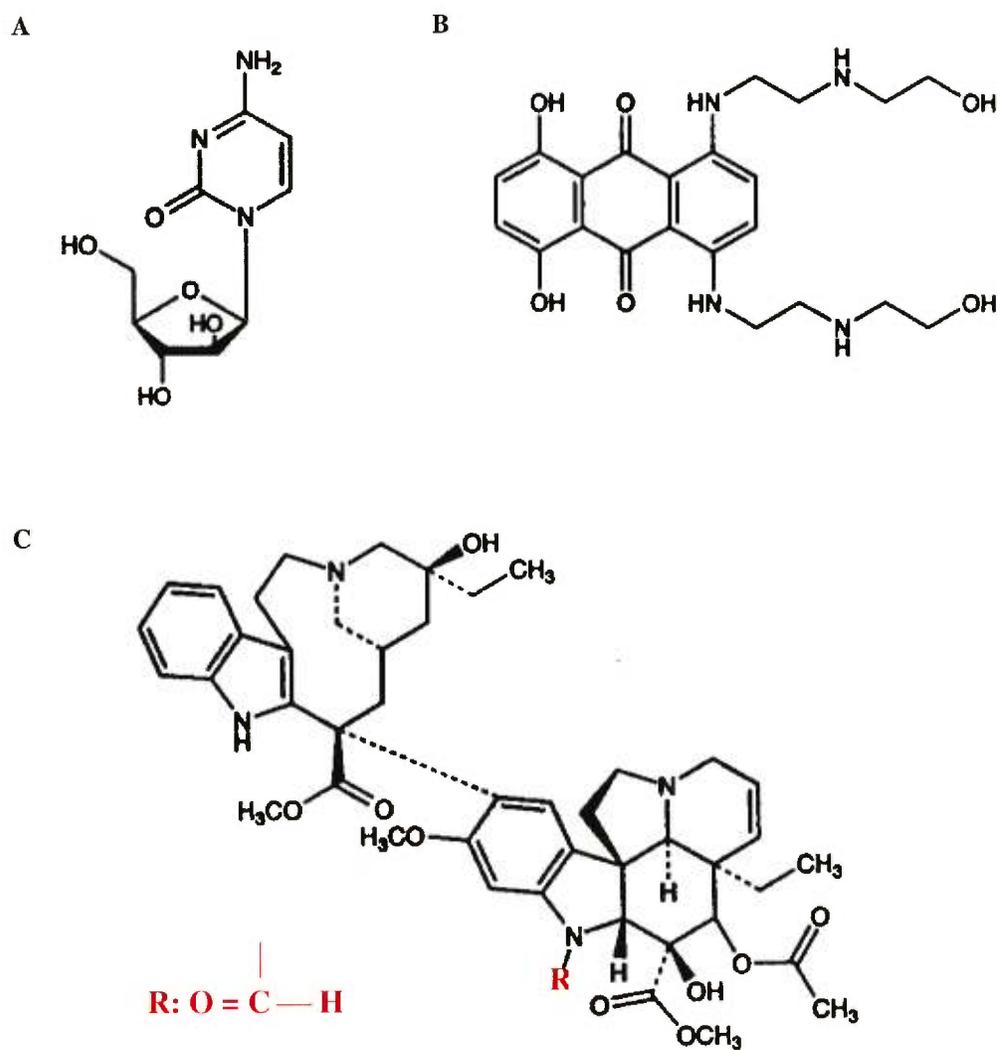
l'initiation de la chaîne d'ADN [Fridland, 1977] ou son élongation [Mikita et al., 1988; Ohno et al., 1988]. D'autres auteurs ont démontré qu'à faible concentration, l'incorporation de l'Ara-C ne fait que ralentir la synthèse de l'ADN [Kufe et al., 1984], alors qu'à forte concentration, elle cause l'arrêt de celle-ci [Major et al., 1981]. Également, certaines études ont démontré que l'incorporation de l'Ara-C dans l'ADN initie la synthèse d'ADN de segments déjà répliqués, provoquant ainsi la mort cellulaire [Woodcock et al., 1979; Woodcock et al., 1982; Woodcock et al., 1987; Woodcock, 1987].

L'Ara-C semble exercer son activité cytotoxique également en générant des ROS (reactive oxygen species), qui entraînent la perte d'intégrité membranaire des cellules et leur mort subséquente [Hu et al., 1995], de même qu'en entraînant des altérations dans la synthèse des lipides membranaires et des glycoprotéines [Hawtrej et al., 1974; Klohs et al., 1979], et dans les concentrations de plusieurs second messagers lipidiques [Strum et al., 1994].

### **1.1.3 Mitoxantrone**

Le mitoxantrone est une anthracenedione. Sa structure ressemble à celle des anthracyclines (daunorubicine, doxorubicine, idarubicine), bien qu'elle ne comporte que trois cycles au lieu de quatre, et qu'il n'y ait pas de sucre (voir figure 1.2).

Comme pour l'Ara-C, il existe plusieurs mécanismes par lesquels le mitoxantrone exerce son activité cytotoxique. Premièrement, il a été démontré qu'il s'intercale dans l'ADN, comme la plupart des molécules planaires, riches en électrons [Johnson et al., 1979; Foye et al., 1982]. Bien que certaines études aient démontré qu'il s'intercale préférentiellement entre les bases G et C [Foye et al., 1982], d'autres n'ont pas réussi à démontrer cette spécificité [Kapusinski et al., 1981; Roboz et al., 1982], probablement parce que la technique utilisée n'était pas aussi spécifique.



**Figure 1.2.** Structure de l'Ara-C (A), du Mit (B) et de la Vcr (C). (Modifié du Merck Index, 1996)

Deuxièmement, le mitoxantrone semble causer des bris d'un seul brin ou des deux brins d'ADN [Su, 1981], en agissant au niveau de la topoisomérase II, une enzyme requise pour la bonne structure des chromosomes et leur ségrégation, impliquée dans le métabolisme de l'ADN et essentielle pour la survie des cellules eukaryotes [DiNardo et al., 1984; Goto et al., 1984; Uemura et Yanagida, 1984, 1986; Berrios et al., 1985; Earnshaw et Heck, 1985; Earnshaw et al., 1985; Holm et al., 1985; Wang, 1985; Gasser et Laemmli, 1986; Gasser et al., 1986; Uemura et al., 1986; Uemura et al., 1987; Bae et al., 1988; Dillehay et al., 1989; Wang et al., 1990; Rose et al., 1990; Wang 1991].

La topoisomérase II agit en six étapes principales (voir figure 1.3) [Osheroff, 1989; Osheroff et al., 1991]:

1. Reconnaissance de son substrat, un acide nucléique dans l'ADN, et liaison à l'ADN [Osheroff, 1986, 1987; Zechiedrich and Osheroff, 1990; Howard et al., 1991; Roca et al., 1993];
2. Introduction d'un bris double-brin et religation d'une des deux hélices, en présence de  $Mg^{+2}$  [Liu et al., 1983; Sander and Hsieh, 1983; Osheroff, 1987];
3. Liaison de l'enzyme à l'ATP suivi de sa réorientation [Lindsley and Wang, 1991], puis passage de l'autre hélice à travers le bris [Osheroff et al., 1983];
4. Introduction d'un autre bris suivi de religation [Osheroff, 1986; Robinson and Osheroff, 1991];
5. Hydrolyse de l'ATP en ADP et en phosphate inorganique [Miller et al., 1981; Osheroff et al., 1983; Schomburg and Grosse, 1986];
6. Retour de l'enzyme à son état initial [Osheroff, 1986; Roca and Wang, 1993].

Les drogues causent des bris dans l'ADN des cellules par l'intermédiaire de la topoisomérase II soit en inhibant la réaction de religation (amsacrine, etoposide) [Osheroff, 1989; Robinson and Osheroff 1990; Robinson et al., 1991; Robinson and Osheroff, 1991], soit en augmentant la réaction de bris de celle-ci

(quinolones) [Robinson et al., 1991]. Dans le cas du mitoxantrone, on ne sait toujours pas par lequel de ces deux mécanismes les bris dans l'ADN sont causés.

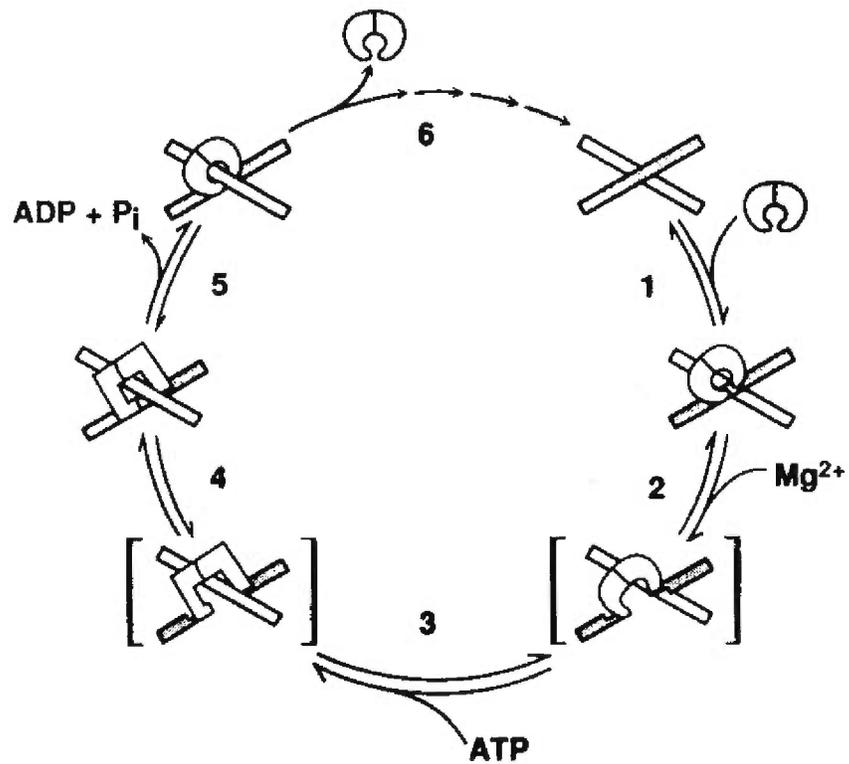
Troisièmement, le mitoxantrone semble exercer son activité cytotoxique en entraînant la production de radicaux libres de type semiquinone, causant des dommages aux membranes cellulaires et à l'ADN.

#### **1.1.4 Vincristine**

La vincristine fait partie de la classe des alcaloïdes de la pervenche (voir la figure 1.2 pour la structure). Cette molécule se lie à la tubuline et inhibe sa polymérisation en microtubules [Rowinsky et Donehower, 1996].

Les microtubules sont des éléments importants du cytosquelette, impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Par exemple, ils sont nécessaires à la formation du fuseau mitotique responsable de la séparation des chromosomes lors de la mitose, ainsi qu'aux fonctions structurales et de transport dans les axones des nerfs. Les microtubules sont dans un état d'équilibre dynamique, avec leur formation et leur dégradation à partir de la tubuline cytoplasmique. Par conséquent, le traitement avec les alcaloïdes de la pervenche interrompt cet équilibre, et les cellules subissent un arrêt de la mitose à la métaphase.

Une variété de drogues anticancéreuses de mécanismes d'action différents, dont l'Ara-C, le mitoxantrone et la vincristine, ont été démontrées comme pouvant induire la mort par apoptose des cellules cancéreuses [Merner et al., 1997]. En effet, il semble que les interactions drogue-cible agissent plutôt comme stimulus de la mort par apoptose, plutôt que d'agir en uniques responsables de la mort engendrée.



**Figure 1.3.** Cycle catalytique de la topoisomérase II. Voir la section 1.3 du chapitre I pour le résumé des 6 principales étapes du cycle. (Tiré de Osheroff et al., 1994)

Au cours des travaux de recherche qui ont mené à la rédaction de ce mémoire, nous avons voulu étudier l'effet du MCC en combinaison avec d'autres drogues anticancéreuses, au niveau de l'inhibition de la prolifération cellulaire, mais également au niveau de l'induction de l'apoptose de lignées leucémiques *in vitro*. Les principaux joueurs impliqués dans la mort cellulaire par apoptose, ainsi que les principales voies biochimiques empruntées au cours de ce processus feront l'objet de la troisième partie de l'introduction de ce mémoire. Toutefois, les principales méthodes utilisées pour déterminer la nature des interactions entre drogues en combinaison seront discutées dans la partie qui suit.

## 1.2 LA SYNERGIE

Lorsque deux ou plusieurs drogues sont utilisées en combinaison, l'interaction entre ces drogues peut être décrite comme étant synergique, additive ou antagoniste. L'interaction est dite i) additive, si l'effet de la combinaison est égal à l'effet auquel on s'attendait en combinant les drogues en question; ii) synergique, si l'effet de la combinaison est plus important que celui auquel on s'attendait, et iii) antagoniste, si l'effet de la combinaison est moins important que celui auquel on s'attendait. Par conséquent, la caractérisation de la nature de l'interaction entre des drogues en combinaison nécessite à priori la détermination de l'effet attendu, suivi de sa comparaison à l'effet observé.

Plusieurs méthodes différentes ont été développées dans le but de caractériser la nature des interactions entre drogues en combinaison, et elles ont fait l'objet de nombreux articles de revue [Berenbaum, 1981, 1988, 1989; Copenhaver et al., 1987; Gesser, 1988; Kodell et Pounds, 1991]. Malheureusement, à ce jour, aucun consensus n'a été atteint au sujet de la méthode à utiliser, de sorte que plusieurs approches différentes sont utilisées, bien que la conclusion finale varie en fonction de l'approche choisie.

Dans les paragraphes qui suivent, huit des méthodes utilisées pour caractériser la nature des interactions entre drogues en combinaison seront revues et décrites. Elles ont été choisies parce qu'elles sont simples, populaires et ne requièrent ni équipement spécialisé, ni connaissances poussées en mathématiques et en statistiques, de sorte qu'elles ont toutes pu être considérées lors du choix de la méthode à utiliser dans l'analyse de nos propres résultats.

### 1.2.1 Méthode de sommation des effets

Dans cette méthode, une interaction est décrite comme étant additive, si l'effet de la combinaison correspond à la somme des effets respectifs de chaque drogue seule [Dale et Penfield, 1984; Goodman, 1987; Elias et al., 1988; Hughes et al., 1988; Loomis et al., 1988; Abou-Issa et al., 1989; Clejan et Cederbaum, 1989].

Cette méthode est simple, rapide et ne requiert aucun équipement spécialisé. Par contre, elle a comme désavantage principal de ne pas être utilisable lorsqu'il y a une limite à l'effet maximal pouvant être produit. Par exemple, elle ne pourrait pas être utilisée pour déterminer la nature de l'interaction entre deux drogues qui inhibent 60% et 70% de la prolifération cellulaire respectivement, étant donné que l'effet attendu pour la combinaison dépasserait le maximum de 100% d'inhibition. De plus, cette méthode ne permet pas de déterminer l'intensité de l'interaction.

### 1.2.2 Méthode du produit des fractions de survie de Webb [Webb, 1963]

Dans cette méthode, une interaction est décrite comme étant synergique si le pourcentage de survie cellulaire observé pour la combinaison est plus petit que le produit des pourcentages de survie observés pour chaque drogue seule. Par exemple, si un traitement avec la drogue 1 engendre 80% de survie cellulaire et un traitement avec la drogue 2 engendre 70% de survie cellulaire, la combinaison doit engendrer moins de 56% de survie cellulaire ( $0.80 \times 0.70 = 0.56$ ) pour être considérée synergique. De plus, dans cette méthode, si la combinaison engendre plus de 56% de survie cellulaire, elle est considérée antagoniste [Roth et al., 1998].

Cette méthode offre comme avantages d'être simple, d'être praticable sans équipement dispendieux, et d'être populaire et très acceptée. Elle permet aussi de pouvoir tirer des conclusions à partir de peu de données. Par contre, elle ne permet pas de mesurer l'intensité de l'interaction.

### 1.2.3 Méthode de Valériote et Lin [Valeriotte et Lin, 1975]

Cette méthode est très semblable à la méthode du produit des fractions de survie de Webb. Par contre, dans la méthode de Valériote et Lin, si le pourcentage de survie cellulaire observé pour la combinaison est plus grand que le pourcentage prédit par la multiplication des pourcentages de survie cellulaire observés pour chaque drogue seule, l'interaction n'est pas automatiquement considérée antagoniste. En effet, si le pourcentage de survie cellulaire observé pour la combinaison se trouve entre le pourcentage prédit et le pourcentage observé pour la drogue la plus efficace lorsque utilisée seule, l'interaction est considérée subadditive; si le pourcentage de survie cellulaire observé pour la combinaison se trouve entre les pourcentages observés pour chaque drogue seule, l'interaction est appelée interférence; et si le pourcentage de survie cellulaire observé pour la combinaison est plus élevé que le pourcentage observé pour la drogue la moins efficace lorsque utilisée seule, l'interaction est considérée antagoniste [Larsson et al., 1993; Kristensen et al., 1994; Kaspers et al., 1995; Morabito et al., 1997; Jonsson et al., 1998].

Les avantages et désavantages de cette méthode sont essentiellement les mêmes que ceux de la méthode de Webb. Par contre, parce que l'interaction n'est pas automatiquement considérée antagoniste si le pourcentage de survie cellulaire observé pour la combinaison est plus grand que le pourcentage prédit par la multiplication des pourcentages de survie cellulaire observés pour chaque drogue seule, comme c'est le cas dans la méthode de Webb, la méthode de Valériote et Lin est plus intéressante.

#### 1.2.4 Méthode de Drewinko et al. [Drewinko et al., 1976]

Cette méthode est également semblable à celle du produit des fractions de survie de Webb. Par contre, dans la méthode de Drewinko et al., le pourcentage de survie cellulaire attendu pour la combinaison est soustrait du pourcentage observé, pour ensuite être comparé à zéro, en utilisant un test de student. L'interaction est considérée antagoniste, si le résultat est significativement plus élevé que zéro [Lee et al., 1995; Meno-Tetang et al., 1996].

Les avantages et désavantages de cette méthode sont essentiellement les mêmes que ceux de la méthode de Webb. Par contre, la méthode de Drewinko offre l'avantage additionnel de pouvoir mesurer l'intensité de l'interaction.

#### 1.2.5 Méthodes utilisant des isobogrammes

Les isobogrammes sont des graphiques qui permettent de déterminer visuellement la nature des interactions entre des drogues en combinaison. Deux méthodes utilisant des isobogrammes peuvent être décrites, soit la méthode classique des isobogrammes et la méthode de Steel et Peckham.

##### 1.2.5.1 Méthode classique des isobogrammes [Fraser, 1870-1871, 1872; Elion, Singer et Hitchings, 1954; Loewe, 1957]

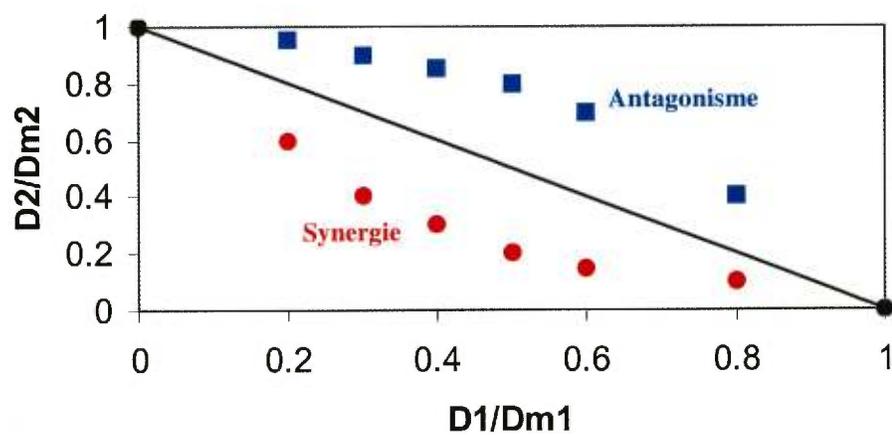
Dans la méthode classique des isobogrammes, il faut tout d'abord construire les courbes dose-réponse pour chaque drogue seule et en combinaison. Ensuite, on divise chacun des  $D_1$  par  $D_{m1}$ , ainsi que chacun des  $D_2$  par  $D_{m2}$ , et on place les résultats obtenus dans un graphique (isobogramme) (voir figure 1.4) dans lequel on a  $D_1/D_{m1}$  en abscisse et  $D_2/D_{m2}$  en ordonné ( $D_1$  et  $D_2$  représentant la concentration de la drogue 1 et de la drogue 2 dans la combinaison, qui permet d'inhiber 50% de la prolifération cellulaire, et  $D_{m1}$  et  $D_{m2}$  représentant la concentration de la drogue 1 et de la drogue 2 qui permet d'inhiber 50% de la

prolifération cellulaire lorsque chaque drogue est utilisée seule). Si les résultats obtenus se trouvent en dessous de l'isobole diagonale représentant l'additivité, l'interaction entre les drogues en combinaison est dite synergique (de plus petites concentrations que prévu en combinaison ont été nécessaires pour inhiber 50% de la prolifération cellulaire). Si par contre, les résultats obtenus se trouvent par-dessus l'isobole diagonale, l'interaction entre les drogues en combinaison est dite antagoniste (de plus grandes concentrations que prévu en combinaison ont été requises pour inhiber 50% de la prolifération cellulaire) [Benz et al., 1983; Hirose et al., 1987; Howell et al., 1989; Kristensen et al., 1994; Tosi et al., 1994; Mizutani et al., 1996; Kim et al., 1999].

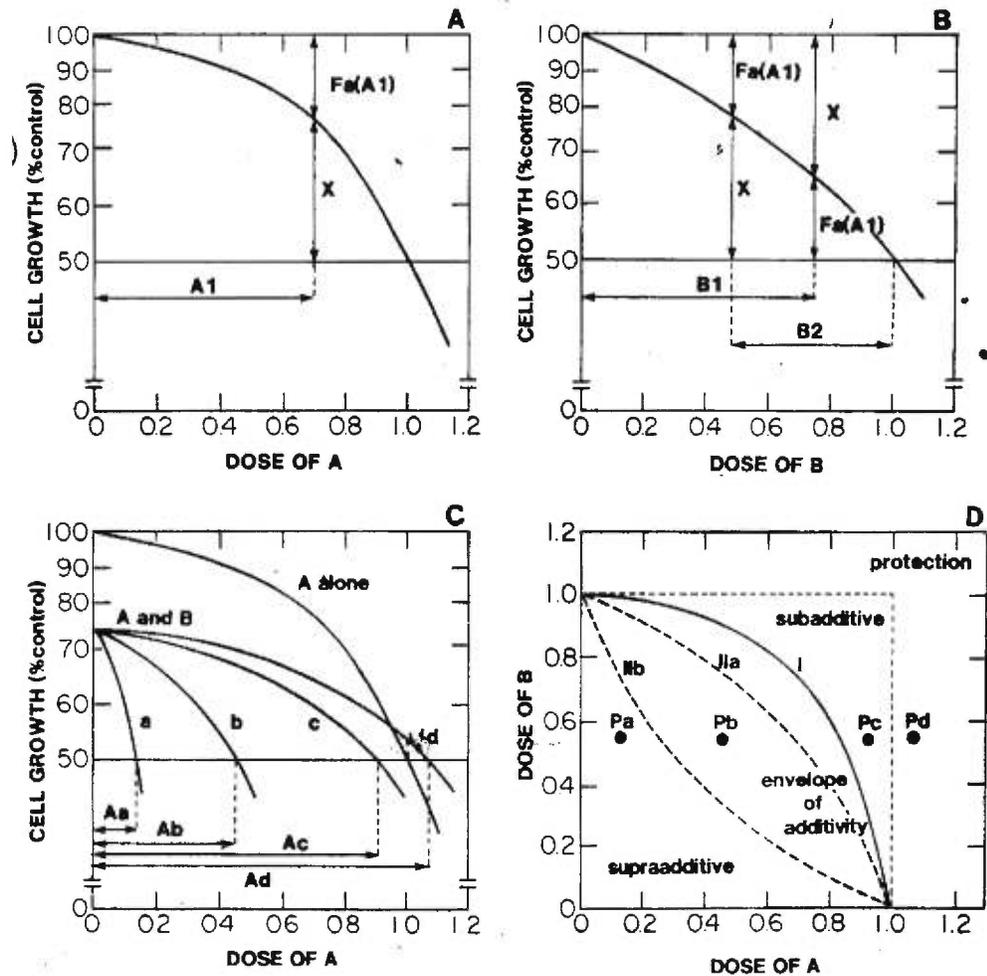
Cette méthode offre plusieurs avantages. Elle est simple, populaire, très acceptée et ne requiert aucun équipement dispendieux. Par contre, elle ne permet pas de mesurer l'intensité de l'interaction entre les deux drogues en combinaison, elle requiert un nombre élevé de données et un temps important, et plusieurs données peuvent être gaspillées si certaines courbes dose-réponse ne passent pas par le niveau de 50% d'inhibition. De plus, comme la distribution des résultats obtenus dans l'isobologramme peut être grande, il peut devenir difficile de tirer une quelconque conclusion.

#### **1.2.5.2 Méthode de Steel et Peckham [Steel et Peckham, 1979]**

Dans la méthode de Steel et Peckham, on commence également par la construction des courbes dose-réponse pour chaque drogue seule. Ensuite, dans un autre graphique (isobologramme) (voir figure 1.5), on construit la région représentant l'additivité à l'aide de trois courbes, Mode I, Mode IIa et Mode IIb, contrairement à la méthode classique dans laquelle un seul isobole est construit [Szumiel et Nias, 1980; Kano et al., 1988; Nosedá et al., 1988; Tsai et al., 1989; Kano et al., 1992; Kano et al., 1993].



**Figure 1.4.** Isobologramme classique. La droite diagonale représente l'effet attendu, alors que les points se retrouvant en dessous et par dessus celle-ci représentent la synergie et l'antagonisme respectivement.



**Figure 1.5.** Isobologramme selon Steel et Peckham. Shématisation de la construction des courbes Mode I, Mode IIa et Mode IIb délimitant la région représentant l'effet attendu. Les points se trouvant en dessous et par dessus celle-ci représentent la synergie et l'antagonisme respectivement. (Tiré de Kano et al., 1992)

La courbe Mode I est construite de la façon suivante: 1) on choisit une concentration pour la drogue 1 ( $A_1$ ), qui donne un pourcentage d'inhibition égal à  $Fa(A_1)$ ; 2) comme pour obtenir 50% d'inhibition, un certain effet supplémentaire X doit être produit par la drogue 2, on détermine graphiquement la concentration de la drogue 2 requise pour produire cet effet ( $B_1$ ); 3) on place tous les résultats ainsi obtenus dans un graphique (isobologramme) où l'on a la concentration de la drogue 1 en abscisse et la concentration de la drogue 2 en ordonné, et on relie les points.

Pour construire la courbe Mode IIa, on commence de la même façon que pour la construction de la courbe Mode I, sauf que la concentration de la drogue 2 requise pour produire l'effet supplémentaire X est déterminée en partant de la concentration requise pour produire le même effet que  $A_1$  et en allant jusqu'à la dose requise pour produire 50% d'inhibition. La courbe Mode IIb, quant à elle, se construit de la même façon que la courbe Mode IIa, sauf qu'ici on part de la drogue B pour déterminer l'effet supplémentaire qui doit être produit par la drogue A pour obtenir 50% d'inhibition.

Une fois les trois isoboles construits, on détermine la nature de l'interaction entre les drogues en combinaison selon la position des résultats observés (concentrations de chaque drogue réellement requises en combinaison pour produire 50% d'inhibition) par rapport à l'enveloppe d'additivité créée par les trois isoboles. Si les résultats se retrouvent en dessous de l'enveloppe d'additivité, l'interaction est dite synergique, s'ils se retrouvent au-dessus de l'enveloppe, l'interaction est dite antagoniste, et s'ils se retrouvent dans l'enveloppe, l'interaction est dite additive.

Cette méthode offre essentiellement les mêmes avantages et désavantages que la méthode classique des isobogrammes. Par contre, elle offre comme avantage supplémentaire de créer une région pour l'additivité (l'enveloppe d'additivité), ce qui permet de mieux déterminer si les résultats obtenus sont en dehors de cette

région, que lorsque la région en question n'est qu'une simple ligne. D'un autre côté, cet avantage supplémentaire a comme désavantage de rendre cette méthode relativement insensible aux faibles interactions entre les drogues, qui peuvent être réelles et potentiellement importantes.

### 1.2.6 Méthode de l'index d'interaction de Berenbaum [Berenbaum, 1977]

Cette méthode est l'analogue algébrique de la méthode classique des isobogrammes. L'équation générale pour le calcul de l'index d'interaction est la suivante:

$$I = \frac{D_{m1}}{D_1} + \frac{D_{m2}}{D_2}$$

Où  $D_{m1}$ ,  $D_{m2}$ ,  $D_1$  et  $D_2$  ont la même signification que dans la méthode classique des isobogrammes.

Dans cette méthode, l'interaction est considérée antagoniste lorsque l'index d'interaction est plus grand que 1, et synergique lorsque l'index d'interaction est plus petit que 1.

Les avantages et désavantages de cette méthode sont essentiellement les mêmes que ceux de la méthode classique des isobogrammes. Par contre, la méthode de l'index d'interaction offre l'avantage supplémentaire de pouvoir utiliser toutes les données, même si les courbes dose-réponse ne passent pas par le niveau de 50% d'inhibition (en autant que les courbes dose-réponse pour chaque drogue seule puissent être bien caractérisées). D'un autre côté, elle ne permet pas de visualiser les résultats comme la méthode classique des isobogrammes.

### 1.2.7 Méthode d'effet médian de Chou et Talalay [Chou et Talalay, 1984]

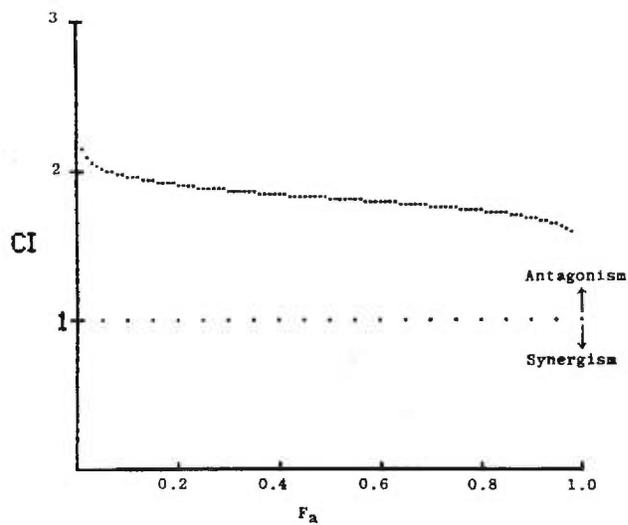
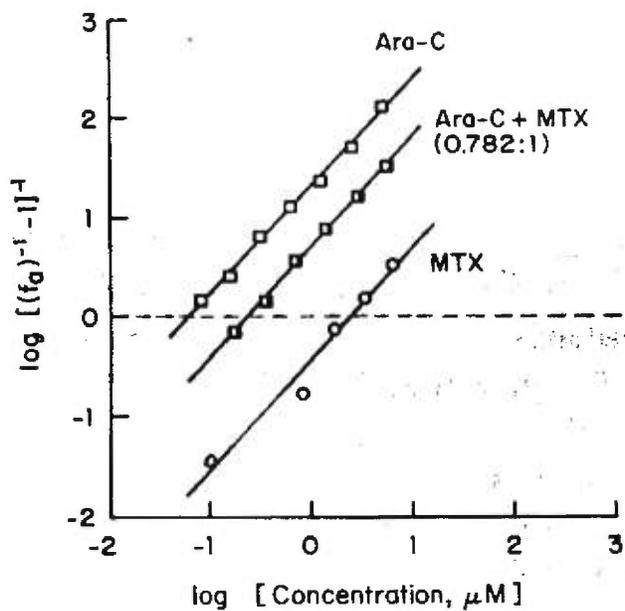
Pour utiliser cette méthode, il faut utiliser des concentrations de drogues selon un ratio fixe lors des combinaisons. Tout d'abord, on détermine le pourcentage de survie cellulaire ( $f$ ) pour chaque drogue utilisée seule et en combinaison. Puis, les données sont placées dans un graphique (voir figure 1.6) où l'on a le  $\log [(1/f) - 1]$  en ordonné, et le  $\log$  de la concentration de la drogue en abscisse, de façon à obtenir trois droites: une pour chaque drogue seule et une pour les drogues en combinaison. Ensuite, on détermine les  $\log IC_{50}$  ainsi que les pentes ( $m_1$ ,  $m_2$ , et  $m_{12}$ , pour la drogue 1, 2 et la combinaison respectivement) de ces droites, et on utilise ces paramètres pour calculer les concentrations de drogues requises lorsque utilisées seules et en combinaison, pour produire des niveaux différents de toxicité ( $f = 0.95, 0.90 \dots$ ):

$$Dose_f = Dose IC_{50} [(1 - f)/f]^{1/m}$$

Étant donné qu'on a utilisé des concentrations de drogues selon un ratio fixe lors des combinaisons, les concentrations  $D_1$  et  $D_2$  de chaque drogue requises pour produire un pourcentage de survie  $f$  lorsqu'en combinaison peuvent ensuite être déterminées à partir du calcul de la concentration de la combinaison, requise pour produire ce même pourcentage de survie. Finalement, pour chaque niveau de toxicité, on peut calculer le paramètre CI, essentiel pour déterminer la nature de l'interaction entre les drogues en combinaison :

$$CI = D_1/Df_1 + D_2/Df_2 + \alpha D_1 D_2 / Df_1 Df_2$$

Où  $D_1$  et  $D_2$  sont les concentrations requises de chaque drogue en combinaison pour produire un pourcentage de survie  $f$ ,  $Df_1$  et  $Df_2$  sont les concentrations de chaque drogue seule requises pour produire  $f$ , et  $\alpha = 1$  ou  $0$ , tout dépendant si les drogues sont considérées mutuellement nonexclusives ( $m_1 = m_2 \neq m_{12}$ ) ou mutuellement exclusives ( $m_1 = m_2 = m_{12}$ ) respectivement.



**Figure 1.6.** Graphiques de la méthode d'effet médian de Chou et Talalay. Les CI plus petits et plus grands que 1 représentent la synergie et l'antagonisme respectivement. (Tiré de Chou et Talalay, 1984)

L'interaction est dite synergique si le CI est plus petit que 1, additive si le CI est égal à 1, et antagoniste si le CI est plus grand que 1 [Hofmann et al., 1988; Kohno et al., 1988; Kano et al., 1988; Howell et al., 1989; Bible et Kaufmann, 1997; Avramis et al., 1998].

Cette méthode a comme avantages de requérir moins de données que celle des isobogrammes et d'offrir la possibilité d'utiliser un programme informatique pour simplifier le travail. Par contre, il a été démontré que l'équation utilisée pour calculer le CI des agents mutuellement nonexclusifs est incorrecte [Chou et Talalay, 1977; Berenbaum, 1989].

### 1.2.8 Choix de la méthode

Étant donné que le but des travaux de recherche qui ont mené à la rédaction de ce mémoire était de déterminer les effets du MCC, en combinaison avec trois autres drogues anticancéreuses au niveau de l'inhibition de la prolifération cellulaire et de l'induction de l'apoptose de cellules leucémiques *in vitro*, le choix de la méthode à utiliser pour analyser les résultats de façon à déterminer la nature des interactions observés entre le MCC et ces trois drogues, a constitué une étape importante. La méthode que j'ai choisie est une version modifiée de la méthode du produit des fractions de survie de Valeriote et Lin.

Selon cette version modifiée de la méthode de Valeriote et Lin, si le pourcentage de survie observé pour une combinaison est statistiquement plus petit que celui prédit par le produit des fractions de survie observées pour chaque drogue seule, l'interaction est dite synergique. Ensuite, si le pourcentage de survie observé pour une combinaison est plus grand ou égal à celui prédit par le produit des fractions de survie observées pour chaque drogue seule, mais qu'il est plus petit ou égal au pourcentage de survie de la drogue la plus efficace lorsque utilisée seule, l'interaction est dite additive. Finalement, si le pourcentage de survie observé pour une combinaison est plus grand ou égal à celui prédit par le produit des

fractions de survie observées pour chaque drogue seule et est statistiquement plus grand que le pourcentage de survie de la drogue la plus efficace lorsque utilisée seule, l'interaction est dite antagoniste.

J'ai choisi cette méthode pour les raisons suivantes:

1. Elle est très simple, et peut se pratiquer sans équipement spécialisé;
2. Elle est une version modifiée de la méthode du produit des fractions de survie de Valériote et Lin, qui est très utilisée et acceptée;
3. Elle est plus permissive que la méthode du produit des fractions de survie de Webb, étant donné que dans cette méthode, si le pourcentage de survie observé pour une combinaison est plus grand que celui prédit par le produit des fractions de survie observées pour chaque drogue seule, l'interaction est automatiquement dite antagoniste, et plus restrictive que la méthode de Valériote et Lin, dans laquelle l'interaction est dite antagoniste seulement si le pourcentage de survie observé pour la combinaison est plus grand que celui observé pour la drogue la moins efficace lorsque utilisée seule;
4. Elle est praticable même avec un petit nombre de données, comparativement à la méthode des isobogrammes, dans laquelle plusieurs combinaisons de plusieurs concentrations de chaque drogue sont nécessaires.

### 1.3 APOPTOSE

Deux formes de mort cellulaire ont été décrites: la nécrose et l'apoptose. La nécrose est une réponse passive à un traumatisme cellulaire sévère et soudain, tel que l'ischémie, l'hyperthermie, ou celui engendré par des poisons comme le cyanure. En effet, contrairement à l'apoptose, la nécrose ne requiert pas l'activation d'un programme génétique spécifique. Dans la nécrose, des changements précoces dans la forme et la fonction mitochondriale se produisent, et la cellule est incapable de maintenir l'homéostasie. L'épuisement subséquent des niveaux d'ATP, ainsi que la dérégulation dans le maintien de la pression osmotique entraînent alors le gonflement et la rupture de la cellule. Finalement, la libération des enzymes lysosomiaux de la cellule déclenche une réponse inflammatoire.

L'apoptose est une forme de mort cellulaire au cours de laquelle les cellules inactivent et dégradent systématiquement leurs éléments structuraux et fonctionnels dans le but d'entraîner leur propre mort. Il s'agit d'un processus actif, qui requiert l'activation d'un programme génétique spécifique. Elle joue un rôle essentiel lors du développement de tous les êtres multicellulaires, et dans le maintien de l'homéostasie.

L'apoptose peut être activée intracellulairement lors du développement, mais également extracellulairement, par des cytokines (Fas/Apo-1 ligand, TNF), protéines et hormones endogènes, ainsi que par l'irradiation UV ou  $\gamma$ , l'hypoxie, le stress oxydatif, les drogues chimiothérapeutiques et les infections virales. De plus, la capacité des cellules à s'engager en apoptose en réponse à un signal de mort dépend de leur état prolifératif, de leur position dans le cycle cellulaire et de l'expression contrôlée de gènes qui favorisent, inhibent ou affectent de quelque façon le programme de mort cellulaire.

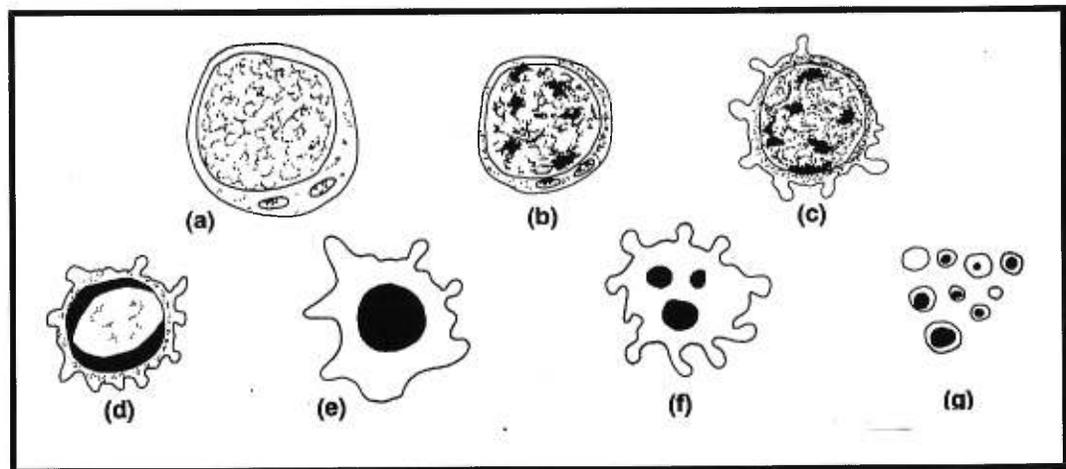
### 1.3.1 Morphologie de l'apoptose

L'apoptose est responsable de plusieurs changements morphologiques [Kerr et al., 1972] caractéristiques prenant place dans le noyau, le cytoplasme, les organelles et la membrane plasmique des cellules (voir figure 1.7).

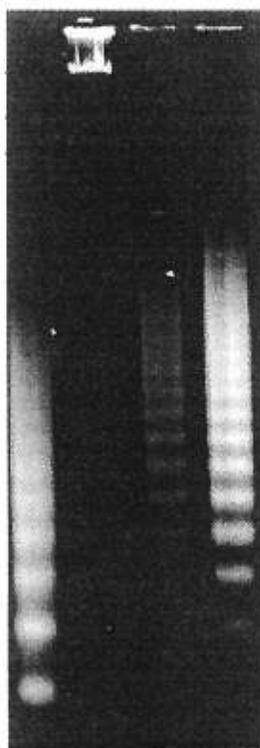
Premièrement, dans le noyau, la chromatine se condense [Wyllie et al., 1980], la matrice nucléaire est clivée [Kaukmann, 1989; Ucker et al., 1992; Lazebnik et al., 1993] et l'ADN est dégradé en fragments dont les tailles sont des multiples de 180-200 paires de bases [Wyllie, 1980]. Les autres organelles demeurent intactes, mise à part la mitochondrie, dont le fonctionnement est altéré [Kroemer et al., 1995] et dont le rôle dans l'apoptose sera vu plus loin.

La fragmentation de l'ADN peut être mise en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose, qui révélera l'apparence d'une "échelle" caractéristique d'ADN (voir figure 1.8) [Wyllie, 1980]. La méthode de l'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose est une méthode simple et peu coûteuse, qui est couramment utilisée pour suivre l'apoptose, et qui est acceptée par la communauté scientifique.

Deuxièmement, dans le cytoplasme, les filaments du cytosquelette s'agrègent et le réticulum endoplasmique se dilate et fusionne avec la membrane plasmique. Également, les phospholipides membranaires perdent leur asymétrie et les molécules d'adhésion sont clivées, compromettant ainsi la structure de la



**Figure 1.7.** Étapes dans les changements morphologiques associés à l'apoptose. La cellule normale (A) subit une perte de volume et la chromatine se condense (B). Puis, la membrane cytoplasmique subit des modifications morphologiques (C), la chromatine se dirige le long de l'enveloppe nucléaire (D), le noyau se transforme en un trou noir (E) avant d'être fragmenté en plusieurs sphères (F), et finalement, la cellule est fragmentée en corps apoptotiques. (Tiré de Cohen, 1993)



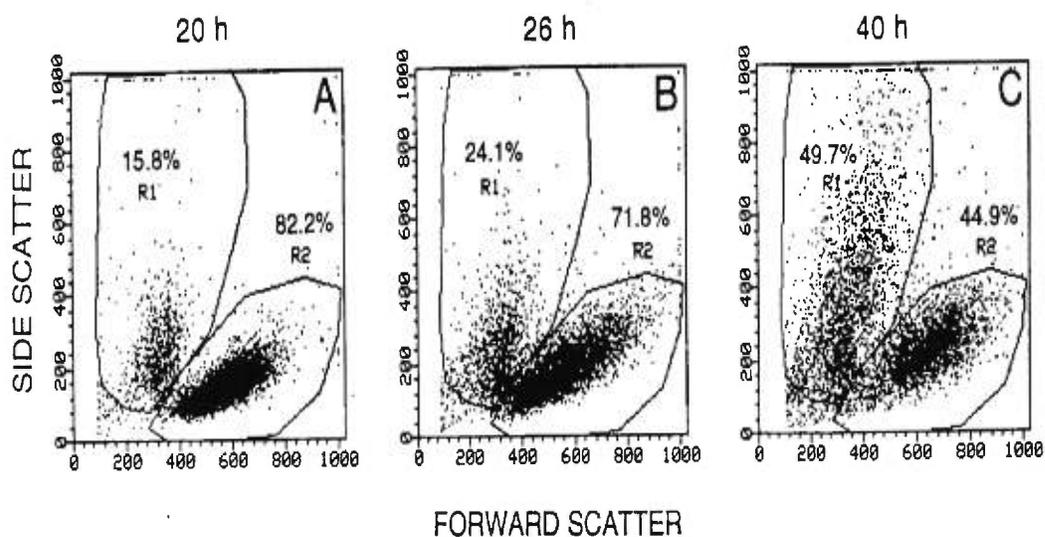
**Figure 1.8.** Fragmentation de l'ADN révélée par électrophorèse sur gel d'agarose. (Tiré de Wesner et Kaufmann, 1997)

membrane plasmique. Les cellules apoptotiques se dissocient des cellules voisines, rapetissent et se transforment en corps apoptotiques, qui sont rapidement phagocytés par les cellules voisines et les macrophages, évitant ainsi le déclenchement du processus inflammatoire.

Le changement de taille des cellules apoptotiques peut être suivi en cytométrie de flux. Il s'agit d'une technique se pratiquant avec un cytomètre, un appareil permettant de mesurer la diffraction de la lumière et la fluorescence émise par les cellules à mesure qu'elles sont aspirées dans l'appareil et qu'elles passent en face d'un rayon laser. Étant donné que les grosses cellules diffractent davantage la lumière que les petites cellules, il est possible de suivre le changement dans la taille des cellules apoptotiques en suivant le changement dans la diffraction de la lumière. En effet, en créant un graphique (voir figure 1.9) dans lequel chaque cellule est représentée par un point, avec sa valeur en FSC en abscisse et sa valeur en SSC en ordonné (FSC représentant la taille des cellules ou forward light scatter, et SSC représentant la complexité interne des cellules ou right angle light scatter), il est possible de mettre en évidence deux populations cellulaires: une située plus à gauche, formée principalement de cellules apoptotiques et une autre située plus à droite, formée de cellules vivantes. En encerclant la population de cellules apoptotiques au moyen d'un logiciel conçu à cet effet, on peut ensuite facilement connaître le pourcentage de cellules apoptotiques [Swat et al., 1991; Dive et al., 1992; Chrest et al., 1993; McCloskey et al., 1994; Shellhaas et Zuckerman, 1995].

### **1.3.2 Génétique de l'apoptose**

Comme vu précédemment, l'apoptose requiert l'activation d'un programme génétique spécifique. Ce sont les études génétiques effectuées chez le nématode *C. elegans* qui ont permis d'identifier les principaux gènes impliqués dans l'apoptose, ainsi que ses mécanismes biochimiques. Ce n'est que plus tard que les



**Figure 1.9.** Quantification de l'apoptose par cytométrie de flux. Il s'agit tout d'abord d'encercler la population cellulaire représentant les cellules apoptotiques ( $R_1$ ), puis de déterminer le pourcentage de cellules apoptotiques dans l'échantillon. Ici, le pourcentage de cellules apoptotiques augmentent en fonction du temps d'exposition à l'anti-CD3. (Tiré de Chrest et al., 1993)

études effectuées chez les mammifères ont permis d'identifier des gènes homologues à ceux identifiés chez le nématode.

Les études génétiques effectuées chez le nématode ont permis d'identifier trois gènes requis pour la mort programmée, EGL-1 [Ellis et Horvitz, 1986; Conradt et Horvitz, 1998], ced-3 et ced-4 [Ellis et Horvitz, 1986], ainsi qu'un gène, ced-9, protégeant les cellules contre la mort cellulaire par apoptose [Hengartner et al., 1992]. Ensuite, la découverte des caspases chez les mammifères, une famille de cystéines-protéases impliquées dans le processus de l'apoptose, a permis de révéler leur homologie avec la protéine ced-3 [Yuan et al., 1993], de même que l'apaf-1 avec la protéine ced-4 [Zou et al., 1997], la famille bcl-2 avec la protéine ced-9 [Hengartner et Horvitz, 1994] et les membres de la famille bcl-2 ayant le domaine BH3 seulement avec la protéine EGL-1 [Conradt et Horvitz, 1998]. Seul le cytochrome c, qui est nécessaire à l'activation de la procaspase-9 chez les mammifères, ne semble pas avoir d'homologue chez le nématode.

### **1.3.2.1 Caspases**

#### **1.3.2.1.1 Structure**

Les caspases sont des protéases que l'on retrouve à l'état inactif dans toutes les cellules vivantes et qui jouent un rôle dans les processus de l'inflammation et de l'apoptose. Dans l'apoptose, certaines caspases à long prodomaine jouent le rôle d'initiateurs (caspase-2, -8, -9 et -10), agissant généralement en amont des caspases à plus petit prodomaine, jouant le rôle d'effecteurs (caspase-3, -6 et -7) [Cohen, 1997; Nicholson et Thornberry, 1997; Ashkenazi et Dixit, 1998], et étant responsables de plusieurs caractéristiques morphologiques associées à l'apoptose. Jusqu'à présent, la famille compte 14 membres (caspase-1 à caspase-14) chez le mammifère, dont trois seraient spécifiques à la souris (caspase-11, caspase-12 et caspase-14) (voir tableau 1.1).

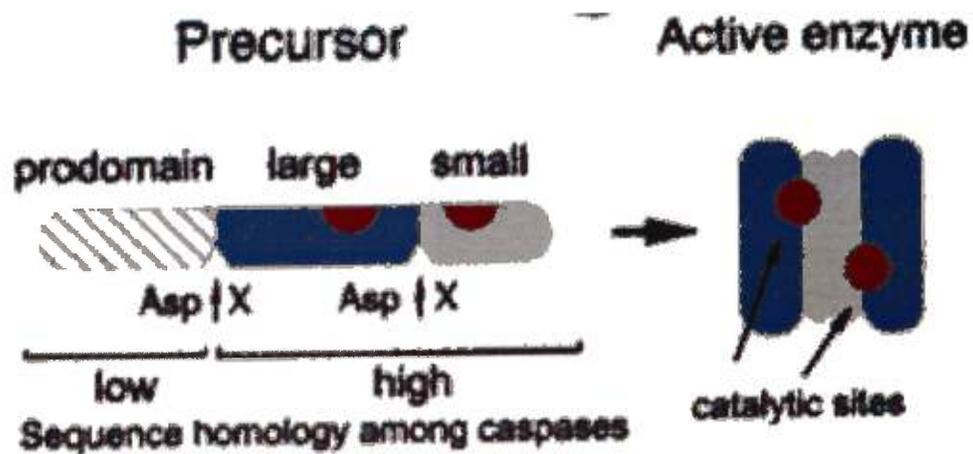
TABLE I  
Caspase characteristics

Zymogen	Prodomain, length and motif	Active subunits	Activation adapter	Tetrapeptide preference <sup>a</sup>
kDa		kDa		
<b>Apoptotic initiators</b>				
Caspase-2 (51)	Long, CARD	20/12	RAIDD	DXXD <sup>b,c</sup>
Caspase-8 (55)	Long, DED	18/11	FADD	(L/V/D)EXD <sup>d</sup>
Caspase-9 (45)	Long, CARD	17/10	APAF-1	(I/V/L)EHD
Caspase-10 (55)	Long, DED	17/12	FADD	Unknown
<b>Apoptotic executioners</b>				
Caspase-3 (32)	Short	17/12	NA <sup>e</sup>	DEXD
Caspase-6 (34)	Short	18/11	NA	(V/T/I)EXD
Caspase-7 (35)	Short	20/12	NA	DEXD
<b>Cytokine processors</b>				
Caspase-1 (45)	Long, CARD	20/10	?CARDIAC	(W/Y/F)EHD
Caspase-4 (43)	Long, CARD	20/10	Unknown	(W/L/F)EHD
Caspase-5 (48)	Long	20/10	Unknown	(W/L/F)EHD
mCaspase-11 <sup>f</sup> (42)	Long	20/10	Unknown	Unknown
mCaspase-12 (50)	Long	20/10	Unknown	Unknown
Caspase-13 (43)	Long	20/10	Unknown	Unknown
mCaspase-14 (30)	Short	20/10	NA	Unknown
<b>Invertebrate caspases</b>				
CED-3 (56)	Long, CARD	17/14	CED-4	DEXD
DCP-1 <sup>g</sup> (36)	Short	22/13	NA	Unknown

**Tableau 1.1.** Caractéristiques des caspases. m signifie murin, NA signifie not applicable et DCP-1 signifie *Drosophila* caspase-1. (Tiré de Wolf et Green, 1999)

Les caspases partagent certaines similarités comme leur séquence en acides aminés, leur structure et leur spécificité pour certains substrats [Nicholson et Thornberry, 1997]. Elles sont toutes exprimées sous forme de proenzymes contenant trois domaines: un prodomaine NH<sub>2</sub>-terminal, une grande sous-unité et une petite sous-unité C-terminal (voir figure 1.10). Leur activation nécessite tout d'abord la protéolyse d'une région d'acides aminés liant la grande et la petite sous-unité, ainsi que celle du prodomaine, suivi de l'association des deux sous-unités. De plus, étant donné que la protéolyse de ces deux régions s'effectue à des séquences d'acides aminés généralement clivés par les caspases elles-mêmes, ces enzymes semblent activées par autocatalyse ou par catalyse par des enzymes de spécificité similaire lors d'une cascade par exemple [Nicholson et Thornberry, 1997].

Les hétérodimères formés par l'association de la grande et de la petite sous-unité s'associent deux par deux pour former des tétramères contenant deux sites actifs agissant séparément (chacun des hétérodimères contenant un site actif formé par des résidus provenant de la grande et de la petite sous-unité). Chaque site actif contient une région chargée positivement (S<sub>1</sub>), responsable de la liaison de l'aspartate chargé négativement et situé en position P<sub>1</sub> sur le substrat, endroit de prédilection pour le clivage par les caspases activées [Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994; Rotonda et al., 1996]. Toutefois, même si toutes les caspases requièrent un aspartate en position P<sub>1</sub> pour la liaison avec leurs substrats, la nature des acides aminés situés en positions P<sub>4</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>2</sub> également requis pour la liaison des caspases avec leurs substrats varie d'une caspase à l'autre (voir tableau 1.1) [Thornberry et al., 1997]. De plus, la préférence dans les acides aminés situés en amont de l'aspartate corrèle généralement avec la fonction des caspases, c'est-à-dire avec leur rôle soit d'initiateurs de l'apoptose, d'effecteurs de l'apoptose ou de processeurs de cytokines.



**Figure 1.10.** Structure des caspases. (Tiré de Thornberry et Lazebnik, 1998)

### 1.3.2.1.2 Rôle

Le rôle des caspases initiatrices dans la transmission du signal de mort cellulaire, ainsi que la place occupée par les caspases au sein des principales voies biochimiques impliquées dans l'apoptose seront vus ultérieurement. Toutefois, le rôle des caspases effectrices au niveau de l'apparition des changements morphologiques observés lors de l'apoptose sera vu à l'instant.

En effet, les caspases semblent responsables des changements morphologiques associés à l'apoptose, étant donné que l'inhibition de celles-ci semble prévenir leur apparition, même si elle ne prévient pas toujours la mort cellulaire [Grenn et Kroemer, 1998]. L'identification des substrats des caspases (voir tableau 1.2) a permis de comprendre en partie comment celles-ci promeuvent les changements observés. Tout d'abord, les caspases clivent et activent des protéines tel que l'ICAD, la gelsoline, la PAK2 (p21-activated kinase 2), la MEKK1 et la PKC $\delta$  [Cohen, 1997; Nicholson et Thornberry 1997; Cryns et Yuan, 1998], qui ont un impact direct sur le phénotype apoptotique. Par exemple, la caspase-3 en clivant l'ICAD, entraîne le relâchement de la CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) active, qui ensuite clive l'ADN et promeut la condensation de la chromatine. De la même façon, la caspase-3 clive et active le gelsoline, qui promeut alors certains changements cytoplasmiques et nucléaires, dont la fragmentation de l'ADN. L'activation des kinases PAK2, MEKK1 et PKC $\delta$  par les caspases promeut également les changements cytoplasmiques et nucléaires associés à l'apoptose. Les caspases clivent aussi des protéines structurales du noyau et du cytosquelette [Cohen, 1997; Nicholson et Thornberry 1997; Gohring et al., 1997; Cryns et Yuan, 1998]. La protéolyse des lamines, du NuMa et du SAF-A promeut probablement la dissolution nucléaire, alors que celle de la fodrine, du Gas2, des kératines, de la Rabaptine-5 et de l'actine promeut probablement la perte de l'intégrité cytosquelettale. Également, le clivage de la  $\beta$ -catenine et de la FAK pourraient peut-être interrompre les contacts cellule-cellule, favorisant eux aussi la réorganisation structurale des cellules.

TABLE II  
*Apoptotic substrates*

The abbreviations used are: DNA-PK<sub>CS</sub>, DNA protein kinase catalytic subunit; U1-70kDa, U1-specific 70-kDa protein; RFC-140, replication factor C; HnRNP, heteronuclear ribonucleoproteins; GDI, GDP dissociation inhibitor; cPLA<sub>2</sub>, cytoplasmic phospholipase A<sub>2</sub>; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase.

Substrate class	Putative function	Examples
Pro- and anti-apoptotic proteins	Signal amplification Inhibitor inactivation	Procaspases, Bcl-2, Bcl-X <sub>L</sub> , Bid, p28Bap31
Components of the apoptotic machinery	Induction of the apoptotic phenotype	ICAD, gelsolin, PAK2, MEKK1, PKC $\delta$
Structural proteins and associated molecules	Dissolution of cell integrity Cellular packaging	Lamins, NuMa, SAF-A, fodrin, Gas2, keratins, actin, Rabaptin-5, $\beta$ -catenin, FAK
Homeostatic proteins	Disruption of macromolecular synthesis and cellular repair mechanisms Termination of survival signals	DNA-PK <sub>CS</sub> , PARP, U1-70kDa, RFC-140, HnRNPs, D4-GDI, transcription factors
Other	Unknown ?Apoptosis induction	Huntingtin, presenilins, atrophin-1, ataxin-3, cPLA <sub>2</sub>

Tableau 1.2. Substrats des caspases. (Tiré de Wolf et Green, 1999)

D'autres protéines clivées par les caspases au cours de l'apoptose sont les protéines nécessaires à la signalisation cellulaire, la réparation cellulaire et la synthèse des macromolécules [Cohen, 1997; Nicholson et Thornberry 1997; Cryns et Yuan, 1998]. Par exemple, les caspases inactivent ou dérèglent certaines protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme la DNA-PK<sub>cs</sub>, dans l'épissage de l'ARN<sub>m</sub> comme la U1-70K et dans la réplication de l'ADN comme le RFC-140. Les caspases clivent aussi les présénilines, l'huntingtine, l'atrophine-1 et d'autres protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives [Goldberg et al., 1996; Wolozin et al., 1996; Cohen, 1997; Nicholson et Thornberry 1997; Cryns et Yuan, 1998; Wellington et al., 1998].

#### **1.3.2.1.3 Régulation de l'activité**

L'activité des caspases est régulée de plusieurs façons, dont certaines seront vues plus en détail ultérieurement. Tout d'abord, les caspases effectrices sont régulées par les caspases initiatrices qui les activent et qui elles-mêmes sont régulées et activées par la liaison des ligands de mort cellulaire à leurs récepteurs membranaires et/ou par un signal provenant de la mitochondrie. Ensuite, l'activation de la procaspase-8 par exemple est régulée par la présence d'une protéine appelée FLIP, qui lui fait compétition pour la liaison avec FADD, un cofacteur important dans l'activation de la procaspase-8 par les récepteurs de mort cellulaire [Irmeler et al., 1997; Goltsev et al., 1997]. Également, l'activité des caspases est régulée par la présence des IAPs, une classe de protéines inhibitrices des caspases. Trois classes distinctes d'inhibiteurs viraux des caspases ont été décrites: CrmA [Ray et al., 1992], p35 [Bump et al., 1995; Xue et Horvitz, 1995] et la famille des IAPs (inhibitors of apoptosis) [Uren et al., 1998]. Par contre, seule la famille des IAPs semble avoir des membres chez les mammifères. Le mécanisme d'action exact de ces protéines est présentement inconnu. D'un côté, les IAPs inhibent l'apoptose en interférant directement avec l'activité catalytique de certaines caspases [Roy et al., 1997; Deveraux et al., 1997]. D'un autre côté,

les IAP peuvent aussi prévenir l'activation des procaspases lorsque surexprimés [Seshagiri et Miller, 1997].

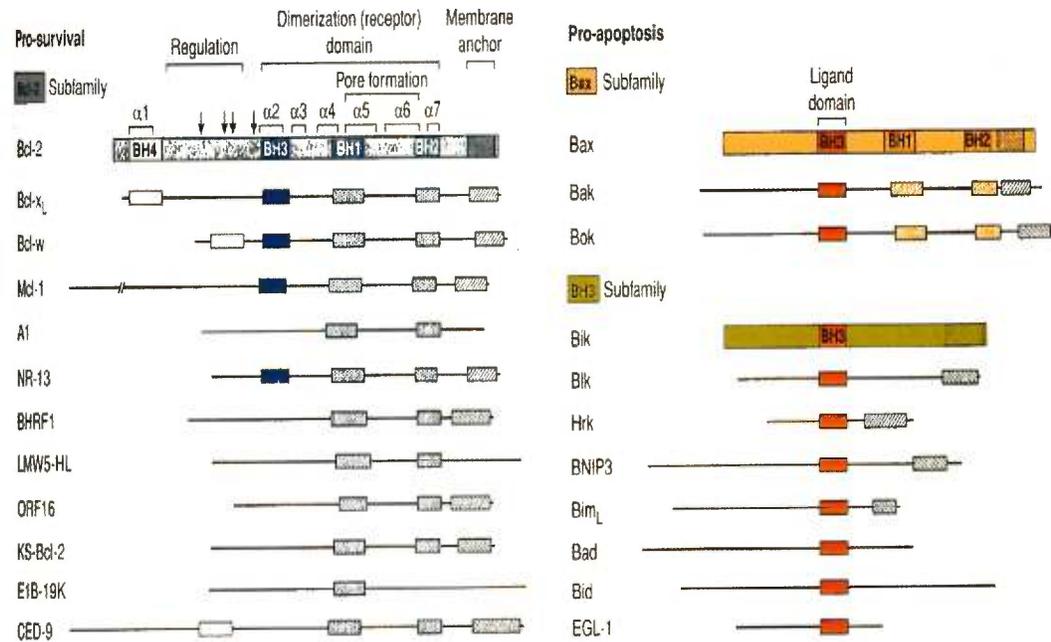
### **1.3.2.2 Membres de la famille bcl-2**

#### **1.3.2.2.1 Structure**

La famille bcl-2, dont l'homologie avec la protéine ced-9 a été démontrée, comporte au moins 15 membres chez les mammifères (voir figure 1.11). Par contre, contrairement à ced-9, dont l'activité est antiapoptotique chez les nématodes, la famille bcl-2 comporte des membres qui sont antiapoptotiques pour certains, et proapoptotiques pour d'autres. Tous les membres possèdent au moins un des quatre domaines d'homologie bcl-2 (BH1 à BH4). La plupart des membres antiapoptotiques, dont les plus connus sont bcl-2 et bcl-xl contiennent au moins BH1 et BH2, et ceux qui ressemblent le plus à bcl-2 contiennent les quatre domaines. Les membres proapoptotiques, eux, se divisent en deux sous-familles, soit celle de Bax, bak et bok, qui contiennent tous BH1, BH2 et BH3, et celle de bik, bad et bid entre autres, qui ne contiennent que le domaine BH3 [Adams et Cory, 1998].

#### **1.3.2.2.2 Rôle**

Le rôle des membres de la famille bcl-2 dans l'apoptose est soit de favoriser ou d'empêcher l'apoptose. Par contre, le mécanisme exact selon lequel agissent les membres de la famille bcl-2 pour exercer leur activité pro et antiapoptotique ne sont pas complètement élucidés. Il semblerait qu'ils pourraient agir 1) au niveau de la libération du cytochrome c de la mitochondrie par l'entremise du PTP [Kroemer et al., 1997; Marzo et al., 1998] ou directement par leur capacité de former des canaux ioniques [Minn et al., 1997; Schendel 1997; Schlesinger 1997; Antonsson et al., 1997] (voir plus bas) et 2) directement au niveau de l'association de l'apaf-1 avec la procaspase-9, en empêchant l'association en



**Figure 1.11.** Structure des membres de la famille bcl-2. Toutes les protéines sont retrouvées chez les mammifères à l'exception de NR-13 (poulet), CED-9 et EGL-1 (*C. elegans*), et les protéines virales BHRF1, LMW5-HL, ORF16, KS-Bcl-2 et E1B-9K. (Tiré de Adams et Cory, 1998)

liant l'apaf-1 dans le cas des membres antiapoptotiques, et en libérant l'apaf-1 de son association avec les membres antiapoptotiques dans le cas des membres proapoptotiques [Chinnaiyan et al., 1998; Chaudhary et al., 1998; Pan et al., 1998; Hu et al., 1998]. Peu importe le(s) mécanisme(s) employé(s) par les membres de la famille bcl-2, leurs effets ne peuvent pas être réduits à des effets activateurs ou inhibiteurs des caspases seulement, étant donné que (1) les membres de la famille bcl-2 régulent une variété d'événements mitochondriaux même en présence d'inhibiteurs des caspases; (2) bcl-2 peut inhiber non seulement l'apoptose dépendante des caspases, mais aussi la nécrose induite par l'hypoxie; (3) bax et bak peuvent induire le relâchement du cytochrome c et la mort cellulaire chez des cellules qui ne possèdent pas de caspases, et bcl-2 peut les protéger [Xiang et al., 1996; Jurgensmeier et al., 1998].

### 1.3.2.2.3 Régulation

Comme dans le cas des caspases, l'activité des membres de la famille bcl-2 est régulée de plusieurs façons. Tout d'abord, les membres pro et antiapoptotiques de la famille peuvent former des hétérodimères inactifs pour l'une ou l'autre de ces fonctions. Conséquemment, le ratio des membres antiapoptotiques par rapport aux membres proapoptotiques détermine la susceptibilité face à un stimulus de mort cellulaire [Oltvai et al., 1993]. Ils peuvent également former des homodimères actifs. Par exemple, bax est capable de former un hétérodimère avec bcl-2, de même qu'un homodimère avec lui-même [Oltvai et al., 1993]. Également, certains membres proapoptotiques peuvent préférer former des hétérodimères avec certains membres antiapoptotiques plutôt que d'autres. Par exemple, bok interagit avec mcl-1, mais pas avec bcl-2, bcl-xl ou bcl-w [Hsu et al., 1997; Inohara et al., 1998].

L'activité des membres de la famille bcl-2 est régulée également à travers la phosphorylation. Par exemple, bad, qui se trouve ordinairement dans le cytosol, doit être translocalisé à la membrane mitochondriale où se trouve bcl-2 et bcl-xl

pour exercer sa fonction proapoptotique. Par contre, en présence d'un facteur de survie comme l'Il-3, la phosphorylation de bad l'empêche de se relocaliser à la membrane mitochondriale et d'exercer son activité proapoptotique [Zha et al., 1996; del Peso et al., 1997; Datta et al., 1997]. De la même façon, la phosphorylation de bcl-2 lors du traitement par un inhibiteur des microtubules comme le taxol, l'inactive [May et al., 1994; Halder et al., 1995].

Finalement, la régulation se fait aussi par l'activation de la transcription des membres. Par exemple, la transcription de plusieurs membres antiapoptotiques est induite par certaines cytokines [Lin et al., 1993; Kosopas et al., 1993; Boise et al., 1995; Maraskovsky et al., 1997; Akashi et al., 1997; Chao et al., 1998], et la transcription de bax est induite par p53 lors de la réponse à un dommage cellulaire [Miyashita et Reed, 1995; Han et al., 1996].

### **1.3.2.3 Apaf-1**

L'apaf-1 a été découvert récemment, alors que l'on cherchait activement un homologue de la protéine ced-4 chez le mammifère. Il comporte trois domaines. Dans sa région N-terminal, il comporte un domaine nécessaire pour la liaison de la procaspase-9, et qui ressemble au domaine appelé CARD retrouvé chez certaines caspases dont les caspases 1, 2 et 9 [Hofmann et al., 1997], bien que seule la procaspase-9 soit activée par l'apaf-1 [Hu et al., 1998]. Ensuite, il contient une région de 301 acides aminés qui démontre 50% d'analogie avec la séquence en acides aminés de la protéine ced-4 et dont la mutation entraîne l'inhibition complète de l'activité de l'apaf-1 et de ced-4 [Seshagiri et Miller, 1997; Zou et al., 1999]. Finalement, la partie C-terminal de la protéine est composée d'un motif nécessaire aux interactions protéine-protéine. Le rôle de l'apaf-1 dans l'apoptose sera vu dans la section qui suit.

### 1.3.3 Voies biochimiques de l'apoptose

La découverte des principaux joueurs impliqués dans le processus de l'apoptose, ainsi que l'élucidation de leurs principales fonctions a permis de reconstituer certaines voies biochimiques de l'apoptose. À ce jour, deux principales voies biochimiques menant à l'activation des caspases effectrices responsables de la morphologie caractéristique de l'apoptose ont été élucidées. La première a comme point de départ la liaison des ligands de mort cellulaire à leurs récepteurs membranaires, et la deuxième, la mitochondrie.

#### 1.3.3.1 Récepteurs de mort cellulaire

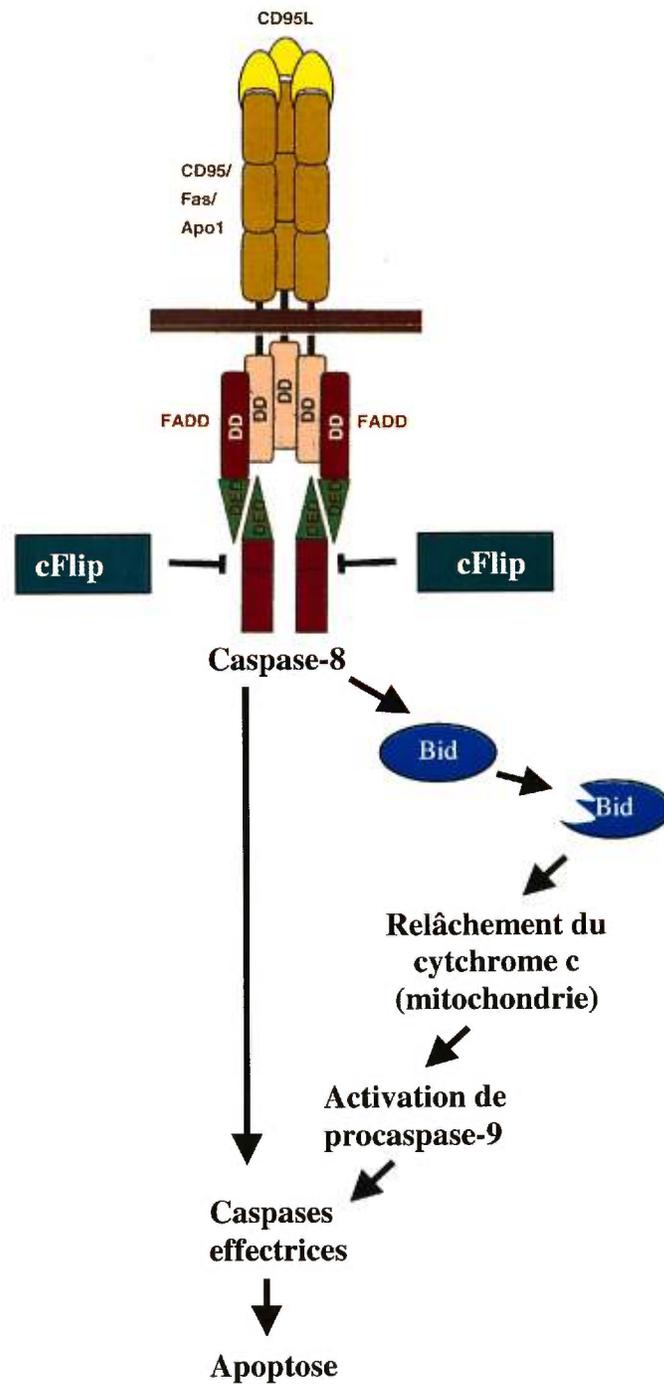
Les récepteurs de mort cellulaire sont des protéines transmembranaires situées à la surface des cellules, qui font tous partie de la grande famille des récepteurs TNF (tumor necrosis factor)/NGF (nerve growth factor). Chez les mammifères, on en retrouve cinq: Fas/Apo-1/CD95 et TNFR1 [Smith et al., 1995; Gruss et Dower, 1995; Nagata, 1997], DR-3/Apo-3/WSL-1/TRAMP [Chinnaiyan et al., 1996; Marsters et al., 1996; Kitson et al., 1996; Bodmer et al., 1997; Screaton et al., 1997], DR4/TRAIL-R1 [Pan et al., 1997] et DR5/TRAIL-R2/TRICK2/KILLER [Pan et al., 1997; Sheridan et al., 1997; Walczak et al., 1997; Wu et al., 1997; Chaudhary et al., 1997; Screaton et al., 1997; Schneider et al., 1997]. Ces récepteurs comportent tous une région riche en cystéine dans leur domaine extracellulaire [Smith et al., 1995; Gruss et Dower, 1995], ainsi qu'une région appelée "death domain" (DD) dans leur domaine cytoplasmique [Tartaglia et al., 1993; Nagata, 1997], requise pour la transmission du signal de mort. Leurs ligands respectifs sont les suivants: Fas/CD95 ligand (FasL), TNF et lymphotoxine  $\alpha$ , Apo3 ligand (Apo3L), Apo2 ligand (Apo2L), et Apo2L respectivement.

### 1.3.3.1.1 Fas

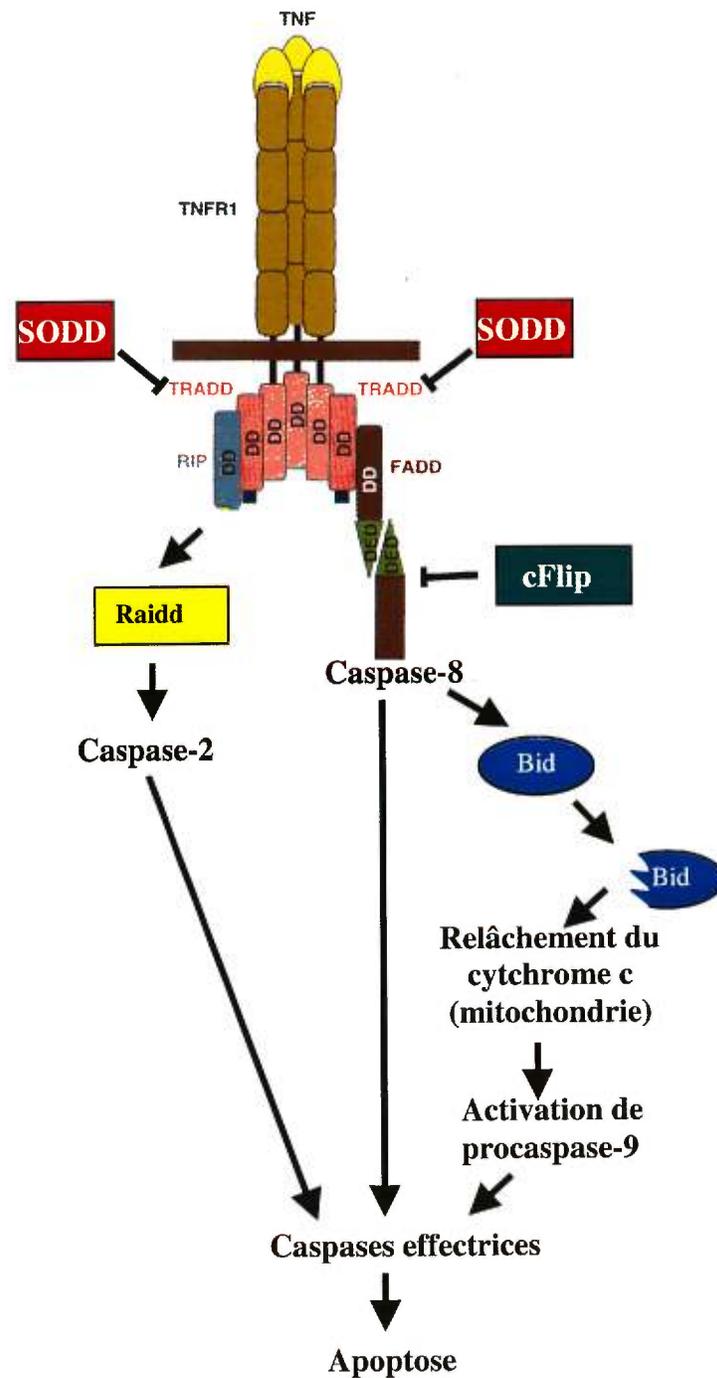
Le FasL est une molécule homotrimérique, qui se lie à trois molécules de Fas (voir figure 1.12) [Smith et al., 1995; Gruss et Dower, 1995; Nagata, 1997]. Ceci entraîne l'agrégation des DDs de chaque molécule [Huang et al., 1996]. Ensuite, une protéine appelée FADD (Fas-associated death domain) [Chinnaiyan et al., 1995; Boldin et al., 1995] se lie à l'agrégat de DDs par l'entremise de son propre DD, et va lier la procaspase-8 par une région appelée "death effector domain" (DED), également présente sur la protéase [Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996]. La procaspase-8 subit alors une oligomérisation qui semble responsable de son activation par autoclivage [Muzio et al., 1998]. La caspase-8 peut alors activer les caspases 3, 6 et 7 par clivage direct [Muzio et al., 1996; Scrinivasula et al., 1996]. Cette voie semble prédominante lorsque la caspase-8 est présente en grande concentration [Kuwana et al., 1999]. Par contre, lorsque les concentrations de caspase-8 sont plus faibles, la voie prédominante est celle du clivage de bid par la caspase-8. Une fois clivé, bid va activer les autres caspases en favorisant le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie (décrit plus loin). D'autres caspases, comme la caspase-3, peuvent également cliver bid et entraîner conséquemment le relâchement du cytochrome c [Luo et al., 1998], ce qui suggère que bid puisse aussi servir à amplifier d'autres signaux apoptotiques mis à part ceux provenant des récepteurs de mort.

### 1.3.3.1.2 TNFR-1 et DR3

La liaison du TNF à son récepteur entraîne la trimérisation de ce dernier (voir figure 1.13) [Smith et al., 1995; Gruss et Dower, 1995], ainsi que l'association des DDs. Ensuite, une molécule appelée TRADD (TNFR-associated death domain) [Hsu et al., 1995] se lie à l'agrégat de DDs par l'entremise de son propre DD. TRADD recrute alors trois molécules, dont deux semblent responsables de la transmission du signal de mort, FADD [Hsu et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996; Varfolomeev et al., 1996] et RIP (receptor interacting protein) [Hsu et al., 1996b;



**Figure 1.12.** Les voies de signalisation de l'apoptose à partir de Fas. Les flèches représentent l'activation, et le symbole en forme de T, l'inhibition. (Modifié de Ashkenazi et Dixit, 1998)



**Figure 1.13.** Les voies de signalisation de l'apoptose à partir de TNFR-1. Les flèches représentent l'activation, et le symbole en forme de T, l'inhibition. (Modifié de Ashkenazi et Dixit, 1998)

Ting et al., 1996]. Lorsque FADD est recruté, il active la caspase-8 [Hsu et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996; Varfolomeev et al., 1996], comme dans la cascade initiée par la liaison du FasL avec son récepteur. Par contre, lorsque RIP se lie à TRADD, il recrute une molécule appelée RAIDD [Duan et Dixit, 1997; Ahmad et al., 1997], qui se lie à RIP par son DD et qui active la caspase-2 en s'y liant grâce à un domaine appelé CARD présent aussi chez la caspase-2.

La liaison de l'Apo3L, qui ressemble beaucoup au TNF [Marsters et al., 1998], à son récepteur, DR3, entraîne une voie de signalisation identique à celle entraînée par la liaison du TNF à TNFR-1, c'est-à-dire le recrutement de TRADD, FADD et de la caspase-8.

#### **1.3.3.1.3 DR4 et DR5**

La liaison de l'Apo2L entraîne la trimérisation de son récepteur (DR4 et/ou DR5), ainsi que l'association des DDs. Par contre, le reste de la cascade de signalisation n'est pas complètement élucidé. On sait par exemple que FADD ne semble pas être toujours requis pour l'induction de l'apoptose par l'Apo2L [Marsters et al., 1996].

#### **1.3.3.1.4 Régulation**

La transmission du signal de mort cellulaire à partir des récepteurs transmembranaires est régulée de plusieurs façons. Tout d'abord, comme mentionné dans la section traitant des caspases, l'activation de la procaspase-8 à partir de sa liaison à FADD est régulée par une protéine appelée cFLIP. Étant donné que cette protéine, qui contient un DED semblable à celui de FADD et de la procaspase-8, est capable de se lier à FADD, elle bloque l'activation de la procaspase-8 en faisant compétition à cette dernière pour le DED de FADD [Irmeler et al., 1997; Goltsev et al., 1997].

Ensuite, une série de récepteurs non fonctionnels se situant dans la membrane cellulaire servent à empêcher la transmission du signal de mort à partir des récepteurs fonctionnels. Par exemple, un récepteur non fonctionnel appelé DcR3 semble pouvoir inhiber l'apoptose induite par le FasL en liant celui-ci, l'empêchant ainsi de pouvoir activer FAS [Pitti et al., 1998]. Aussi, deux récepteurs appelés DcR1 et DcR2, semblent pouvoir inhiber l'apoptose induite par l'Apo2L en entrant en compétition avec DR4 et DR5 pour la liaison avec ce ligand [Golstein, 1997].

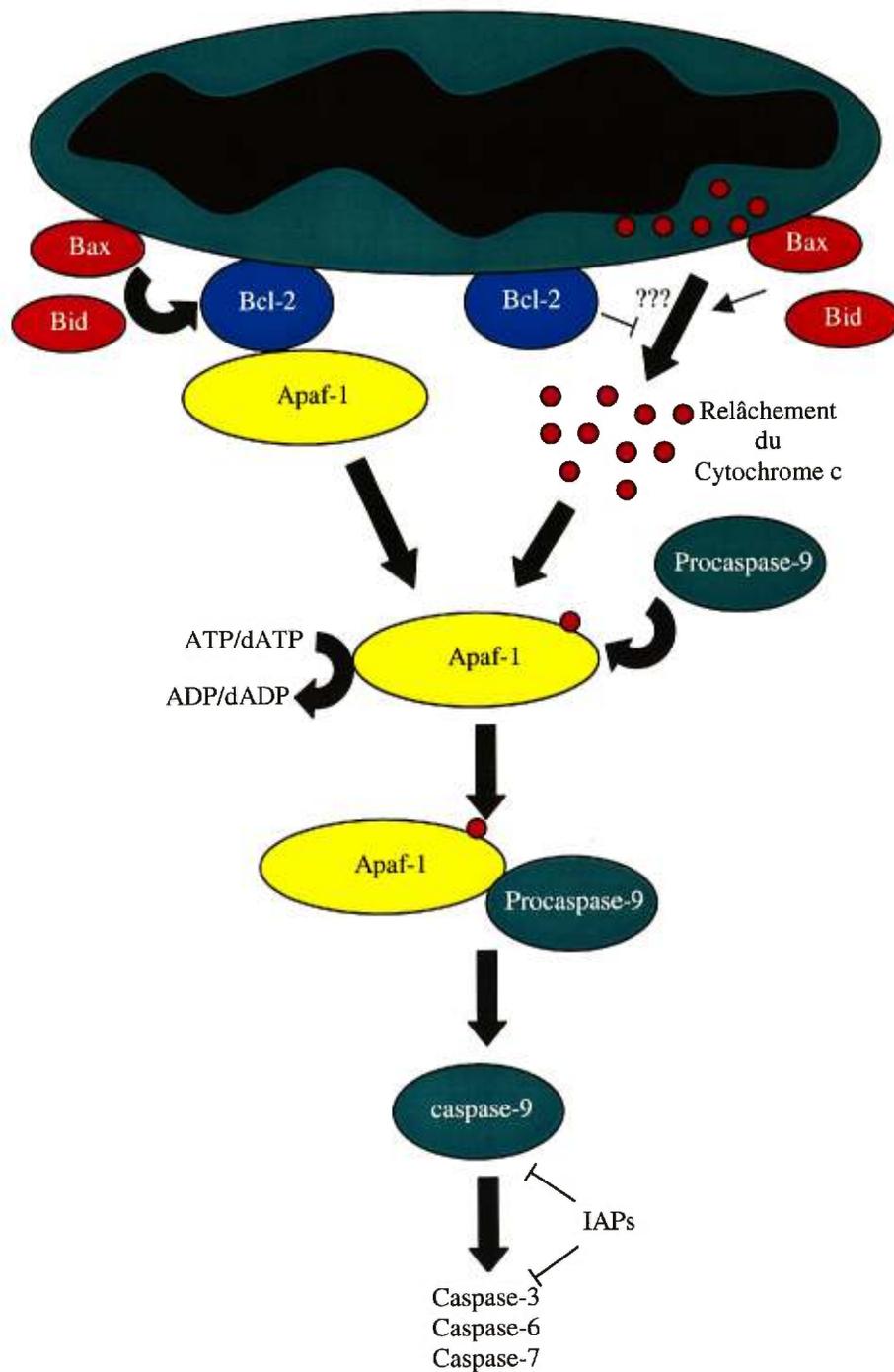
Finalement, on a démontré récemment qu'une protéine appelée SODD (silencer of DD) [Jiang et al., 1999] pouvait inhiber l'apoptose par TNFR-1 lorsque son ligand, le TNF, est absent. Cette protéine se lierait au DD de TNFR-1.

### **1.3.3.2 Mitochondrie**

Une autre voie biochimique de l'apoptose semble avoir comme point de départ la mitochondrie (voir figure 1.14). En effet, la mitochondrie semble impliquée dans l'apoptose en initiant les voies biochimiques menant à l'apoptose cellulaire, mais aussi en amplifiant la signalisation lors de l'apoptose induite par les récepteurs de mort, par l'entremise de bid comme vu précédemment.

La cascade débute par le relâchement du cytochrome c de l'intérieur de la mitochondrie vers le cytoplasme suite à un dommage mitochondrial. Ensuite, l'apaf-1 lie l'ATP et le dATP, et les hydrolyse en ADP et dADP respectivement. Ceci entraîne la formation d'un complexe apaf-1/cytochrome c, qui va ensuite recruter et activer la procaspase-9 par autocatalyse [Zou et al., 1999]. Finalement, la caspase-9 active est relâchée du complexe pour aller cliver et activer les caspases effectrices 3, 6, et 7.

Le rôle du cytochrome c comme transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie est connu depuis longtemps. Par contre, la



**Figure 1.14.** Les voies de signalisation de l'apoptose à partir de la mitochondrie.

découverte de son rôle dans l'apoptose chez les mammifères est plus récente. Il a été démontré qu'il est en effet relâché de la mitochondrie lors de l'apoptose, mais le mécanisme responsable de cette libération est encore inconnu. Au moins trois hypothèses ont été postulées pour tenter d'expliquer le mécanisme de libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire de la mitochondrie vers le cytoplasme, où se trouvent l'apaf-1 et la procaspase-9: la théorie du PTP, le modèle du flux d'ions et le modèle des protéines à domaine BH3 seulement.

#### La théorie du PTP (permeability transition pore)

Il est généralement accepté que les membres proapoptotiques de la famille bcl-2 comme bax et bid favorisent la libération du cytochrome c [Rosse et al., 1998, Juergensmeier et al., 1998; Uo et al., 1998; Li et al., 1998; Kuwana et al., 1998; Gross et al., 1999], alors que bcl-2 et bcl-xl bloquent sa libération [Yang et al., 1997; Kluck et al., 1997; Vander Heiden et al., 1997; Scaffidi et al., 1998]. Un des mécanismes proposés veut que les membres de la famille bcl-2 régulent le fonctionnement du PTP [Kroemer et al., 1997; Marzo et al., 1998], un pore qui lui-même régule le potentiel de la membrane interne de la mitochondrie, qui est souvent modifié au cours de l'apoptose. Bien qu'on ne connaisse pas encore comment l'ouverture de ce pore pourrait entraîner la perte de l'intégrité de la membrane externe, il semblerait que la perturbation des gradients osmotique et électrostatique entraînerait le gonflement de la mitochondrie et le relâchement du calcium, du cytochrome c et de l'AIF (apoptosis-inducing factor) [Kroemer et al., 1997].

#### Le modèle du flux d'ions

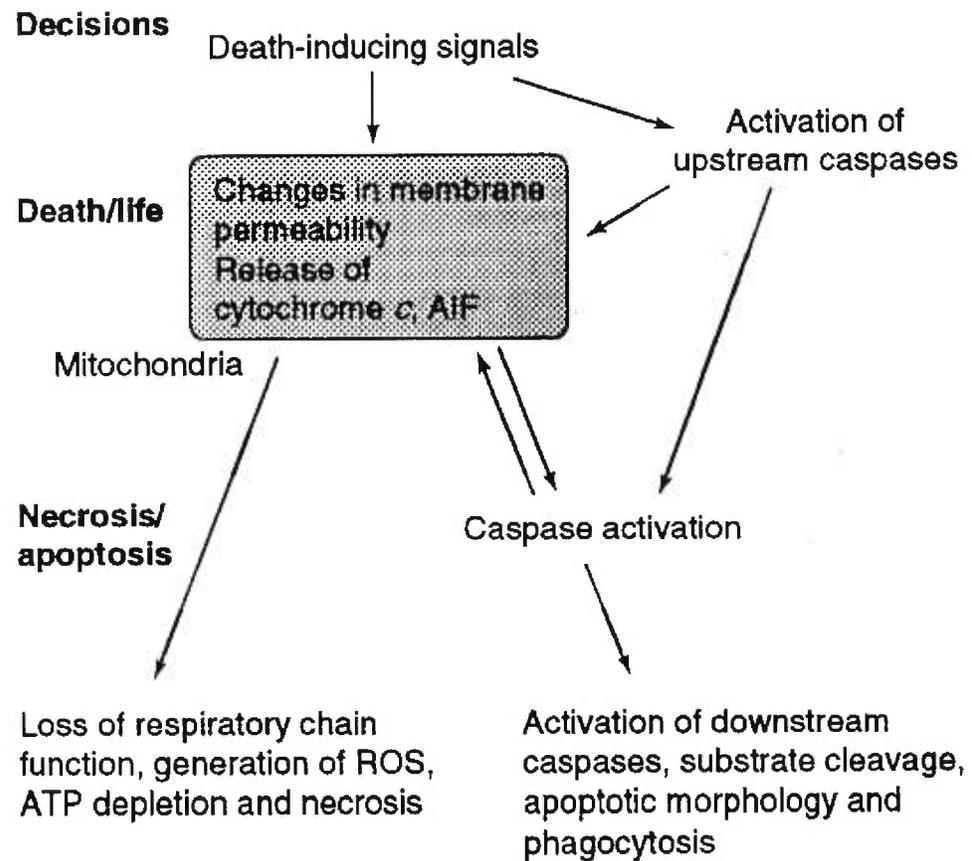
Une autre hypothèse formulée dans le but d'expliquer le rôle de la famille bcl-2 dans la régulation de la libération du cytochrome c veut que certains membres de cette famille agissent comme des canaux ioniques à la surface de la mitochondrie. Il a été démontré que bcl-xl forme un canal ionique spécifique aux cations dans

les doubles membranes lipidiques [Minn et al., 1997; Schendel 1997; Schlesinger 1997], et bax un canal ionique spécifique aux anions [Antonsson et al., 1997]. Donc, le ratio de membres proapoptotiques par rapport aux membres antiapoptotiques déterminerait le flux des ions et conséquemment, le flux d'eau à travers la mitochondrie [Shimizu et al., 1998], causant ou non le gonflement de la mitochondrie, la rupture de la membrane externe et le relâchement du cytochrome c [Vander Heiden et al., 1997]. De façon alternative, le flux des ions à travers ces canaux ioniques pourrait influencer l'ouverture du PTP.

#### *Le modèle des protéines à domaine BH3*

Il a également été postulé que les membres de la famille bcl-2 à domaine BH3 seulement, comme bid, bad, bik et bim, qui ne possèdent pas la capacité de former des canaux ioniques, pourraient agir au niveau de la mitochondrie d'une façon différente et non élucidée pour favoriser la relâchement du cytochrome c.

Peu importe le mécanisme responsable de la libération du cytochrome c de la mitochondrie, il apparaît évident que sa libération est essentielle à l'activation de la procaspase-9 et que la mitochondrie occupe une place importante dans la transmission du signal de mort cellulaire. Il a même récemment été proposé que la mitochondrie serait responsable de la décision mort/vie, étant donné qu'une perturbation de la fonction mitochondriale tel que l'ouverture du PTP peut difficilement être compatible avec la vie, que les caspases soient actives ou non. Les caspases, elles, feraient davantage partie de la décision apoptose/nécrose, étant donné que l'inhibition des caspases entraîne une mort cellulaire de morphologie différente de l'apoptose, s'apparentant à la nécrose (voir figure 1.15). De plus, comme l'ATP semble être nécessaire pour l'activation de la caspase-9 par l'apaf-1 et que les niveaux d'ATP peuvent être compromis lors d'une perturbation mitochondriale, la décision apoptose/nécrose dépendrait également du niveau d'ATP disponible [Green et Kroemer, 1998].



**Figure 1.15.** Les caspases et la mitochondrie dans les décisions mort/vie et nécrose/apoptose. (Tiré de Green et Kroemer, 1998)

Les études biochimiques et génétiques ont grandement contribué à parfaire nos connaissances des voies biochimiques impliquées dans la transmission du signal de mort cellulaire. Il apparaît maintenant évident qu'il n'existe pas qu'un seul chemin vers l'apoptose. En effet, au moins deux voies biochimiques ont été identifiées, celle de l'activation des caspases par les récepteurs de mort cellulaire et celle ayant comme point de départ la perturbation mitochondriale. De plus, la découverte récente que bid peut être clivé par la caspase-8 et la caspase-3 pour aller favoriser le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie a permis de concevoir un système dans lequel les deux voies n'agiraient pas de façon complètement indépendante l'une de l'autre, mais plutôt en symbiose.

L'élucidation des principaux joueurs ainsi que des principales voies biochimiques impliquées dans le processus de l'apoptose est d'une grande importance pour l'éventuel développement de nouvelles stratégies dans le traitement de maladies résultant d'une dérégulation de l'apoptose. En effet, plusieurs maladies humaines sont causées par une mortalité cellulaire excessive, tel que les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie du Parkinson, accident vasculaire cérébral) et le SIDA, alors que d'autres sont causées par une mortalité cellulaire insuffisante, comme le cancer et les maladies auto-immunes [Carson et Ribeiro, 1993]. De grandes questions au niveau des joueurs impliqués dans l'apoptose subsistent encore, et d'autres voies biochimiques importantes attendent sûrement d'être découvertes; à nous de relever le défi.

## **CHAPITRE 2**

### **EFFECTS OF A MYCOBACTERIAL CELL WALL PREPARATION IN COMBINATION WITH OTHER ANTICANCER AGENTS ON HUMAN LEUKEMIA CELL LINES**

**Isabelle Ménard and Nigel C. Phillips.**

*Leukemia Research, submitted*

## 2.1 ABSTRACT

MCC is a mycobacterial cell wall-DNA composition with demonstrated anticancer activity. Combinations between MCC and three chemotherapeutic agents were carried out in Jurkat and HL-60 cell lines. Additivity for cell proliferation inhibition was found between MCC+Ara-C and MCC+Mit at all concentrations tested in both cell lines. Additivity was also found between MCC+Vcr at all concentrations tested in HL-60 cells, and at all but one concentration in Jurkat cells, which proved to be synergistic on both cell proliferation inhibition and apoptosis induction.

## 2.2 INTRODUCTION

Apoptosis [Webb et al., 1997; Cohen, 1993] is an evolutionarily conserved form of cell death that plays an important role in development and homeostasis. Contrary to necrosis, a passive form of cell death induced by severe and sudden traumas such as hypoxia and hyperthermia, apoptosis is genetically controlled. In fact, several genes play critical roles in the induction and execution of this form of programmed cell death: the bcl-2 gene family, that encodes proteins that either promote (bax, bid) or inhibit (bcl-2, bcl-x1, bad) apoptosis [Reed, 1997; Adams et Cory, 1998; Chao and Korsmeyer, 1998], the gene(s) encoding a group of cysteine proteases, the caspases, involved in both the initiation and the execution of apoptosis [Thornberry and Lazebnik, 1998; Wolf and Green, 1999; Thornberry et al., 1997], and the gene encoding apaf-1, a protein required for the activation of procaspase-9 following the release of cytochrome c from the mitochondria [Adams et Cory, 1998].

MCC is a cell wall composition derived from *Mycobacterium phlei*, a non-pathogenic organism found in soil, on plants and in water [Mallick et al., 1985; Papapetropoulou et al., 1997]. It has been shown to induce IL-12 synthesis by monocytes and macrophages [Filion and Phillips, in press], a cytokine known to possess anticancer activity [Izquierdo et al., 1996; Stine et al., 1996]. Like many other chemotherapeutic agents used in the treatment of cancers, it has also been shown to inhibit cancer cell proliferation and induce apoptosis [Filion et al., 1998], an activity that appears to be related to the presence of mycobacterial DNA in the form of short oligonucleotides on the cell wall surface [Filion et al., 1998].

The aim of the present study was to examine the effect of combinations between MCC and other anticancer agents, on the *in vitro* inhibition of HL-60 and Jurkat cell proliferation. Considering the nature of the interaction between drugs in combination depends on the mechanism of action of each drug, three chemotherapeutic agents of different mechanisms of action were chosen to be

combined with MCC: 1) cytosine arabinoside, an antimetabolite that inhibits polymerases  $\alpha$  and  $\beta$  and incorporates into elongating DNA to induce relative or final termination [Grant, 1998]; 2) mitoxantrone, a DNA binding drug that intercalates between DNA base pairs and inhibits topoisomerase II [Durr et al., 1983]; and 3) vincristine, an antimicrotubule agent that interacts with monomeric tubulin to prevent its polymerization [Rowinsky et Donehower, 1996].

We show that MCC interacts in an additive manner with cytosine arabinoside and mitoxantrone to inhibit cell proliferation in both cell lines, at all concentrations tested. We also show that MCC interacts in an additive manner with vincristine to inhibit cell proliferation in HL-60 cells at all concentrations tested, and in Jurkat cells at all but one concentration, 0.05  $\mu\text{g/ml}$  Vcr+MCC 100  $\mu\text{g/ml}$ , which proved to be synergistic on both cell proliferation inhibition and apoptosis induction. Finally, we show that a flow cytometric method using the scattering properties of cells to detect and quantitate apoptotic cells can be used to study the effect of drug combinations on the induction of apoptosis.

## 2.3 MATERIALS AND METHODS

### Cell lines

Jurkat human T-cell lymphocytic leukemia cells (doubling time 20 h) and HL-60 human promyelocytic leukemia cells (doubling time 24 h) were obtained from the American Type Tissue Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) and were maintained in our laboratory. Jurkat cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 10 µg/ml gentamicin, and HL-60 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 10 µg/ml gentamicin (DMEM and RPMI 1640 were obtained from Mediatech Inc., Herndon, Virginia, USA; fetal calf serum and gentamicin were obtained from Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canada). All cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

### Drugs

Cytosine arabinoside (Ara-C), mitoxantrone (Mit), vincristine (Vcr) and MTT were obtained from Sigma (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canada). All drugs were dissolved in PBS and sterilized (0.22 µm filter). Mitoxantrone was protected from light.

### Proliferation assay

On day 0, logarithmically growing cells were harvested from the medium, resuspended to a final concentration of  $5 \times 10^5$  cells/ml fresh medium, and plated in 96-well flat-bottomed microtiter plates (100 µl cell suspension per well). Drug solutions at the appropriate concentrations were then added (5 µl) simultaneously. The plates were then incubated for a total of 48 hrs at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. On day 2, viable cell growth was determined by an MTT reduction assay [Mosman, 1983]. Briefly, 10 µl of a solution of MTT (5 mg/ml) was added to each well. After 4 hrs at 37°C, 100 µl of a solution of acid-isopropanol (0.04 N hydrochloric acid in isopropanol) was added, and reduced MTT was measured at a wavelength of 570 nm. Single drugs and drug

combinations were tested in duplicate and experiments were repeated 10 times. Leukemia cell survival (LCS) was calculated using the equation:  $LCS = (\text{Mean absorbance treated cells} / \text{mean absorbance control cells}) \times 100$ . The higher the cytotoxicity of a drug or drug combination, the lower the LCS.

### **Definitions of drug interaction**

A modified version of the Valeriote and Lin method [Valeriote and Lin, 1975] was used to classify drug combinations (A+B) as synergistic, additive or antagonistic:

—Synergism: the observed LCS for a drug combination is lower than the product of the LCS for each single drug:

$$\text{observed LCS (A+B)} < \text{LCS (A)} \times \text{LCS (B)}$$

—Additivity: the observed LCS for a drug combination is lower than the LCS for the most active single drug ( $D_{\max}$ ), but is higher than the product of the LCS for each single drug:

$$\text{LCS (A)} \times \text{LCS (B)} \geq \text{observed LCS (A+B)} \leq \text{LCS (D}_{\max}\text{)}$$

—Antagonism: the observed LCS for a drug combination is higher than the LCS for the most active drug:

$$\text{observed LCS (A+B)} > \text{LCS (D}_{\max}\text{)}$$

### **Analysis of apoptosis**

On day 0, logarithmically growing cells were harvested from the medium, resuspended to a final concentration of  $5 \times 10^5$  cells/ml fresh medium, and plated in 6-well flat-bottomed tissue culture plates (2 ml cell suspension per well). Vcr at a concentration of 0.05  $\mu\text{g/ml}$  and MCC at a concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$  were then added (100  $\mu\text{l}$ ) simultaneously. After 48 hrs of incubation, scatter measurements of 10 000 events per sample were performed, using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) configured with a 488 nm argon laser for

visible excitation. The percentage of apoptotic cells following treatments with single drugs and the drug combination was then determined by gating the low FSC/high SSC population on a two parameter dot plot, as this cell population has been shown to be predominantly constituted by apoptotic cells [Dive et al., 1992; Shellhaas and Zuckerman, 1995; Chrest et al., 1993; Swat et al., 1991; McCloskey et al., 1994] (figure 3). The presence of apoptosis was confirmed using DNA gel electrophoresis [Reader et al., 1999]. Experiments were repeated 10 times.

### **Statistics**

Comparisons between expected LCS values as predicted by the multiplicative model and the observed values, comparisons between the observed LCS values for the drug combinations and the observed values for the most active single drugs, as well as all other comparisons, were performed using Wilcoxon's matched pair *t*-test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

## 2.4 RESULTS

### **Effect of drug combinations on cell proliferation**

We first evaluated the effect of MCC in combination with the three anticancer drugs Ara-C, Vcr and Mit on cell proliferation inhibition. The drug concentrations used were determined from cell proliferation inhibition curves generated for each single drug and MCC (figure 1), and they are shown in table 1.

Each drug combination was tested in 10 experiments at 6 different concentrations, which resulted in 60 comparisons between the expected and observed LCS values in each cell line.

#### Ara-C + MCC

In both cell lines, for 4 out of the 6 different concentrations tested, the observed LCS values were significantly lower than the LCS values for the most active single agents. In other words, these drug combinations were significantly more cytotoxic than the most active single drug. When all 10 experiments are considered, no significant synergism or antagonism was found in either cell lines. Additivity was found between MCC+Ara-C at all concentrations tested in both cell lines.

#### Mitoxantrone + MCC

In Jurkat cells, for all of the concentrations tested, the drug combinations were significantly more cytotoxic than the most active single agents. However, for one of the concentrations tested in HL-60 cells were the drug combinations more cytotoxic than the most active single agents. When all 10 experiments are considered, no significant synergism or antagonism was found in either cell lines. Additivity was found between MCC+Mit at all concentrations tested in both cell lines.

### Vincristine + MCC

In Jurkat cells, for 4 out of the 6 concentrations tested, the drug combinations were significantly more cytotoxic than the most active single agents. However, for none of the concentrations tested in HL-60 cells were the drug combinations more cytotoxic than the most active single agents. No significant antagonism was found in either cell lines when all experiments are considered. Furthermore, no significant synergism was found in HL-60 cells, as additivity was found between MCC+Vcr at all concentrations tested in that cell line. In Jurkat cells however, while the majority of the concentrations tested resulted in additivity, a significantly synergistic interaction was found between 0.05 µg/ml Vcr + MCC 100 µg/ml in Jurkat cells ( $p = 0.0195$ ).

Overall, on cell proliferation inhibition, no significantly antagonistic interactions were found between MCC and the three anticancer agents in either cell lines. Additivity was found between MCC+Ara-C and MCC+Mit at all concentrations tested in both cell lines. Additivity was also found between MCC+Vcr at all concentrations tested in HL-60 cells, and at all but one concentration in Jurkat cells. In fact, the combination between 0.05 µg/ml Vcr + MCC 100 µg/ml proved to be significantly synergistic on cell proliferation inhibition.

### **Effect of the combination between 0.05 µg/ml Vcr + MCC 100 µg/ml on the induction of apoptosis**

We then evaluated whether the combination between 0.05 µg/ml Vcr + MCC 100 µg/ml, shown to be synergistic on cell proliferation inhibition in Jurkat cells, was also synergistic on the induction of apoptosis in that same cell line.

The drug combination was tested in 10 experiments and the results are shown in figure 4. MCC 100 µg/ml, Vcr 0.05 µg/ml and the combination between the two drugs significantly induced more cells to undergo apoptosis when compared to the untreated wells ( $p = 0.002$ ). Furthermore, the results clearly show a synergistic

interaction between 0.05  $\mu\text{g/ml}$  Vcr + MCC 100  $\mu\text{g/ml}$  for the induction of apoptosis ( $p = 0.002$ ). The presence of apoptotic cells was confirmed using DNA gel electrophoresis (data not shown).

## 2.5 DISCUSSION

Apoptosis can be demonstrated using a wide range of different methods [Mesner and Kaufmann, 1997], many of which detect apoptosis based on morphology, considering apoptotic cells share characteristic morphological features. In the field of drug combination testing, some laboratories have used DNA gel electrophoresis to quantitate apoptosis [Avramis et al., 1998; Mentz et al., 1996; Del Bino et al., 1991; Winter and Weller, 1998; Nakamura et al., 1997], as apoptotic cellular DNA is cleaved at internucleosomal linker sites within chromatin structure which leads to a ladder-like banding pattern on the gel. Others have used flow cytometry combined with DNA staining, as apoptotic cellular DNA has a reduced DNA stainability which leads to a sub-G<sub>0</sub> peak on DNA content frequency histograms [De Vincenzo et al., 1996; Tosi et al., 1994; Kim et al., 1999; Del Bino et al., 1991; Roth et al., 1998; Puthier et al., 1996]. Furthermore, some laboratories have used fluorescent microscopy [Mizutani et al., 1997]. In the present study, we have shown that the measurement of scatter properties of cells using flow cytometry can be used to study drug interactions on the induction of apoptosis *in vitro*.

We have also shown that MCC interacts in an additive manner with Ara-C and Mit to inhibit cell proliferation in HL-60 and Jurkats cells, and in an additive or a synergistic manner with Vcr, depending on cell type and drug concentrations, to inhibit cell proliferation and induce apoptosis.

We have not attempted to define the molecular mechanism(s) for the observed synergistic interaction between 0.05 µg/ml Vcr+MCC 100 µg/ml. However, many mechanisms for synergism can be speculated. Firstly, it has been shown that synergism occurs as a result of one drug not only killing the cells, but also synchronizing the survivors in a specific phase of the cell cycle against which the second drug is effective. For example, it has been suggested that the synergism observed between Ara-C and daunorubicin occurs because Ara-C not only kills

cells in the S phase of the cell cycle, but also has the ability to block others at the G<sub>1</sub>/S interface, where the lethality of daunorubicin is maximal [Edelstein et al., 1974]. Likewise, the synergism observed between Ara-C and mitotic inhibitors like vincristine and tamoxifen, as well as between S phase specific drugs like Ara-C and flavopiridol, has been suggested to result from the ability of mitotic inhibitors and flavopiridol to synchronize cells in the S phase, where Ara-C, 5-fluorouracil and other S phase specific drugs are maximally effective [Vadlamudi and Goldin, 1971; Bible and Kaufmann, 1997; Benz et al., 1983]. In our case, considering MCC has been shown to accumulate cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>/S<sub>early</sub> phase [Filion, Reader and Phillips, unpublished data] and Vcr is maximally effective at the G<sub>2</sub>M phase, MCC would have to kill cells in the S phase, where Vcr accumulates cells, for such a mechanism to be involved in the synergism observed between Vcr and MCC. If so, it would explain why no synergy was found between Ara-C and MCC, as both drugs would be killing in the same phase of the cell cycle, and between Mit and MCC, as mitoxantrone has been shown to block cells in the G<sub>2</sub>M phase of the cell cycle without having a phase preference for cell killing [Durr et al., 1983].

Secondly, it has been shown that synergism also occurs when one drug enhances the accumulation of the other drug in the cells by increasing drug penetration and/or by decreasing drug efflux through modulation of P-glycoprotein or through another mechanism [Hirose et al., 1987; Howell et al., 1989; De Vincenzo et al., 1996; Batra et al., 1996]. There is no reason to think that the Jurkat cells used in the present study expressed p-glycoprotein and that modulation of this protein by MCC or Vcr when in combination with each other was responsible for the synergism observed. However, it is possible that one drug increases the accumulation of the other drug through another mechanism.

Finally, other more drug-specific possible mechanisms for drug synergism might also be involved. For example, it has been shown that the synergy observed between hydroxyurea and Ara-C could be mediated through both augmented Ara-

CTP pool and diminished dCTP pool, considering Ara-CTP is responsible for the lethal effects of Ara-C and dCTP competitively antagonizes the inhibition of DNA synthesis by Ara-CTP [Matsumoto et al., 1992]. It has also been shown that the synergistic interaction observed between Ara-C and cis-Diamminedichloroplatinum(II) (CDDP) could be the result of an enhancement in the incorporation of Ara-C into DNA undergoing repair synthesis following CDDP-induced DNA damage [Fram et al., 1987], and that recombinant human tumor necrosis factor potentiates mitoxantrone activity by increasing the number of topoisomerase II molecules resulting in increased DNA strand-breaks [Cimoli et al., 1992]. In our case, the synergism observed between MCC and Vcr might result from a potentiation of the microtubule binding activity of Vcr by MCC.

In conclusion, we have demonstrated the enhancement of cell proliferation inhibition and/or apoptosis induction in HL-60 and Jurkat cells by anticancer drugs in combination with MCC. Further studies are needed to shed light on the possible mechanism(s) involved in the synergism observed between 0.05  $\mu\text{g/ml}$  Vcr+MCC 100  $\mu\text{g/ml}$  in Jurkat cells, as well as to determine the *in vivo* usefulness of these drug combinations.

## **2.6 ACKNOWLEDGMENTS**

This work was financially supported by Bioniche Life Sciences Inc. I.M. was the recipient of the Julien-Braun grant offered by Merck Frosst Canada Inc.

## 2.7 REFERENCES

- Adams JM and Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281(5381):1322.
- Avramis V, Nandy P, Kwock R, Solorzano MM, Mukherjee SK, Danenberg P and Cohen LJ. Increased p21/WAF-1 and p53 protein levels following sequential three drug combination regimen of fludarabine, cytarabine and docetaxel induces apoptosis in human leukemia cells. *Anticancer Res* 1998;18:2327.
- Batra S, Karlsson R and Witt L. Potentiation by estramustine of the cytotoxic effect of vinblastine and doxorubicin in prostatic tumor cells. *Int J Cancer* 1996;68:644.
- Benz C, Cadman E, Gwin J, Wu T, Amara J, Eisenfeld A and Dannies P. Tamoxifen and 5-fluorouracil in breast cancer: cytotoxic synergism *in vitro*. *Cancer Res* 1983;43:5298.
- Bible KC and Kaufmann SH. Cytotoxic synergy between Flavopiridol (NSC 649890, L86-8275) and various antineoplastic agents: the importance of sequence of administration. *Cancer Res* 1997;57(16):3375.
- Chao DT and Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998;16:395.
- Chrest FJ, Buchholz MA, Kim YH, Kwon TK and Nordin AA. Identification and quantitation of apoptotic cells following anti-CD3 activation of murine G<sub>0</sub> T cells. *Cytometry* 1993;14:883.

Cimoli G, Valenti M, Venturini M, Conte P and Russo P. Augmentation of antineoplastic effects by the combination of recombinant human tumor necrosis factor and mitoxantrone on primary culture of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 1992;12:1411.

Cohen J. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;14(3):126.

De Vincenzo R, Scambia G, Benedetti Panici P, Fattorossi A, Bonanno G, Ferlini C, Isola G, Pernisco S and Mancuso S. Modulatory effect of tamoxifen and ICI182780 on adriamycin resistance in MCF-7 human breast-cancer cells. *Int J Cancer* 1996;68:340.

Del Bino G, Lassota P and Darzynkiewicz Z. The S-phase cytotoxicity of camptothecin. *Exp Cell Res* 1991;193:27.

Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE and Wyllie AH. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 1992;1133:275.

Durr FE, Wallace RE and Citarella RV. Molecular and biochemical pharmacology of mitoxantrone. *Cancer Treatment Reviews* 1983;10(suppl B):3.

Edelstein M, Vietti T and Valeriote F. Schedule-dependent synergism for the combination of 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine and daunorubicin. *Cancer Res* 1974;34:293.

Filion MC, Lépicier P, Morales A and Phillips NC. Mycobacterium phlei cell wall complex directly induces apoptosis in human bladder cancer cells. *Br J Cancer* 1998;79 (2):229.

- Fram RJ, Robichaud N, Bishov SD and Wilson JM. Interactions of cis-Diamminedichloroplatinum(II) with 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine in LoVo colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1987;47:3360.
- Grant S. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv Cancer Res* 1998;72:197.
- Hirose M, Takeda E, Ninoniya T, Kuroda Y and Miyao M. Synergistic inhibitory effects of dipyridamole and vincristine on the growth of human leukemia and lymphoma cell lines. *Br J Cancer* 1987;56(4):413.
- Howell SB, Hom DK, Sangra R, Vick JS and Chan TCK. Dipyridamole enhancement of etoposide sensitivity. *Cancer Res* 1989;49(15):4147.
- Izquierdo MA, Degen D, Sypek JP and Von Hoff DD. Antiproliferative effects of IL-12 on human tumor colony-forming units taken directly from patients. *Anticancer Drugs* 1996;7:275.
- Kaspers GJL, Veerman AJP, Pieters R, Van Zantwijk I, Hählen K and Van Wering ER. Drug combination testing in acute lymphoblastic leukemia using the MTT assay. *Leukemia Research* 1995;19(3):175.
- Kim CN, Bhalla K, Kreitman RJ, Willingham MC, Hall P, Tagge EP, Jia T and Frankel AE. Diphtheria toxin fused to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and Ara-C exert synergistic toxicity against human AML HL-60 cells. *Leuk Res* 1999;23:527.
- Mallick BB, Kishore S, Das SK and Garg A. Non-specific immunostimulation against viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1985;8(1):53.

- Matsumoto M, Kawahara T, Tsuda M, Ohkubo Y, Kamiguchi H and Yamamura M. Synergistic inhibition of human gastric carcinoma cell growth by 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine and hydroxyurea or 2'-deoxyguanosine *in vitro*. *Cancer Lett* 1992;63:221.
- McCloskey TW, Oyaizu N, Coronese M and Pahwa S. Use of a flow cytometric assay to quantitate apoptosis in human lymphocytes. *Clin Immunol and Immunopath* 1994;71(1):14.
- Mentz F, Mossalayi MD, Ouaz F, Baudet S, Issaly F, Ktorza S, Semichon M, Binet JL and Merle-Beral H. Theophylline synergizes with chlorambucil in inducing apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1996;88(6):2172.
- Mizutani Y, Okada Y, Yoshida O, Fukumoto M and Bonavida B. Doxorubicin sensitizes human bladder carcinoma cells to Fas-mediated cytotoxicity. *Cancer* 1997;79(6):1180.
- Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55.
- Nakamura S, Takeshima M, Nakamura Y, Ohtake S and Matsuda T. Induction of apoptosis in HL-60 leukemic cells by anticancer drugs in combination with anti-Fas monoclonal antibody. *Anticancer Res* 1997;17:173.
- Papapetropoulou M, Tsintzou A and Vantarakis A. Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. *Can J Microbiol* 1997;43:499.
- Puthier D, Bataille R, Barillé S, Mellerin MP, Harousseau JL, Ponzio A, Robillard N, Wijdenes J and Amiot M. Myeloma cell growth arrest, apoptosis and

interleukin-6 receptor modulation induced by EB1089, a vitamin D<sub>3</sub> derivative, alone or in association with dexamethasone. *Blood* 1996;88(12):4659.

Reader S, Moutardier V and Denizeau F. Tributyltin triggers apoptosis in trout hepatocytes: the role of Ca<sup>2+</sup>, protein kinase C and proteases. *Biochim Biophys Acta* 1999;1448:473.

Reed JC. Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer. *Adv Pharmacol* 1997;41:501.

Roth W, Wagenknecht B, Grimm C, Dichgans J and Weller M. Taxol-mediated augmentation of CD95 ligand-induced apoptosis of human malignant glioma cells: association with bcl-2 phosphorylation but neither activation of p53 nor G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest. *Br J Cancer* 1998;77(3):404.

Rowinsky E et Donehower R. In: Chabner BA, Longo DL (eds) (1996) *Cancer Chemotherapy and Biography*. Philadelphia: Lippincott: 379.

Shellhaas JL and Zuckerman SH. *In vitro* detection of apoptotic stimuli by use of the HL-60 myeloid leukemic cell line. *Clin and Diagnostic Laboratory Immunol* 1995;2(5): 598.

Stine KC, Warren BA and Becton DL. Apoptosis induced by interleukin-12 measured by DNA electrophoresis and in situ end labelling in leukemia. *Ann NY Acad Sci* 1996;795:420.

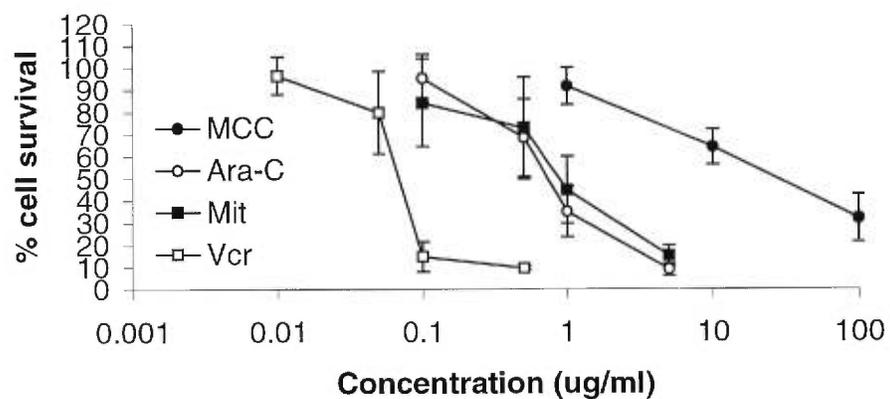
Swat W, Ignatowicz L and Kisielow P. Detection of apoptosis of immature CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes by flow cytometry. *J of Immunol Meth* 1991;137:79.

- Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281(5381):1312.
- Thornberry NA, Rosen A and Nicholson DW. Control of apoptosis by proteases. *Adv Pharmacol* 1997;41:155.
- Tosi P, Visani G, Ottaviani E, Manfroi S, Zinzani PL and Tura S. Fludarabine + Ara-C + G-CSF: cytotoxic effect and induction of apoptosis on fresh acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1994;8(12):2076.
- Vadlamudi S and Goldin A. Influence of mitotic inhibitors on the antileukemic activity of cytosine arabinoside (NSC-63878) in mice bearing leukemia L1210. *Cancer Chemotherapy Reports* 1971;55(5):547.
- Valeriotte F and Lin H. Synergistic interaction of anticancer agents: a cellular perspective. *Cancer Chemotherapy Reports* 1975;59(5):895.
- Webb SJ, Harrison DJ and Wyllie AH. Apoptosis: An Overview of the Process and Its Relevance in Disease. *Adv in pharmacol* 1997;41:1.
- Wesner PW, JR. and Kaufmann SH. Methods utilized in the study of apoptosis. *Adv Pharmacol* 1997;41:57.
- Winter S and Weller M. Potentiation of CD95L-induced apoptosis of human malignant glioma cells by topotecan involves inhibition of RNA synthesis but not changes in CD95 or CD95L protein expression. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998;286:1374.
- Wolf BB and Green D. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999;274(29):20049.

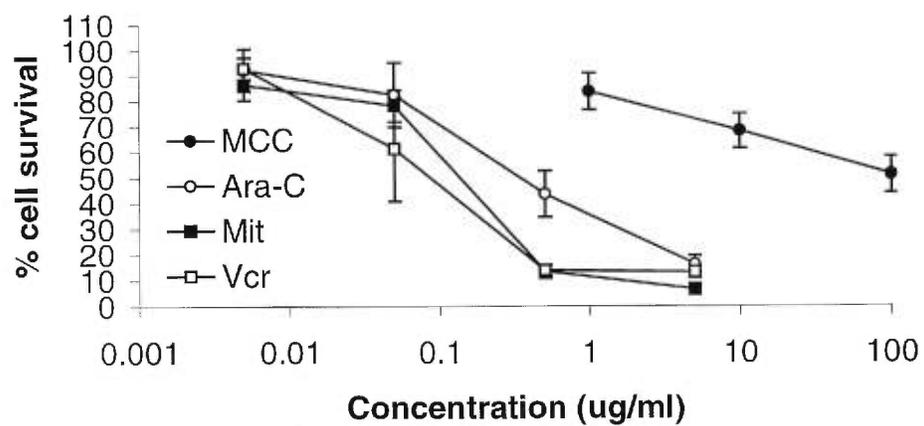
**Table 1. The drug combinations tested using the MTT assay**

	<b>Drug concentrations</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<b>MCC concentrations</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Jurkat</b>	<u>Ara-C</u>	1
	0.05, 0.5	10
		100
	<u>Mitoxantrone</u>	
	0.05, 0.5	
<b>HL-60</b>	<u>Vincristine</u>	
	0.05, 0.5	
	<u>Ara-C</u>	1
	0.5, 1	10
		100
<b>Jurkat</b>	<u>Mitoxantrone</u>	
	0.5, 1	
	<u>Vincristine</u>	
	0.05, 0.1	

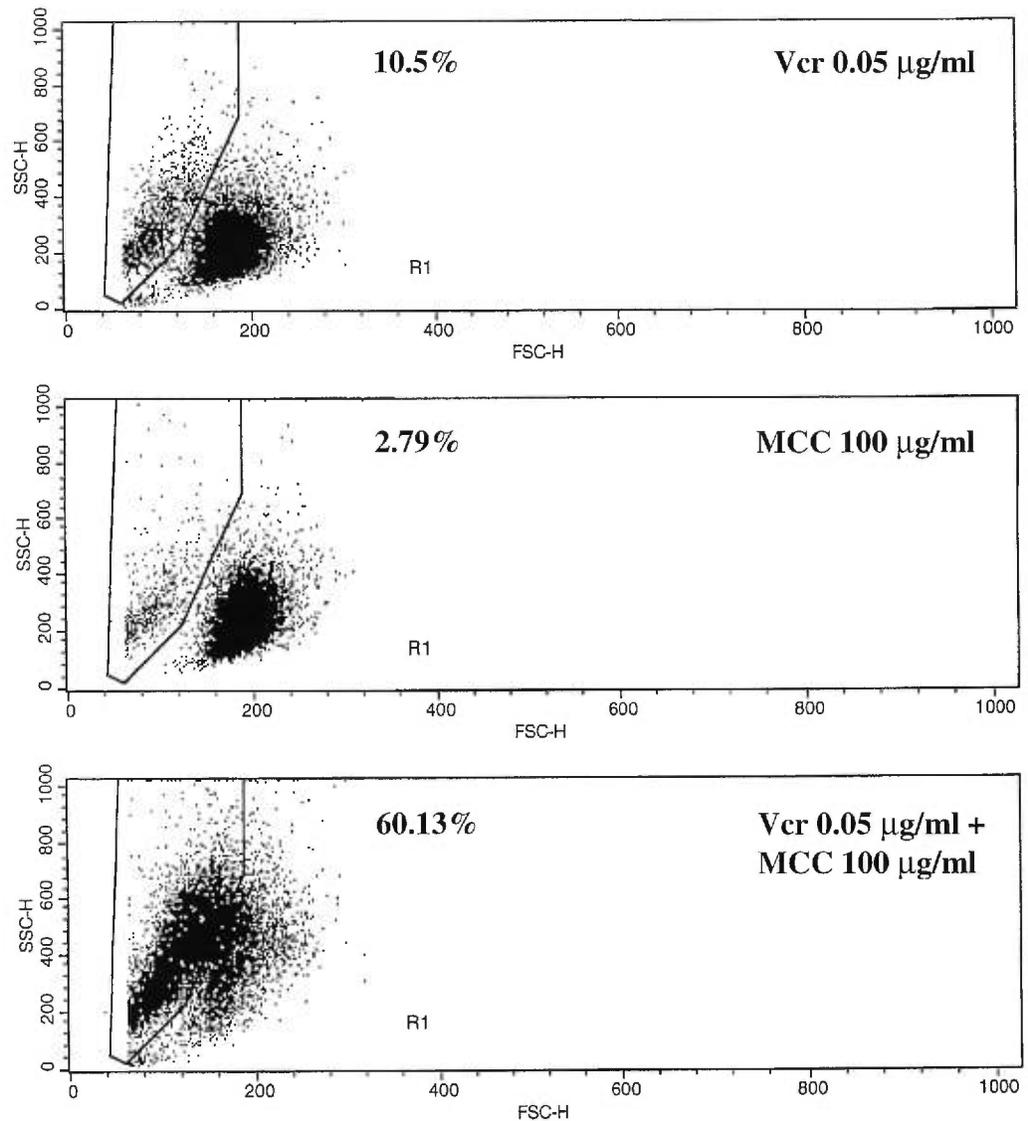
A



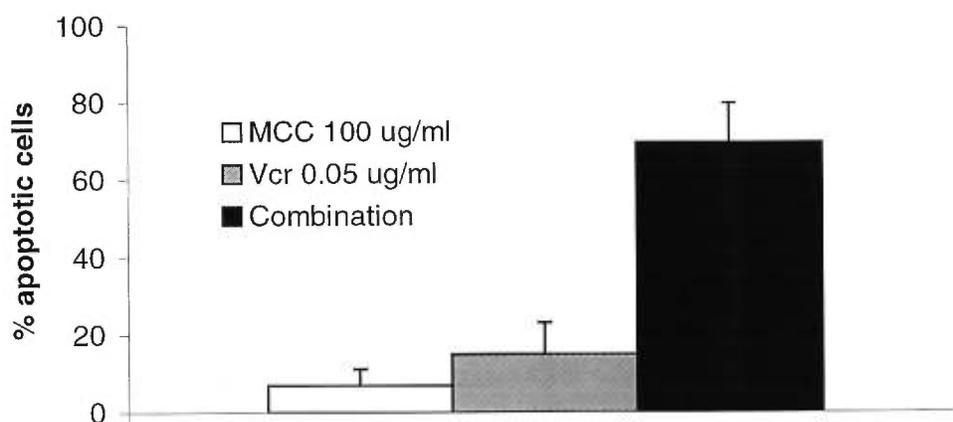
B



**Figure 1.** Cell proliferation inhibition dose-response curves for MCC, Ara-C, Mit and Vcr in A) HL-60 and B) Jurkat cells. The results shown are the means  $\pm$  S.D. of 10 experiments.



**Figure 2.** Scatter distributions (experiment no. 10) of Jurkat cells treated for 48 h with Vcr 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , MCC 100  $\mu\text{g/ml}$  and 0.05  $\mu\text{g/ml}$  Vcr+MCC 100  $\mu\text{g/ml}$ . Region R1 shows the scatter cluster (low FSC/high FSC) defining cells in apoptosis. The percentages of cells in apoptosis were calculated using the Cell Quest software (BD) and are expressed as percent increase in apoptotic cells compared to control (no drug). Identical R1 regions were used for each plot to define apoptotic cells.



**Figure 3.** Synergistic apoptosis induction between 0.05  $\mu\text{g/ml}$  Vcr+MCC 100  $\mu\text{g/ml}$ . Jurkat cells were treated for 48 h with Vcr 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , MCC 100  $\mu\text{g/ml}$  or both drugs in combination, and apoptotic cells were quantitated by flow cytometry. The percentages of apoptotic cells are expressed as percent increase compared to control (no drug). The results shown are the means  $\pm$  S.D. of 10 experiments.

## CHAPITRE 3

### DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Au cours des travaux de recherche qui ont mené à la rédaction du présent mémoire, nous avons tenté de déterminer les effets du MCC en combinaison avec trois autres drogues anticancéreuses, au niveau de l'inhibition de la prolifération cellulaire et de l'induction de l'apoptose de deux lignées leucémiques *in vitro*.

Les effets au niveau de l'inhibition de la prolifération cellulaire ont été quantifiés à l'aide de la méthode de réduction du MTT [Mosman, 1983], une méthode dont on a démontré le bien fondé pour l'étude *in vitro* des interactions entre drogues en combinaison [Kaspers et al., 1995]. Étant donné que le MTT est réduit en cristaux de formazan par les cellules vivantes seulement, cette méthode permet de quantifier indirectement les cellules vivantes et de rendre compte de l'inhibition de la prolifération cellulaire engendrée par les drogues utilisées seules et en combinaison, en comparant la quantité de cristaux de formazan retrouvés dans les puits traités, avec la quantité de cristaux de formazan retrouvés dans les puits non traités.

Les effets au niveau de l'induction de l'apoptose, eux, ont été quantifiés à l'aide d'une méthode en cytométrie de flux, qui permet d'identifier et de quantifier les cellules apoptotiques selon leurs propriétés de diffraction de la lumière. Les cellules apoptotiques étant généralement de plus petite taille (FSC) et ayant une complexité interne (SSC) plus élevée que les cellules vivantes, il est possible de les quantifier en encerclant la population de cellules retrouvée à gauche dans un graphique où le paramètre FSC est en abscisse et le paramètre SSC est en ordonnée [Swat et al., 1991; Dive et al., 1992; Chrest et al., 1993; McCloskey et al., 1994; Shellhaas and Zuckerman, 1995]. Par contre, contrairement à la méthode de réduction du MTT, on n'avait jamais démontré le bien fondé de la méthode de quantification des cellules apoptotiques selon leurs propriétés de

diffraction de la lumière pour l'étude *in vitro* des interactions entre drogues en combinaison lorsque nous l'avons utilisée à cette fin dans la réalisation de nos travaux de recherche.

Nos résultats démontrent que le MCC agit de façon additive avec l'Ara-C, le Mit et la Vcr pour inhiber la prolifération cellulaire des cellules HL-60, à toutes les concentrations étudiées. Par contre, les résultats obtenus avec les cellules Jurkat démontrent que le MCC agit de façon additive avec l'Ara-C et le Mit à toutes les concentrations étudiées, mais de façon additive avec la Vcr à toutes les concentrations étudiées sauf celle de 0.05 µg/ml Vcr + MCC 100 µg/ml, où le MCC agit de façon synergique avec la Vcr pour inhiber la prolifération cellulaire et induire l'apoptose.

Nous n'avons pas tenté de déterminer le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) impliqués dans la synergie observée entre 0.05 µg/ml Vcr + MCC 100 µg/ml chez les cellules Jurkat. Toutefois, plusieurs mécanismes peuvent être proposés. Premièrement, il a été démontré que lorsqu'une des deux drogues en combinaison tue les cellules, tout en synchronisant les survivants dans une phase du cycle cellulaire où l'autre drogue exerce son activité maximale, une synergie peut être observée. Par exemple, il a été suggéré que la synergie observée entre l'Ara-C et la daunorubicine se produirait étant donné que l'Ara-C tue les cellules en phase S du cycle cellulaire, tout en bloquant les survivants en phase G<sub>1</sub>/S, où l'activité de la daunorubicine est maximale [Edelstein et al., 1974]. De la même façon, la synergie observée entre l'Ara-C et certains inhibiteurs de la mitose comme la vincristine et le tamoxifen, ainsi que la synergie observée entre des drogues exerçant leur activité maximale en phase S comme l'Ara-C et le flavopiridol, sembleraient se produire parce que les inhibiteurs de la mitose et le flavopiridol synchronisent les cellules en phase S, où l'Ara-C, le 5-fluorouracil et d'autres drogues, exercent leur activité maximale [Vadlamudi and Goldin, 1971; Benz et al., 1983; Bible and Kaufmann, 1997]. Dans le cas qui nous concerne, étant donné que le MCC accumule les cellules en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>/S<sub>early</sub> du cycle cellulaire

[Filion, Reader and Phillips, unpublished data] et que la Vcr est efficace en phase G<sub>2</sub>M, il faudrait que le MCC tue les cellules en phase S, où la Vcr fait accumuler les cellules, pour qu'un tel mécanisme soit impliqué dans la synergie observée entre la Vcr et le MCC. Si tel est le cas, ceci expliquerait pourquoi aucune synergie n'a été observée entre l'Ara-C et le MCC, étant donné que les deux drogues tueraient les cellules situées dans la même phase du cycle cellulaire, de même qu'entre le Mit et le MCC, étant donné que le mitoxantrone bloque les cellules en phase G<sub>2</sub>M du cycle cellulaire, sans avoir de préférence pour une phase du cycle cellulaire en particulier pour exercer son effet léthal [Durr et al., 1983].

Deuxièmement, il a été démontré qu'une synergie entre deux drogues peut se produire lorsque l'une d'entre elles augmente l'accumulation de l'autre dans les cellules en augmentant sa pénétration et/ou en diminuant sa sortie des cellules. Par exemple, il a été démontré qu'en modulant l'activité de la glycoprotéine P, une protéine impliquée dans la résistance aux drogues anticancéreuses, une drogue pouvait augmenter l'accumulation d'une autre drogue et ainsi agir en synergie avec elle [Hirose et al., 1987; Howell et al., 1989; De Vincenzo et al., 1996; Batra et al., 1996]. Par conséquent, dans le cas qui nous concerne, il se peut que la synergie observée entre le MCC et la vincristine provienne du fait que l'une de ces deux drogues augmente l'accumulation de l'autre drogue dans les cellules.

Finalement, d'autres mécanismes peuvent également être impliqués dans la synergie observée entre le MCC et la Vcr. Par exemple, il a été démontré que la synergie observée entre l'hydroxyurée et l'Ara-C pourrait résulter d'une augmentation des niveaux d'Ara-CTP et d'une diminution des niveaux de dCTP par l'hydroxyurée, étant donné que l'Ara-CTP est responsable des effets léthaux de l'Ara-C et que le dCTP antagonise de façon compétitive l'inhibition de la synthèse d'ADN fait par l'Ara-CTP [Matsumoto et al., 1992]. Il a également été démontré que l'interaction synergique observée entre l'Ara-C et le cis-

Diamminedichloroplatinum(II) (CDDP) pourrait être le résultat d'une augmentation de l'incorporation de l'Ara-C dans l'ADN, suite au dommage à l'ADN causé par le CDDP [Fram et al., 1987], et que le facteur recombinant de nécrose tumorale humain augmenterait l'activité du mitoxantrone en augmentant le nombre de molécules de topoisomérase II, et par le fait même, les bris dans l'ADN [Cimoli et al., 1992]. Dans le cas qui nous concerne, la synergie observée entre le MCC et la Vcr pourrait résulter de l'augmentation par le MCC, de l'activité de liaison aux microtubules de la Vcr.

En conclusion, nous avons démontré l'augmentation de l'inhibition de la prolifération cellulaire et/ou de l'induction de l'apoptose des cellules HL-60 et Jurkat par la combinaison de drogues anticancéreuses avec le MCC. Nous avons également démontré que la quantification des cellules apoptotiques par cytométrie de flux, selon leurs propriétés de diffraction de la lumière, peut être utilisée pour étudier les interactions entre drogues en combinaisons au niveau de l'induction de l'apoptose. Des études supplémentaires sont requises afin de permettre une meilleure compréhension du(des) mécanisme(s) impliqué(s) dans la synergie observée entre 0.05 µg/ml Vcr+MCC 100 µg/ml chez les cellules Jurkat, ainsi que pour déterminer l'efficacité *in vivo* de ces combinaisons.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Issa H, Koolemans-Beynen A, Minton JP et Webb TE. Synergistic interaction between 13-cis-retinoic acid and glucarate: activity against rat mammary tumor induction and MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:1364-1369.
- Adams JM et Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281(5381):1322-1326.
- Adler AJ, Grossman I et Fasman GD. Circular dichroism of cytosine dinucleoside monophosphates containing arabinose, ribose, and deoxyribose. *Biochemistry* 1968;7:3826-3834.
- Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, et al. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2 and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* 1997;57:615-619.
- Akashi K, Kondo M, Von Freeden-Jeffrey U, Murray R et Weissman IL. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 1997;89:1033-1041.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta AM, Montesuit S, Lewis S et al. Inhibition of bax channel forming activity by bcl-2. *Science* 1997;277:370-372.
- Ashkenazi A et Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281(5381):1305-1308.
- Avramis V, Nandy P, Kwock R, Solorzano MM, Mukherjee SK, et al. Increased p21/WAF-1 and p53 protein levels following sequential three drug

- combination regimen of fludarabine, cytarabine and docetaxel induces apoptosis in human leukemia cells. *Anticancer Res* 1998;18:2327-2338.
- Bae YS, Kawasaki I, Ikeda H et Liu LF. Illegitimate recombination mediated by calf thymus DNA topoisomerase II *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2076-2080.
- Batra S, Karlsson R et Witt L. Potentiation by estramustine of the cytotoxic effect of vinblastine and doxorubicin in prostatic tumor cells. *Int J Cancer* 1996;68:644-649.
- Benz C, Cadman E, Gwin J, Wu T, Amara J, et al. Tamoxifen and 5-fluorouracil in breast cancer: cytotoxic synergism *in vitro*. *Cancer Res* 1983;43:5298-5303.
- Berenbaum MC. Criteria for analysing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res* 1981;35:269-335.
- Berenbaum MC. Isobolographic, algebraic, and search methods in the analysis of multiagent synergy, *J Am Coll Toxicol* 1988;7:927-938.
- Berenbaum MC. Synergy, additivim and antagonism in immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 1977;28:1-18.
- Berenbaum MC. What is synergy? *Pharmacol Rev* 1989;41:93-141.
- Berrios M, Osheroff N et Fisher PA. In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:4142-4146.

Bettex-Galland M, Studer UE, Walz A, Dewald B et Bagglioni M. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 detection in human urine during acute bladder inflammation caused by transurethral resection of superficial cancer and bacillus Calmette-Guérin administration. *Eur Urol* 1991;19(2):171-175.

Bible KC et Kaufmann SH. Cytotoxic synergy between flavopiridol (NSC 649890, L86-8275) and various antineoplastic agents: the importance of sequence of administration. *Cancer Res* 1997;57(16):3375-3380.

Bodmer JL, Burns K, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas (Apo-1/CD95). *Immunity* 1997;6:79-88.

Böhle A, Nowc CH, Ulmer AJ, Musehold J, Gerdes J, et al. Elevations of cytokines interleukin-1, interleukin-2 and tumour necrosis factor in the urine of patients after intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *J Urol* 1990;144(1):59-64.

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of bcl-xl. *Immunity* 1995;3:87-98.

Boldin M, Goncharov T, Goltsev Y et Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996;85:803-815.

Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, et al. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* 1995;270:387-391.

Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, et al. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 1995;269:1885-1888.

Bunn PA, JR., Cohen MK, Ihde DC, Fossieck BE, JR., Matthews MJ et al. Advances in small cell bronchogenic carcinoma. *Cancer Treat Rep* 1977;61:333-342.

Carson DA et Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993;341:1251-1254.

Chabner BA, Johns DG, Coleman N, Drake JC et Evans W. Purification and properties of cytidine deaminase from normal and leukemic granulocytes. *J Clin Invest* 1974;53:922-931.

Chao JR, Wang JM, Lee SF, Peng HW, Lin YH, et al. Mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol Cell Biol* 1998;18:4883-4898.

Chaudhary D, O'Rourke K, Chinnaiyan AM et Dixit VM. The death inhibitory molecules CED-9 and CED-4L use a common mechanism to inhibit the CED-3 death protease. *J Biol Chem* 1998;273:17708-17712.

Chaudhary PM, Elby M, Jasmin A, Boukwalter A, Murray J, et al. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappa B pathway. *Immunity* 1997;7:821-830.

- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR et 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, Tewari M et Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505-512.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, et al. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 1996;274:990-992.
- Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-1 induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:4961-4965.
- Chou TC et Talalay P. A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems. *J Biol Chem* 1977;252:6438-6442.
- Chou TC et Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22:27-55.
- Chrest FJ, Buchholz MA, Kim YH, Kwon TK et Nordin AA. Identification and quantitation of apoptotic cells following anti-CD3 activation of murine G<sub>0</sub> T cells. *Cytometry* 1993;14:883-90.
- Chu MY et Fisher GA. Comparative studies of leukemic cells sensitive and resistant to cytosine arabinoside. *Biochem Pharmacol* 1965;14:333-341.

- Chwang AK et Sundaralingam M. Intramolecular hydrogen bonding in 1-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C). *Nature New Biol* 1973;243:78-80.
- Cimoli G, Valenti M, Venturini M, Conte P et Russo P. Augmentation of antineoplastic effects by the combination of recombinant human tumor necrosis factor and mitoxantrone on primary culture of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 1992;12:1411-1414.
- Clejan L et Cederbaum AI. Synergistic interactions between NADPH-cytochrome P-450 reductase, paraquat, and iron in the generation of active oxygen radicals. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1779-1786.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
- Cohen JJ. Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunol Today* 1993;14(3):126-130.
- Collen D et Van Der Werf F. Coronary arterial thrombolysis with low-dose synergistic combinations of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) and recombinant single-chain urokinase-type plasminogen activator (rscu-PA) for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1987;60:431-434.
- Collen D, Stump DC et Van Der Werf F. Coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction by intravenous infusion of synergic thrombolytic agents. *Am Heart J* 1986;112:1083-1084.
- Collen D. Synergism of thrombolytic agents: investigational procedures and clinical potential. *Circulation* 1988;77:731-735.

- Conradt B et Horvitz HR. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 1998;93:519-529.
- Copenhaver TW, Lin TL et Goldberg KM. Joint drug action: a review. *American Statistical Association, Proceedings of the biopharmaceutical Section* 1987:160-164.
- Cryns V et Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998;12:1551-1570.
- Dahl R, Pedersen B et Hägglöf B. Nocturnal asthma: effect of treatment with oral sustained-release terbutaline, inhaled budesonide, and the two in combination. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:811-815.
- Dale MM et Penfield A. Synergism between phorbol ester and A23187 in superoxide production by neutrophils. *FEBS Lett* 1984;175:170-172.
- Datta SR, Dudet H, Tao X, Marsters S, Fu H, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231-241.
- De Boer EC, De Jong WH, Steerenberg PA, Aarden LA, Tetteroo E, et al. Induction of urinary interleukin 1 (IL-1), IL-2, IL-6 and tumour necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin in superficial bladder cancer. *Cancer immunol immunother* 1992;34(5):306-312.
- De Vincenzo R, Scambia G, Benedetti Panici P, Fattorossi A, Bonanno G, Ferlini C, Isola G, Pernisio S and Mancuso S. Modulatory effect of tamoxifen and ICI182780 on adriamycin resistance in MCF-7 human breast-cancer cells. *Int J Cancer* 1996;68:340-348.

- Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R et Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997;278:687-689.
- D'Esopo ND. Clinical trials in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1982;125(85):85-93.
- Dillehay LE, Jacobson-Kram D et Williams J. DNA topoisomerase and models of sister chromatid exchange. *Mut Res* 1989;215:15-23.
- DiNardo S, Voelkel K et Sternglanz R. DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: Topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2616-2620.
- Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, et al. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 1992;1133: 275-285.
- Drewinko B, Loo TL, Brown B, Gottlieb JA et Freireich EJ. Combination chemotherapy *in vitro* with adriamycin. Observations of additive, antagonistic, and synergistic effects when used in two-drug combinations on cultured human lymphoma cells. *Cancer Biochem Biophys* 1976;1:187-195.
- Duan H et Dixit VM. RAIDD is a new "death" adaptor molecule. *Nature* 1997;385:86-89.

Durr FE, Wallace RE et Citarella RV. Molecular and biochemical pharmacology of mitoxantrone. *Cancer Treatment Reviews* 1983;10(suppl B):3-11.

Earnshaw WC et Heck MMS. Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J Cell Biol* 1985;100:1716-1725.

Earnshaw WC, Halligan B, Cooke CA, Heck MMS et Liu LF. Topoisomerase II is a structural component of the mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol* 1985;100:1706-1715.

Edelstein M, Vietti T et Valeriote F. Schedule-dependent synergism for the combination of 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine and daunorubicin. *Cancer Res* 1974;34:293-297.

Elias JA, Krol RC, Freundlich S et Sampson PM. Regulation of human lung fibroblast glycosaminoglycan production by recombinant interferons, tumor necrosis factor, and lymphotoxin. *J Clin Invest* 1988;81:325-333.

Elion GB, Singer S et Hitchings GH. Antagonists of nucleic acid derivatives: Part VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J Biol Chem* 1954;208:477-488.

Ellis HM et Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44:817-829.

Filion MC, Lépicier P et Phillips NC. *Mycobacterium phlei* cell wall complex, a new antitumoral agent, induces IL-12 synthesis by monocytes/macrophages. *Blood* 1997;90:58b4.

Filion MC, Lépiciier P, Morales A et Phillips NC. *Mycobacterium phlei* cell wall complex directly induces apoptosis in human bladder cancer cells. *British J Cancer* 1999;79(2):229-235.

Fleishmann JD, Toossi Z, Ellner JJ, Wentworth DB, Ratliff TL, et al. Urinary interleukins in patients receiving intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy for superficial bladder cancer. *Cancer* 1989;64(7):1447-54.

Fox W et Mitchison DA. Short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 1975;111:325-353.

Foye WO, Vajragupta O et Sengupta SK. DNA-binding specificity and RNA polymerase inhibitory activity of bis(aminoalkyl)anthraquinones and bis(methylthio)vinylquinolinium iodides. *J Pharm Sci* 1982;71(2):253-257.

Fram RJ, Robichaud N, Bishov SD et Wilson JM. Interactions of cis-Diamminedichloroplatinum(II) with 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine in LoVo colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1987;47:3360-3365.

Fraser TR. An experimental research on the antagonism between the actions of physostigma and atropia. *Proc R Soc Edinb* 1870-1871;7:506-511.

Fraser TR. The antagonism between the actions of active substances. *Br Med J* 1872;2:485-487.

Fridland A. Effect of cytosine arabinoside on replicon initiation in human lymphoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;74:72-78.

- Fridland A. Inhibition of deoxyribonucleic acid chain initiation: a new mode of action for 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in human lymphoblasts. *Biochemistry* 1977;16:5508-5312.
- Furth JJ et Cohen SS. Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'-triphosphate of 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 9-beta-d-arabinofuranoxyladenine. *Cancer Res* 1968;28:2061-2067.
- Gasser SM et Laemmli UK. The organization of chromatin loops: Characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J* 1986;5:511-518.
- Gasser SM, LaRoche T, Falquet J, Boy de la Tour E et Laemmli UK. Metaphase chromosome structure: Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol* 1986;188:613-629.
- Gessner PK. A straightforward method for the study of drug interactions: an isobolographic analysis primer. *J Am Coll Toxicol* 1988;7:987-1012.
- Gohring F, Schwab BL, Nicotera P, Leist M et Fackelmayer FO. The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown. *EMBO J* 1997;16:7361-7371.
- Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, et al. Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* 1996;13:442-449.
- Golstein P. Cell death: TRAK and its receptors. *Curr Biol* 1997;7:750-753.
- Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianski VM et al. CASH, a novel caspase homolog with death effector domains. *J Biol Chem* 1997;272:19641-19644.

- Goodman MG. Interaction between cytokines and 8-mercaptoguanosine in humoral immunity: synergy with interferon. *J Immunol* 1987;139:142-146.
- Goto T et Wang JC. Yeast DNA topoisomerase is encoded by a single copy, essential gene. *Cell* 1984;36:1073-1080.
- Graham FC et Whitmore GF. Studies in mouse L-cells on the incorporation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine into DNA and on the inhibition of DNA polymerase by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate. *Cancer Res* 1970;30:2636-2644.
- Greco FA, Johnson DH, Hainsworth JD et Wolff SN. Chemotherapy of small-cell lung cancer. *Semin Oncol* 1985;12(6):31-37.
- Green D et Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 1998;8:267-271.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, et al. Caspase cleaved bid targets mitochondria and is required for cytochrome c release while bcl-xl prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999;274:1156-1163.
- Gruss HJ et Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 1995;85:3378-3404.
- Haaff EO, Catalona WJ et Ratliff TL. Détection of interleukin 2 in the urine of patients with superficial bladder tumours after treatment with BCG. *J Urol* 1986;136(4):970-974.

- Haldar S, Jena N et Croce CM. Inactivation of bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4507-4511.
- Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, et al. The E1B 19k protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting bax protein. *Genes Dev* 1996;10:461-477.
- Hande KR et Chabner BA. Pyrimidine nucleoside monophosphate kinase from human leukemic blast cells. *Cancer Res* 1978;38:579-585.
- Hawtrey AO, Scott-Burden T et Robertson G. Inhibition of glucoprotein and glycolipid synthesis in hamster embryo cells by cytosine arabinoside and hydroxyurea. *Nature* 1974;252:58-60.
- Hengartner MO et Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 1994;76:665-676.
- Hengartner MO, Ellis RE et Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992;356:494-499.
- Hirose M, Takeda E, Ninomiya T, Kuroda Y et Miyao M. Synergistic inhibitory effects of dipyridamole and vincristine on the growth of human leukaemia and lymphoma cell lines. *Br J Cancer* 1987;56(4):413-417.
- Hofmann J, Doppler W, Jakob A, Maly K, Posch L, et al. Enhancement of the antiproliferative effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) and nitrogen mustard by inhibitors of protein kinase C. *Int J Cancer* 1988;42:382-388.
- Hofmann K, Bucher P et Tschopp J. The CARD domain: a new apoptotic signaling motif. *Trends Biochem Sci* 1997;22:155-156.

- Holm C, Goto T, Wang JC et Botstein D. DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 1985;41:553-563.
- Horn CR et Cochrane GM. Management of asthma in general practice. *Respir Med* 1989;83:67-70.
- Howard MT, Lee MP, Hsieh TS et Griffith JD. Drosophila topoisomerase II-DNA interactions are affected by DNA structure. *J Mol Biol* 1991;217:53-62.
- Howell SB, Hom DK, Sangra R, Vick JS et Chan TCK. Dipyridamole enhancement of etoposide sensitivity. *Cancer Res* 1989;49(15):4147-4153.
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V et Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 1996b;4:387-396.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG et Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84:299-308.
- Hsu H, Xiong J et Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995;81:495-504.
- Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M et Hsueh AJW. Bok is a pro-apoptotic bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12401-12406.

- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N et Nunez G. Bcl-xl interacts with apaf-1 and inhibits apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4386-4391.
- Hu Y, Ding L, Spencer DM et Nunez G. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 1998;273:33489-33494.
- Hu ZB, Minden MD et McCulloch EA. Direct evidence for the participation of bcl-2 in the regulation by retinoic acid of the Ara-C sensitivity of leukemic stem cells. *Leukemia* 1995;9:1667-1673.
- Huang B, Eberstadt M, Olenjniczak ET, Medows RP et Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 1996;384:638-641.
- Hughes TK, Kaspar TA et Coppenhaver DH. Synergy of antiviral actions of TNF and INF- $\gamma$ : evidence for a major role of TNF-induced INF- $\beta$ . *Antivir Res* 1988;10:1-9.
- Inohara N, Ekhterae D, Garcia I, Carrio R, Merino J, et al. Mtd, a novel bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with bcl-2 and bcl-xl. *J Biol Chem* 1998;273:8705-8710.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195.
- Jiang Y, Woronicz JD, Liu W et Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 1999;283:543-546.

- Johnson RK, Zee-Cheng RK, Lee WW, Acton EM, Henry DW, et al. Experimental antitumor activity of aminoanthraquinones. *Cancer Treat Rep* 1979;63(3):425-439.
- Jonsson E, Fridborg H, Nygren P et Larsson R. Synergistic interactions of combinations of topotecan with standard drugs in primary cultures of human tumor cells from patients. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;54:509-514.
- Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, et al. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4997-5002.
- Kano Y, Akutsu M, Suzuki K et Yoshida M. Effects of carboplatin in combination with other anticancer agents on human leukemia cell lines. *Leuk Res* 1993;17(2):113-119.
- Kano Y, Ohnuma T, Okano T et Holland JF. Effects of vincristine in combination with methotrexate and other antitumor agents in human acute lymphoblastic leukemia cells in culture. *Cancer Res* 1988;48:351-356.
- Kano Y, Suzuki K, Akutsu M, Suda K, Inoue Y, et al. Effects of CPT-11 in combination with other anti-cancer agents in culture. *Int J Cancer* 1992;50:604-610.
- Kapuscinski J, Danzynkiewicz Z, Traganos F et Melamed MR. Interactions of a new antitumor agent, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl]amino]-9,10-anthracenedione, with nucleic acids. *Biochem Pharmacol* 1981;30(3):231-240.

- Kaspers GJL, Veerman AJP, Pieters R, Van Zantwijk I, Hählen K, et al. Drug combination testing in acute lymphoblastic leukemia using the MTT assay. *Leuk Res* 1995;19(3):175-181.
- Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* 1989;49:5870-5878.
- Kerr JFR, Wyllie AH et Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
- Kim CN, Bhalla K, Kreitman RJ, Willingham MC, Hall P, et al. Diphtheria toxin fused to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and Ara-C exert synergistic toxicity against human AML HL-60 cells. *Leuk Res* 1999;23:527-538.
- Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, et al. A death-domain containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 1996;384:372-375.
- Klastersky J et Zinner SH. Synergistic combinations of antibiotics in gram-negative bacillary infections. *Rev Infect Dis* 1982;4:294-301.
- Klastersky J, Cappel R et Daneau D. Clinical significance of *in vitro* synergism between antibiotics in gram-negative infections. *Antibiot Agents Chemother* 1972;2:470-475.
- Klastersky J, Meunier-Carpenter F et Prevost JM. Significance of antimicrobial synergism for the outcome of gram-negative sepsis. *Am J Med Sci* 1977;273:157-167.

- Klastersky J, Meunier-Carpenter F, Prevost JM et Staquet M. Synergism between amikacin and cefazolin against *Klebsiella*: *in vitro* studies and effect on the bacterial activity of serum. *J Infect Dis* 1976;134:271-276.
- Klastersky J. Combinations of antibiotics for therapy of severe infections in cancer patients. *Eur J Cancer* 1979;15:3-13.
- Klohs WD, Bernacki RJ et Kortnyk W. Effects of nucleotides and nucleotide analogs on human serum sialyltransferase. *Cancer Res* 1979;39:1231-1238.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR et Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site of bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-36.
- Kodell RL et Pounds JG. Assessing the toxicity of mixtures of chemicals. Dans *Statistics in toxicology*, ed. D. Krewski et C. Franklin, Gordon et Breach, New York, 1991:559-591.
- Kohno N, Ohnuma T, Kaneko M et Holland JF. Interactions of doxorubicin and cis-platin in squamous carcinoma cells in culture. *Br J Cancer* 1988;58:330-334.
- Kosopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P et Craig RW. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3516-3520.
- Kristensen J, Nygren P, Liliemark J, Fridborg H, Killander A, et al. Interactions between cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) and standard antileukemic

drugs in primary cultures of human tumor cells from patients with acute myelocytic leukemia. *Leukemia* 1994;8(10):1712-1717.

Kroemer G, Zamzami N et Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997;18:44-51.

Kufe D, Spriggs D, Egan EM et Munroe D. Relationships among Ara-CTP pools, formation of (Ara-C)DNA, and cytotoxicity of human leukemic cells. *Blood* 1984;64:54-58.

Kufe DW et Spriggs DR. Biochemical and cellular pharmacology of cytosine arabinoside. *Semin Oncol* 1985;12(3):34-48.

Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, et al. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 1998;273:16589-16594.

Lagranderie MRR, Balazuc AM, Deriaud E, Leclerc CD et Gheorghiu M. Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *Infect Immunol* 1996;64:1-9.

Lamm DL, Van der meijden ADPM, Morales A, Brosman SA, Catalona WJ, et al. Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-Guérin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *J urol* 1992;147:596-600.

Lamm DL. Optimal BCG treatment of superficial bladder cancer as defined by American trials. *Eur Urol* 1992;21(suppl. 2):12-16.

Larsson R, Fridborg H, Kristensen J, Sundström C et Nygren P. *In vitro* testing of chemotherapeutic drug combinations in acute myelocytic leukaemia using

the fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA). *Br J Can* 1993;67:969-974.

Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG et Earnshaw WC. Nuclear events of apoptosis *in vitro* in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol* 1993;123:7-22.

Lee MJ, Pyszczynski N et Jusko WJ. Combined inhibition effects of tacrolimus and methylprednisolone on *in vitro* human lymphocyte proliferation. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1995;17(2):335-345.

Li H, Zhu H, Xu CJ et Yuan J. Cleavage of bid by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.

Lin EY, Orlofsky A, Berger MS et Prystowsky MB. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 1993;151:1979-1988.

Lindsley JE et Wang JC. Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10485-10489.

Liu LF, Rowe TC, Yang L, Tewey KM et Chen GL. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 1983;258:15365-15370.

Loewe S. Antagonism and antagonists. *Pharmacol Rev* 1957;9:237-242.

Loomis CW, Milne S et Cervenka FW: A study of the interaction between clonidine and morphine on analgesia and blood pressure during

continuous intrathecal infusion in the rat. *Neuropharmacology* 1988;27:191-197.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C et Wang X. 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.

Major PP, Egan EM, Beardsley GP, Minden ME et Kufe DW. Lethality of human myeloblasts correlates with the incorporation of arabinofuranosylcytosine into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3235-3239.

Mallick BB, Kishore S, Das SK et Garg A. Non-specific immunostimulation against viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1985;8:55-63.

Mancini WR et Chen YC. Human deoxycytidylate deaminase substrate and regulator specificities and their chemotherapeutic implications. *Mol Pharmacol* 1983;23:159-164.

Maraskovsky E, O'Reilly LA, Teepe M, Corcoran LM, Peschen JJ, et al. Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1  $-/-$  mice. *Cell* 1997;89:1011-1019.

Marsters S, Sheridan JP, Donahue CJ, Pitti RM, Gray CL, et al. Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol* 1996;6:1669-1676.

Marsters SA, Pitti RM, Donahue CJ, Ruppert S, Baver KD, et al. Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr Biol* 1996;6:750-752.

- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A, et al. Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol* 1998;8:525-528.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin S, Beutner G et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998;187:1261-1271.
- Matsukage A, Ono K, Ohashi A, Takahashi T, Nakayama C, et al. Inhibitory effect of 1-beta-D-arabinofuranosylthymine 5'-triphosphate and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate on DNA polymerases from murine cells and oncornavirus. *Cancer Res* 1978;38:3076-3079.
- Matsumoto M, Kawahara T, Tsuda M, Ohkubo Y, Kamiguchi H et Yamamura M. Synergistic inhibition of human gastric carcinoma cell growth by 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine and hydroxyurea or 2'-deoxyguanosine *in vitro*. *Cancer Lett* 1992;63:221-228.
- May WS, Tyler PG, Ito T, Armstrong DK, Qatsha KA, et al. Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of bcl-2 in association with suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 1994;269:26865-26870.
- McCloskey TW, Oyaizu N, Coronesi M et Pahwa S. Use of a flow cytometric assay to quantitate apoptosis in human lymphocytes. *Clin Immunol and Immunopath* 1994;71(1):14-18.
- Meno-Tetang GML, Hon YY et Jusko WJ. Synergistic interaction between dehydroepiandrosterone and prednisolone in the inhibition of rat lymphocyte proliferation. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1996;18(3):443-456.

- Merck Index, 12<sup>e</sup> édition, Budavari S editor, Merck & Co., INC., New Jersey, 1996.
- Mesner PW JR, Budihardjo II et Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Parmcol* 1997;41:461-499.
- Mikita T et Beardsley GP. Functional consequences of the arabinosylcytosine structural lesion in DNA. *Biochemistry* 1988;27:4698-4705.
- Miller KG, Liu LF et Englund PT. A homogenous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 1981;256:9334-9339.
- Minn AJ, Velez P, Schendal SL, Liang H, Muchmore SW et al. Bcl-xl forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997;385:353-357.
- Miyashita T et Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;80:293-299.
- Mizutani Y, Okada Y, Yoshida O, Fukumoto M et Bonavida B. Doxorubicin sensitizes human bladder carcinoma cells to fas-mediated cytotoxicity. *Cancer* 1997;79(6):1180-1189.
- Momparler R. Effect of cytosine arabinoside 5'-triphosphate on mammalian DNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 1969;34:465-471.
- Morabito F, Callea I, Irrera G, Cartisano G, Dattola A, et al. *In vitro* improvement of chlorambucil-induced cytotoxicity by deflazocort and 6-methylprednisolone in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol* 1997;58:301-306.

- Morales A, Eidinger D et Bruce AW. Intracavitary bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumours. *J Urol* 1976;116(2):180-183.
- Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, et al. Flice, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996;85:817-827.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS et Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998;273:2926-2930.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
- Nicholson DW et Thorberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;22:299-306.
- Nosedá A, Berens ME, White JG et Modest EJ. *In vitro* antiproliferative activity of combinations of ether lipid analogues and DNA-interactive agents against human tumor cells. *Cancer Res* 1988;48:1788-1791.
- Ohno Y, Spriggs D, Matsukage T, Ohno T et Kufe D. Effect of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine incorporation on elongation of specific DNA sequences by DNA polymerase beta. *Cancer Res* 1988;48:1494-1498.

- Oltvai ZN, Milliman CL et Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
- Osheroff N et Zechiedrich EL. Calcium-promoted DNA cleavage by eukaryotic topoisomerase II: Trapping the covalent enzyme-DNA complex in an active form. *Biochemistry* 1987;26:4303-4309.
- Osheroff N, Shelton ER et Brutlag DL. DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*: Relaxation of supercoiled DNA. *J Biol Chem* 1983;258:9536-9543.
- Osheroff N, Corbett AH et Robinson MJ. Mechanism of action of topoisomerase II-targeted antineoplastic drugs. *Adv Pharmacol* 1994;29B:105-126.
- Osheroff N, Zechiedrich EL et Gale KC. Catalytic function of DNA topoisomerase II. *BioEssays* 1991;13:269-275.
- Osheroff N. Biochemical basis for the interactions of type I and type II topoisomerases with DNA. *Pharmacol Ther* 1989;41:223-241.
- Osheroff N. Effect of antineoplastic agents on the DNA cleavage/religation equilibrium of eukaryotic topoisomerase II: Inhibition of DNA religation by etoposide. *Biocemistry* 1989;28:6157-6160.
- Osheroff N. Eukaryotic topoisomerase II: Characterization of enzyme turnover. *J Biol Chem* 1986;261:9944-9950.
- Osheroff N. Role of the divalent cation in topoisomerase II mediated reactions. *Biochemistry* 1987;26:6402-6406.

- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, et al. An antagonistic decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815-818.
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111-113.
- Pan GH, O'Rourke K et Dixit VM. Caspase-9, bcl-x1, and apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 1998;273:5841-5845.
- Papapetropoulou M, Tsintzou A et Vantarakis A. Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. *Can J Microbiol* 1997;43:499-502.
- Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 1998;396:699-703.
- Plagemann PGW, Marz R et Wolheuter RM. Transport and metabolism of deoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine into cultured Novikoff rat hepatoma cells, relationship to phosphorylation, and regulation of triphosphate synthesis. *Cancer Res* 1978;38:978-989.
- Rahimtoola SH. The pharmacologic treatment of chronic congestive heart failure. *Circulation* 1989;80:693-699.
- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, et al. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 1992;69:597-604.
- Robinson MJ et Osheroff N. Effects of antineoplastic drugs on the post-strand passage DNA cleavage/religation equilibrium of topoisomerase II. *Biochemistry* 1991;30:1807-1813.

- Robinson MJ, Martin BA, Gootz TD, McGuirk PR, Moynihan M, et al. Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II: A novel mechanism for enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage. *J Biol Chem* 1991;266:14585-14592.
- Roboz J, Richardson CL et Holland JF. Comparison of the interaction of antineoplastic aminoanthraquinone analogs with DNA using competitive fluorescence polarization. *Life Sci* 1982;31(1):25-30.
- Roca J, Berger JM et Wang JC. On the simultaneous binding of eukaryotic DNA topoisomerase II to a pair of double-stranded DNA helicies. *J Biol Chem* 1993;268:14250-14255.
- Rohde D, Gastl G, Biesterfeld S, Plante M et Jakse G. Local expression of cytokines in rat bladder carcinoma tissue after intravesical treatment with *Nocardia rubra* cell wall skeleton and bacille-Calmette-Guerin. *Urol Res* 1997;25:19-24.
- Rose D, Thomas W et Holm C. Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II. *Cell* 1990;60:1009-1017.
- Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998;391:496-499.
- Roth W, Wagenknecht B, Grimmel C, Dichgans J et Weller M. Taxol-mediated augmentation of CD95 ligand-induced apoptosis of human malignant glioma cells: association with bcl-2 phosphorylation but neither activation of p53 nor G<sub>2</sub>M cell cycle arrest. *Br J Can* 1998;77(3):404-411.

- Rotonda J, Nicholson DW, Frazil KM, Gallant M, Gareau Y, et al. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Biotechnol* 1996;3:619-625.
- Rowinsky E et Donehower R. In: Chabner BA, Longo DL (eds) (1996) *Cancer Chemotherapy and Biography*. Philadelphia: Lippincott: 379-393.
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS et Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997;16:6914-6925.
- Sander M et Hsieh TS. Double-strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 1983;258:8421-8428.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, et al. Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1675-1687.
- Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M et al. Channel formation by antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5113-5118.
- Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Siato M et al. Comparison of the channel characteristics of proapoptotic bax and antiapoptotic bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11357-11362.
- Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, et al. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* 1997;416:329-334.

- Schomburg U et Grosse F. Purification and characterization of DNA topoisomerase II from calf thymus associated with polypeptides of 175 and 150 kDa. *Eur J Biochem* 1986;160:451-457.
- Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, et al. TRICK2, anew alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* 1997;7:693-696.
- Screaton GR, Xu XN, Olsen AL, Cowper AE, Tan R, et al. LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4615-4619.
- Seshagiri S et Miller L. *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr Biol* 1997;7:455-460.
- Seshagiri S et Miller LK. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13606-13611.
- Shellhaas JL et Zuckerman SH. *In vitro* detection of apoptotic stimuli by use of the HL-60 myeloid leukemic cell line. *Clin and Diagnostic Laboratory Immunol* 1995;2(5): 598-603.
- Shenfield GM. Combination bronchodilator therapy. *Drugs* 1982;24:414-439.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818-821.

- Simone JV. Childhood leukemia as a model for cancer research. *Cancer Res* 1979;39:4301-4307.
- Smith CA, Farrah T et Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 1994;76:959-962.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G et Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/Apo-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple CED-3/ICE-like cysteine protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14486-14491.
- Steel GG et Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979;5:85-91.
- Strum JC, Small GW, Pauig SB et Daniel LW. 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1994;269:15493-15497.
- Su RT. Effect of 1,4-dihydroxy-5,8-bis(2-(2-hydroxyethylamino)ethylamino)-9,10-anthracenedione(dihydroxyanthraquinone) on the replication of simian virus 40 chromosome. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;103(1):249-255.
- Sugimura K, Uemiya M, Azuma I, Yamawaki M et Yamamura Y. Macrophage dependency of T-lymphocyte mitogenesis by *Nocardia rubra*-cell wall skeleton. *Microbiol Immunol* 1977;21:525-530.
- Swat W, Ignatowicz L et Kisielow P. Detection of apoptosis of immature CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes by flow cytometry. *J of Immunol Meth* 1991;137:79-87.

- Szumiel I et Nias AHW. Isobologram analysis of the combined effects of anti-tumour platinum complexes and ionizing radiation on mammalian cells. *Br J Cancer* 1980;42:292-296.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW et Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993;74:845-853.
- Tattersall MHN, Hutchison RM, Gaya H et Speirs AD. Empirical antibiotic therapy in febrile patients with neutropenia and malignant disease. *Eur J Cancer* 1973;9:417-423.
- Taylor SH, Silke B et Nelson GIC. Principles of treatment of left ventricular failure. *Eur Heart J* 1982;3(D):19-43.
- Thornberry NA et Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 281(5381):1312-1316.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:17907-17911.
- Ting AT, Pimentel-Muinos FX et Seed B. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappa B but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J* 1996;15:6189-6196.
- Tosi P, Visani G, Ottaviani E, Manfroi S, Zinzani PL, et al. Fludarabine + Ara-C + G-CSF: cytotoxic effect and induction of apoptosis on fresh acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1994;8(12):2076-2082.

Tsai CM, Gazdar AF, Venzon DJ, Steinberg SM, Dedrick RL, et al. Lack of *in vitro* synergy between etoposide and cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 1989;49:2390-2397.

Ucker DS, Meyers J et Obermiller PS. Activation –driven T cell death. II. Quantitative differences alone distinguish stimuli triggering non transformed T cell proliferation or death. *J Immunol* 1992;149:1583-1592.

Uemura T et Yanagida M. Isolation of type I and type II topoisomerase mutants from fission yeast: Single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. *EMBO J* 1984;3:1737-1744.

Uemura T et Yanagida M. Mitotic spindle pulls but fails to separate chromosomes in type II DNA topoisomerase mutants: Uncoordinated mitosis. *EMBO J* 1986;5:1003-1010.

Uemura T, Ohkura H, Adachi Y, Morino K, Shiozaki K, et al. DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S pombe*. *Cell* 1987;60:917-925.

Uren AG, Coulson EJ et Vaux DL. Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci* 1998;23:159-162.

Vadlamudi S et Goldin A. Influence of mitotic inhibitors on the antileukemic activity of cytosine arabinoside (NSC-63878) in mice bearing leukemia L1210. *Cancer Chemotherapy Reports* 1971;55(5):547-555.

Valeriote F et Lin H. Synergistic interaction of anticancer agents: a cellular perspective. *Cancer Chemother* 1975;59:895-900.

- Van der Meijen APM. Practical approaches to the prevention and treatment of adverse reactions to BCG. *Eur Urol* 1995;27(suppl. 1):23-28.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacher PT et Thompson CB. Bcl-xl regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997;91:627-637.
- Varfolomeev E, Boldin M, Goncharov T et Wallach D. A potential mechanism of "cross-talk" between the p55 tumor necrosis factor receptor and Fas/APO1: proteins binding to the death domains of the two receptors also bind each other. *J Exp Med* 1996;183:1271-1275.
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997;16:5386-5397.
- Walker NPC, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell* 1994;78:343-352.
- Wang JC, Caron PR et Kim RA. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome instability: A double edged sword? *Cell* 1990;62:403-406.
- Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 1985;54:665-697.
- Wang JC. DNA topoisomerases: Why so many? *J Biol Chem* 1991;266:6659-6662.

- Webb JL. Effect of more than one inhibitor. In: *Enzymes and Metabolic Inhibitors*, vol. 1, pp. 66-79 & 487-512, Academic Press, New York, 1963.
- Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, et al. Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* 1998;273:9158-9167.
- Wesner PW, JR. et Kaufmann SH. Methods utilized in the study of apoptosis. *Adv Pharmacol* 1997;41:57-87.
- Wilson KP, Black JF, Thompson JA, Kim EE, Griffith JP, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 1994;370:270-275.
- Wolf BB et Green DR. Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999;274(29):20049-20052.
- Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacan E, et al. Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 1996;274:1710-1713.
- Woodcock DM et Cooper IA. Aberrant double replication of segments of chromosomal DNA following DNA synthesis inhibition by cytosine arabinoside. *Exp Cell Res* 1979;123:157-166.
- Woodcock DM, Adams JK et Cooper IA. Relationship between aberrant DNA replication and loss of cell viability in Chinese hamster ovary CHO-K1 cells. *Cancer Res* 1982;42:4744-4752.

- Woodcock DM. Cytosine arabinoside toxicity: molecular events, biological consequences, and their implications. *Semin Oncol* 1987;14:251-256.
- Wu GS, Burns TF, McDonald ER 3<sup>rd</sup>, Jiang W, Meng R, et al. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature Genet* 1997;17:141-143.
- Wyllie AH, Kerr JFR et Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-305.
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556.
- Xiang J, Chao DT et Korsmeyer SJ. Bax-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14559-14563.
- Xue D et Horvitz HR. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 1995;377:248-251.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, et al. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132.
- Yoshida S, Yamada M et Masaki S. Inhibition of DNA polymerase-alpha and -beta of calf thymus by 1-beta-D-arabinosylcytosine-5'-triphosphate. *Biochim Biophys Acta* 1977:144-150.
- Young LS. *Mycobacterium avium* complex infection. *J Infect Dis* 1988;157:863-867.

- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM et Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993;75:641-652.
- Zechiedrich EL et Osheroff N. Eukaryotic topoisomerase II recognizes nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO J* 1990;9:4555-4562.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J et Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not bcl-xl. *Cell* 1996;87:619-628.
- Zlotta A.R, Van Vooren J-P, Shekarsarai H, Denis O, Drowart A, et al. Dissecting the antigenic active components of BCG: role of BCG cell wall inner membrane and cytoplasm. *Br J Urol* 1997;80(suppl.2):A131.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A et Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405-413.
- Zou H, Li Y, Liu X et Wang X. An apaf-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999;274:11549-11556.