

Université de Montréal

Étude des voies de signalisation et des mécanismes moléculaires  
impliqués dans l'apoptose des cellules leucémiques HL-60  
traitées avec des inhibiteurs de topoisomères I et II

par  
Stéphane Bergeron

Programme de biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en biologie moléculaire

5 janvier 2005  
© Stéphane Bergeron, 2005



QH

506

U54

2005

V.020

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

**Étude des voies de signalisation et des mécanismes moléculaires  
impliqués dans apoptose des cellules leucémiques HL-60  
traitées avec des inhibiteurs de topoisomérases I et II**

présentée par :  
Stéphane Bergeron

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Edward Bradley  
président-rapporteur

Dr. Richard Bertrand  
directeur de recherche

Dr. Réjean Lapointe  
membre du jury

Dre. Chantal Autexier  
examineur externe

Thèse acceptée le 5 mars 2005

## RÉSUMÉ

Bien qu'ils soient prescrits en clinique depuis plusieurs années, il est étonnant de constater que nous ignorons toujours précisément par quels mécanismes moléculaires les agents chimiothérapeutiques, tels la camptothécine (CPT) et l'étoposide (VP16), induisent l'apoptose des cellules cancéreuses. Dans cette étude, nous avons évalué l'importance de certaines voies de signalisation, soit celles associées aux récepteurs de mort cellulaire, aux mapkinases et la protéine kinase Abl, dans l'induction de l'apoptose chimio-induite en utilisant comme modèle une lignée cellulaire de leucémie humaine.

À partir d'analyses d'immunohistochimie et de chromatographie d'exclusion moléculaire effectuées chez les cellules HL-60 traitées à la CPT ou au VP16, nous avons remarqué que contrairement au récepteur Fas, les récepteurs DR3 et DR4 s'oligomérisent à la membrane cellulaire et forment des complexes protéiques de haut poids moléculaire, bien que leurs expressions restent stables suite au traitement. En revanche, l'expression de SODD et FLIPs, connus pour inhiber les voies de signalisation associées à ces récepteurs, diminue de façon importante 4 h après traitement, ce qui pouvait suggérer la participation des récepteurs de la mort cellulaire dans la cytotoxicité associée à ces drogues. Cependant, des expériences de transfection transitoire effectuées dans les cellules HL-60 ont révélé que la surexpression de l'inhibiteur SODD et de la forme dominante négative des protéines adaptatrices FADD (FADD-DN), DAP3 (DAP3-DN), et d'un mutant de délétion du domaine N-terminale de la protéine adaptatrice TRADD (TRADD-ND) ne module pas les cinétiques d'activation de l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques étudiés dans ces cellules. Des résultats similaires ont été également obtenus dans la lignée cellulaire U937. Ces résultats suggèrent qu'à défaut de participer de façon importante dans l'apoptose induite par ces agents chimiothérapeutiques, les récepteurs DR3 et DR4 agissent potentiellement comme boucle d'amplification ou voie de signalisation alternative. En effet, des traitements combinés de CPT ou VP16 avec TRAIL, le ligand des récepteurs DR4 et DR5, accélèrent la cinétique de l'apoptose dans les cellules HL-60, comparé aux traitements non-combinés de CPT, VP16 ou TRAIL. Au contraire, les traitements combinés de CPT ou VP16 avec TWEAK ou TL1A, ligands décrits pour DR3, n'ont aucun effet sur les cinétiques d'apoptose dans les cellules HL-60. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'oligomérisation de DR4 induite par la CPT et le VP16 représente un mécanisme qui

accélère la cinétique d'activation de l'apoptose induite par TRAIL (*Bergeron et al. Mol Cancer Ther* 2004, 3(12) :1-11).

Dans nos études sur l'implication des voies de signalisation associées aux mapkinases, nous démontrons que contrairement à la p38, qui est rapidement activée suite aux traitements, les kinases MKK3, MKK4 et JNK ne semblent pas être activées par la CPT ou le VP16 dans les cellules HL-60. De plus, l'activation de p38 semble indépendante des récepteurs de la mort cellulaire puisque la surexpression de FADD-DN et TRADD-ND n'interfère pas avec l'activation de cette kinase. Les cellules traitées à la CPT en présence d'inhibiteurs de p38 présentent une augmentation de la fragmentation de leur ADN associée à l'apoptose, comparé aux cellules traitées uniquement avec la CPT. Ces résultats suggèrent que la p38 est impliquée dans des voies de signalisation antiapoptotiques ou de survie dans les cellules HL-60 traitées à la CPT. L'importance et le rôle de l'activation de p38 restent incertains dans le cas du VP16. En parallèle, l'expression du répresseur I $\kappa$ B(SR) connu pour empêcher l'activation de NF- $\kappa$ B, augmente également la fragmentation de l'ADN dans les cellules HL-60 traitées à la CPT. Ces résultats suggèrent que l'activation de NF- $\kappa$ B serait impliquée dans des voies antiapoptotiques ou de survie, potentiellement similaires à celles observées avec p38 dans ces cellules. Les liens possibles entre l'activation de p38 et NF- $\kappa$ B restent cependant à être définis.

Nous avons aussi remarqué que les deux agents chimiothérapeutiques activent la kinase Abl et que l'utilisation d'un inhibiteur de cette kinase favorise une diminution de la fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose induite par la CPT, alors qu'aucune différence n'a été observée chez les cellules traitées avec le VP16 dans les cellules HL-60. Abl semble donc être associée à une voie de signalisation favorisant le déclenchement de l'apoptose après un traitement à la CPT. L'utilisation d'un inhibiteur de la PKC- $\delta$  et des isoformes naturelles de p73 et p63 délétées en position N-terminale et qui agissent comme dominants négatifs ( $\Delta$ Np73 $\alpha$ - $\beta$ ;  $\Delta$ Np63 $\alpha$ - $\beta$ ), n'affectent pas la cinétique d'activation de l'apoptose de ces cellules après un traitement à CPT, indiquant que Abl agit indépendamment à ces voies de signalisation.

Les travaux présentés dans cette thèse suggèrent que les cellules leucémiques HL-60, traitées avec les agents chimiothérapeutiques étudiés, activent simultanément différentes voies de signalisation. Notamment, l'activation de la voie de signalisation associée à la kinase Abl favoriserait l'induction de l'apoptose au sein de la cellule cancéreuse après un traitement à la CPT. Parallèlement à cette voie, un mécanisme de protection ou de survie est instauré dans ces cellules par l'intermédiaire des voies de signalisation associées à la mapkinase p38 et au facteur de transcription NF- $\kappa$ B après un traitement à la CPT. L'activation de ces voies résulterait en des signaux de survie ralentissant la cinétique de l'apoptose associée à la CPT. Finalement, une troisième voie qui agirait comme mécanisme alternatif et qui impliquerait certains des récepteurs de la mort cellulaire, pourrait faire office de boucle d'amplification, et accélérerait la cinétique apoptotique suite à un traitement combinant TRAIL, un ligand de ces récepteurs de mort cellulaires, avec la CPT ou le VP16.

**MOTS CLÉS :** apoptose, topoisomérase, camptothécine, étoposide, FAS, DR3, DR4, TRAIL, SODD, FLIP, NF- $\kappa$ B, p38, Abl, HL-60 .

## SUMMARY

Chemotherapeutic agents, including camptothecin (CPT) and etoposide (VP16), which have been commonly used for cancer treatment for several years. Surprisingly, the exact molecular mechanisms of apoptosis activation induced by these drugs are not fully characterized. In these studies, we have investigated the importance of some signaling pathways, including those associated with cell death receptors, the MAPKs and protein kinase Abl, in chemotherapy-induced apoptosis using human leukemia cell lines as models.

By indirect immunofluorescence and immunoperoxidase imaging and with gel filtration column chromatography, we observed rapid aggregation at the cell surface and the appearance of high molecular weight protein complexes primarily involving DR3, DR3 and DR4 after CPT and VP16 treatment in HL-60 cells, respectively. Both drugs failed to rapidly promote FAS aggregation in these cells. In parallel, the expression level of DR3, DR4 and FAS remained mostly unchanged, while the expression of SODD and FLIP<sub>s</sub>, inhibitors of the cell death receptor signaling pathways, decreased substantially 4 h after drug treatment. However, the high expression level of SODD or of dominant negative forms of FADD (FADD-DN) and DAP3 (DAP3-DN), or of the N-terminal deletion mutant of TRADD (TRADD-ND), achieved by transient transfection experiments, did not impair the kinetics of apoptosis after CPT and VP16 treatment in HL-60 and U937 cells. Taken together, these observations suggested that CPT and VP16 induced rapid aggregation of DR4 and DR3, but paradoxically, the importance of these events in signaling apoptosis is uncertain, because the kinetics of apoptosis were unaffected, even in the presence of a high expression level of SODD, FADD-DN, TRADD-ND and DAP3-DN. However, CPT or VP16 treatment in combination with TRAIL, a DR4 and DR5 ligand, substantially accelerated the kinetics of apoptosis more than treatment with CPT, VP16 or TRAIL alone. In contrast, co-treatment of CPT or VP16 with TWEAK or TL1A, putative DR3 ligands, did not facilitate apoptosis in HL-60 cells. These findings suggest that DR4 aggregation mediated by CPT or VP16 could represent a mean that accelerates TRAIL-induced apoptosis (*Bergeron et al. Mol Cancer Ther 2004; 3(12):1-11*).

Investigating the importance of the MAPK pathways, we found that both drugs failed to activate MKK3, MKK4 and JNK kinases while p38 was rapidly activated following CPT or

VP16 treatment in HL-60. p38 activation appears to be independent of cell death receptor signaling pathways since it was not impaired by overexpression of FADD-DN or TRADD-ND. In addition, cells treated with CPT in the presence of p38 inhibitors showed increased DNA fragmentation associated with apoptosis compared to cells treated with CPT only. These results suggest that p38 activation is coupled to antiapoptotic or survival signaling in CPT-treated cells. The significance of p38 activation in VP16-treated cells remains enigmatic. In parallel, expression of I $\kappa$ B(SR), an inhibitor of NF- $\kappa$ B activation, increased the kinetics of DNA fragmentation in CPT-treated cells. These results indicate that NF- $\kappa$ B activation could be involved in antiapoptotic or survival signaling in HL-60 cells, in a way similar to that mediated by p38. However, the relationship between p38 and NF- $\kappa$ B activation remains to be investigated.

Abl is rapidly activated by both drugs, and HL-60 cells treated with Abl inhibitor showed reduced kinetics of DNA fragmentation in CPT-treated cells, while no DNA fragmentation variation was observed after VP16 treatment. Thus, Abl activation appears to be associated with signaling that favours CPT-induced apoptosis in these cells. However, the presence of PKC- $\delta$  inhibitor and of the natural isoforms of p73 and p63 that show N-terminal deletions which act as dominant negative forms ( $\Delta$ Np73 $\alpha$ - $\beta$ ;  $\Delta$ Np63 $\alpha$ - $\beta$ ), does not impair the kinetics of apoptosis induced by CPT in HL-60 cells. These results suggest that Abl signaling after CPT treatment acts independently of these pathways.

The work presented here indicates that HL-60 cells treated with CPT or VP16 simultaneously induce different signaling pathways. Indeed, Abl activation leads to signaling that accelerates CPT-induced apoptosis in these cancer cells. In parallel, p38 and NF- $\kappa$ B activation is involved in survival signaling that reduces the kinetics of CPT-induced apoptosis in HL-60 cells. Finally, cell death receptor signaling pathways could act as an alternative mechanism or amplification loop, and accelerate the kinetics of apoptosis in combined treatment involving TRAIL with CPT or VP16.

**KEY WORDS:** apoptosis, topoisomerase, camptothecin, etoposide, FAS, DR3, DR4, TRAIL, SODD, FLIP, NF- $\kappa$ B, p38, Abl, HL-60.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Summary .....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des schémas.....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xv
Avant-propos.....	xvii

## CHAPITRE I INTRODUCTION ..... 1

1.1 La chimiothérapie.....	2
1.1.1 Historique et généralités.....	2
1.1.2 Les différentes classes d'agents chimiothérapeutiques.....	2
1.1.3 Les inhibiteurs de topoisomérases n'appartenant pas aux anthracyclines .....	5
1.1.3.1 La camptothécine .....	5
1.1.3.2 L'étoposide.....	7
1.1.3.3 Mécanisme d'action de la camptothécine et de l'étoposide.....	9
1.1.4 Types de réponses cellulaires induites par la chimiothérapie .....	16
1.2 La signalisation cellulaire impliquée dans l'apoptose .....	22
1.2.1 L'apoptose et ses principaux éléments régulateurs.....	22
1.2.1.1 La famille des Bcl-2 .....	24
1.2.1.2 La famille des caspases .....	26
1.2.1.3 La voie intrinsèque de l'apoptose : la mitochondrie .....	29
1.2.1.4 La voie extrinsèque de l'apoptose : les récepteurs de la mort cellulaire.....	37
1.2.1.4.1 Signalisation associée aux récepteurs de la mort cellulaire.....	42
1.2.1.5 Régulation négative de la voie des récepteurs de la mort cellulaire.....	45
1.2.1.6 Le rôle des récepteurs de la mort cellulaire dans la chimiothérapie.....	45

1.3	La signalisation cellulaire qui est associée ou non à la régulation de la réponse apoptotique .....	46
1.3.1	Les mapkinases et leurs fonctions biologiques dans la cellule .....	47
1.3.1.1	Les voies de signalisation associées aux mapkinases .....	47
1.3.1.2	Le rôle des mapkinases dans la chimiothérapie .....	50
1.3.2	Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et sa fonction biologique dans la cellule .....	51
1.3.2.1	La voie de signalisation associée au facteur de transcription NF- $\kappa$ B .....	52
1.3.2.2	Le rôle de NF- $\kappa$ B dans la chimiothérapie .....	52
1.3.3	Les kinases ATM/ATR et Abl : leurs fonctions biologiques dans la cellule .....	54
1.3.3.1	La voie de signalisation ATM-Abl .....	56
1.3.3.1.1	Les substrats proapoptotiques de Abl : les homologues de p53 .....	58
1.3.3.1.2	Les substrats proapoptotiques de Abl : la famille des PKC .....	59
1.3.3.2	Le rôle de la voie ATM-Abl dans la chimiothérapie .....	60
1.4	Modèles expérimentaux et objectifs de l'étude .....	61
 CHAPITRE II MÉTHODOLOGIE .....		63
2.1	Réactifs et Matériels .....	64
2.2	Culture cellulaire, clonage de l'ADN, transfection, marquage de l'ADN et traitement avec les drogues .....	64
2.3	Quantification des activités de caspase .....	67
2.4	Analyse de la fragmentation de l'ADN .....	68
2.5	Analyse d'immunohistochimie .....	69
2.6	Analyse de l'expression protéique par des buvardages de type Western et la cytométrie de flux .....	69
2.7	Analyses de chromatographie sur colonne .....	70

CHAPITRE III	RÉSULTATS .....	72
3.1	L'agrégation des récepteurs de la mort cellulaire à la surface des cellules HL-60 suite au traitement avec la camptothécine et l'étoposide .....	73
3.2	La formation de complexes de haut poids moléculaire implique la présence des récepteurs DR3 et DR4 après un traitement à la CPT et au VP16 .....	79
3.3	La fonction biologique des complexes DR3 et DR4 dans les cellules HL-60 traitées à la camptothécine et l'étoposide.....	83
3.4	L'activation des mapkinases dans les cellules HL-60 traitées à la camptothécine et à l'étoposide.....	85
3.5	Le rôle biologique de la p38 dans l'apoptose induite par la camptothécine et l'étoposide .....	89
3.6	Le rôle biologique du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans l'apoptose induite par la camptothécine et l'étoposide.....	91
3.7	Le rôle biologique de la kinase Abl dans l'apoptose induite par la camptothécine et l'étoposide.....	94
3.8	Les mécanismes moléculaires impliqués dans la fonction proapoptotique de Abl dans les cellules traitées à la camptothécine .....	97
CHAPITRE IV	DISCUSSION .....	101
4.1	Le rôle des récepteurs de la mort cellulaire dans l'apoptose induite par la chimiothérapie.....	103
4.2	L'activation des voies de signalisation impliquées dans la protection de la cellule contre les agents chimiothérapeutiques .....	113
4.3	La kinase Abl et son rôle dans l'apoptose induite par la chimiothérapie .....	117
4.4	La signalisation cellulaire impliquée dans la réponse à la chimiothérapie : une vision d'ensemble.....	122
4.5	Conclusions et perspectives .....	126
Bibliographie.....		135

## LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1 :	Structure moléculaire de la camptothécine et de ses analogues .....	6
Schéma 2:	Structure moléculaire de l'étoposide et du teniposide .....	8
Schéma 3:	Modèle pour le mécanisme d'action de la topoisomérase I de <i>E.coli</i> .....	11
Schéma 4:	Modèle pour le mécanisme d'action de la topoisomérase II $\alpha$ de <i>E.coli</i> .....	12
Schéma 5:	Modèle pour le mécanisme d'action de la camptothécine .....	14
Schéma 6:	Type de réponses cellulaires induite par des dommages à l'ADN.....	17
Schéma 7:	Représentation des 3 voies de signalisation impliquées dans la réparation des cassures double brins .....	20
Schéma 8:	Représentation des membres de la famille de Bcl-2.....	25
Schéma 9:	Représentation des membres de la famille des caspases .....	27
Schéma 10:	Mécanismes potentiels pour la perméabilisation de la membrane mitochondriale.....	32
Schéma 11 :	Voies de signalisation associées à l'apoptose.....	35
Schéma 12:	Famille des récepteurs de la mort cellulaire .....	39
Schéma 13:	Voies de signalisation associées aux mapkinases.....	49
Schéma 14:	Voies de signalisation associées à NF-kB .....	53
Schéma 15 :	Voies de signalisation associées à ATM-Abl .....	57
Schéma 16:	Ensemble des voies de signalisation activées dans les cellules HL-60 suite à un traitement à la camptothécine ou à l'étoposide .....	128

## LISTE DES FIGURES

Tableau I :	Information sur la provenance ainsi que les caractéristiques techniques des anticorps et composés chimiques utilisés dans le cadre de cette étude .....	65
Figure 1:	Cinétique de l'activation des caspases et de la fragmentation de l'ADN chez les cellules HL-60 traitées à la camptothécine et à l'étoposide.....	74
Figure 2:	Effet de la camptothécine et de l'étoposide sur l'agrégation des récepteurs Fas, DR3 et DR4 à la surface des cellules HL-60.....	75
Figure 3:	Cinétique d'expression de Fas, DR3, DR4, FLIPs et SODD chez les cellules HL-60 traitées à la camptothécine.....	77
Figure 4:	Cinétique d'expression de Fas, DR3, DR4, FLIPs et SODD chez les cellules HL-60 traitées à l'étoposide.....	78
Figure 5:	Le traitement des cellules HL-60 à la camptothécine ou à l'étoposide induit la formation de complexes protéiques de haut poids moléculaire.....	81
Figure 6:	Effet de la surexpression de l'inhibiteur SODD et de la forme dominante-négative de FADD, DAP3 et du mutant de délétion de TRADD sur l'apoptose induite par la camptothécine et l'étoposide dans les cellules HL-60 et U937 .....	84
Figure 7:	Traitement combiné de la camptothécine ou de l'étoposide avec les ligands TRAIL, TWEAK ou TL1A dans les cellules HL-60.....	86
Figure 8:	Cinétique d'activation des kinases MKK3, MKK4, JNK et p38 chez les cellules HL-60 traitées à la camptothécine ou à l'étoposide .....	88
Figure 9:	Effet du dominant négatif de FADD et du mutant de délétion de TRADD sur l'activation de la p38 chez les cellules HL-60 traitées à la camptothécine ou à l'étoposide.....	90

Figure 10:	Effet de l'inhibition de la p38 sur l'apoptose induite par la camptothécine dans les cellules HL-60 .....	92
Figure 11:	Effet de l'inhibition de la p38 sur l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules HL-60 .....	93
Figure 12:	Effet du répresseur I $\kappa$ B(SR) sur la fragmentation de l'ADN induite par la camptothécine ou l'étoposide dans les cellules HL-60.....	95
Figure 13:	Cinétique d'activation de la kinase Abl et son rôle dans la fragmentation de l'ADN suite à un traitement à la camptothécine ou à l'étoposide .....	96
Figure 14:	Cinétique d'expression des protéines p63 et p73 et effet de la surexpression des isoformes naturels dominantes-négatives de $\Delta$ Np63 $\alpha$ , $\Delta$ Np63 $\beta$ , $\Delta$ Np73 $\alpha$ et $\Delta$ Np73 $\beta$ sur la fragmentation de l'ADN induite par la camptothécine dans les cellules HL-60 .....	98
Figure 15:	Cinétique d'activation de la PKC- $\delta$ et son rôle dans la fragmentation de l'ADN induite par un traitement à la camptothécine dans les cellules HL-60.....	100

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\Delta\Psi_m$ :	mitochondrial transmembrane potential
Å:	Angstrom
Ac:	anticorps
Ac-DEVD-AMC:	acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl-coumarin (a caspase-3-like substrate)
Ac-LEHD-AFC :	acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (a caspase-9-like substrate)
z-IETD-AFC :	benzyloxycarbonyl -Ile-Asp-Thr-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (a caspase-8-like substrate)
ADN:	acide désoxyribonucléique
AIF:	apoptosis inducing factor
AML:	acute myeloid leukemia
ANT:	adenine nucleotide translocator
APAF:	apoptotic protease activating factors
APL:	acute promyelocytic leukemia
ARN:	acide ribonucléique
ARNi	ARN interference
ARNm	ARN messenger
ASK1:	apoptosis-stimulated kinase1
ATM:	ataxia telangiectasia mutated
ATP:	adenosine triphosphate
ATR:	ATM and Rad3-related
Bcl-2:	B-cell lymphoma/leukemia-2 gene
BIR:	baculovirus IAP repeats
BH:	Bcl-2 homology domain
BRCA:	breast cancer susceptibility gene
BSA :	bovine serum albumin
CARD:	caspase recruitment domain
CASPASE:	cysteinyl aspartate-specific proteinase
Chk1/Chk2:	checkpoint kinase 1/2
Ci:	curie
CPT:	camptothécine
CRD:	cysteine-rich domains
DAG:	diacylglycerol
DAP3:	pro-apoptotic death-associated protein 3
DAP3-DN:	pro-apoptotic death-associated protein 3 dominant negative
DcR1/2/3:	decoy receptor 1/2/3
DD:	death domain
DED:	death effector domain
DHFR:	dihydrofolate reductase
DIABLO:	direct IAP binding protein with low pI
DISC:	death inducing signaling complex

DNA-PK:	DNA dependent protein kinase
DR3/4/5/6:	death receptor 3/4/5/6
DSB:	double strand break
DTT :	dithieno[3,2-b:2',3'-d]thiophene
ECL:	enhanced chemoluminescence
EDAR:	ectodysplasin
EMSA:	electrophoretic mobility shift assay
ERK:	extracellular signal-regulated kinase
FADD:	Fas-associated death domain
FADD-DN:	Fas-associated death domain dominant negative
FDR:	Fas decoy receptor
FITC :	fluorescein isothiocyanate
FLAG:	peptide de fusion (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)
FLICE:	Fas-associated death domain protein interleukin-1beta-converting enzyme
FLIP:	FLICE-inhibitory protein
FPLC :	fast protein liquid chromatography
g :	gramme
HA:	peptide de fusion (hemagglutinin)
HDAC:	histone deacetylase
HLBs:	HMG-like boxes
HPM:	complexe de haut poids moléculaire
HR:	homologous recombination
IAP:	inhibitor of apoptosis protein
JNK:	jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
KDa:	kiloDalton
kV :	kilovolts
MAPKKK:	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
Mdm2:	mouse double minutes 2
MEKK1:	extracellular signal-regulated kinase kinase kinase
μCi :	microcurie
μg :	microgramme
μl :	microlitre
mg :	milligramme
ml :	millilitre
mM :	millimolaire
Nbs1:	Nijmegen breakage syndrome 1
NEMO:	NF-kappaB essential modulator
ng :	nanogramme
NGFR:	nerve growth factor receptor
NHJE:	nonhomologous end-joining
nm :	nanomètre
OPG:	osteoprotegerin
PBS:	phosphate buffer saline
PCR:	polymerase chain reaction

PDK1:	phosphoinositide-dependent kinase1
PI3-Kinase:	phosphatidylinositol-3-kinase
PKC:	protéine kinase C
PTP:	permeability transition pore
RIP:	receptor interacting protein
RMC:	récepteur de la mort cellulaire
ROS:	reactive oxydative species
RPA:	replication protein A
RT-PCR :	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SAM:	sterile a motif
sd :	standard deviation
se :	standard error
siARN	short interfering ARN
SODD:	silencer of death domain
SSA:	single strand annealing
SSB:	single strand break
TCR:	transcription-coupled repair
TDP1:	tyrosyl-DNA phosphodiesterase
TM:	domaine transmembranaire
TNFR1:	tumor necrosis factor receptor-1
TopI :	topoisomérase de type I
TopII:	topoisomérase de type II
TRADD:	TNF receptor-associated death domain
TRADD-DN:	TNF receptor-associated death domain deletion mutant on N-terminal
TRAF:	TNF receptor associated factor
TRAIL:	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TS:	Thymidylate synthase
TWEAK:	tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis
U :	unité
VDAC:	voltage-dependent anion channel
VP16 :	etoposide

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier particulièrement mon directeur de recherche, le Dr. Richard Bertrand, avec qui j'ai pu bénéficier d'un encadrement académique exceptionnel. Son support, ses conseils et nos nombreuses et très intéressantes discussions ont contribué à faire de mon doctorat une expérience très enrichissante et très instructive. Mon travail à ses côtés fut une aventure pour laquelle je conserverai un excellent souvenir.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que je remercie Myriam Beauchemin dont l'amitié et l'aide technique ont grandement facilité mon travail. Je profite de l'occasion pour remercier également mes camarades de laboratoire, Alain Théophile Sané, Claudie Paquet et Nicolas Parent dont l'amitié fut un atout précieux au cours de ces dernières années.

Je remercie Nathalie Jacques, qui a lu et relu cette thèse avec beaucoup d'attention. Ses commentaires et son soutien indéfectible depuis le début de mes études graduées ont contribué grandement au succès de cette entreprise et à la rédaction de cette thèse.

Merci à tous mes collègues de l'Institut du Cancer de Montréal qui ont travaillé à mes côtés pendant ces dernières années et dont le très grand esprit de camaraderie a contribué à faire de mon doctorat une expérience agréable. Je tiens également à souligner les efforts déployés par l'Institut du Cancer de Montréal pour offrir un cadre académique dynamique et enrichissant, et fournir tout le soutien nécessaire pour la réussite académique des étudiants gradués.

Enfin, je remercie la Société de Recherche sur le Cancer et les Instituts de Recherche en Santé du Canada qui ont subventionné ce projet de recherche, ainsi que la Faculté des Études Supérieures, la Fondation Marc-Bourgie, la Fondation Robert-Bourassa, Canderel et le département de Biologie Moléculaire de l'Université de Montréal pour leur support financier.

*À Nathalie Jacques*

## AVANT-PROPOS

Les experts prévoient que le cancer représentera la première cause de décès dans les pays industrialisés au cours du 21<sup>e</sup> siècle. L'avènement de nouvelles approches telles que la thérapie génique ou l'immunothérapie a malheureusement suscité beaucoup plus d'espoir que de réels progrès et, par conséquent, nous sommes encore très loin de l'ultime guérison et de l'irradication complète de cette maladie. Néanmoins, au cours de la dernière décennie, l'amélioration des agents utilisés en chimiothérapie et une meilleure compréhension de cette maladie nous ont permis l'obtention de progrès significatifs dans le traitement de certaines formes de cancer, notamment les leucémies de type myéloïde aiguë (AML) et de type promyélocytaire aiguë (APL). Plus récemment, d'importantes percées scientifiques ont permis l'identification de nouvelles cibles moléculaires et le développement de nouvelles drogues dont le STI571 (GLEEVEC®), un nouvel agent chimiothérapeutique efficace et peu toxique contre ces types de leucémie. Parallèlement à ces études, bon nombre de scientifiques tentent de comprendre par quels mécanismes moléculaires les agents chimiothérapeutiques peuvent éliminer les cellules cancéreuses. Certains de ces agents tels que la camptothécine ou l'étoposide sont prescrits en clinique depuis plus de 25 ans et ont démontré leur efficacité contre différentes formes de cancer dont la leucémie de type APL. Il est étonnant de constater que nous ignorons toujours, précisément, par quels mécanismes moléculaires ces agents induisent la mort des cellules cancéreuses. Évidemment, une meilleure connaissance des réponses cellulaires induites par ces agents représenterait un atout majeur pour le développement de nouveaux composés anticancéreux et pourrait faciliter l'amélioration de l'efficacité antitumorale des agents chimiothérapeutiques actuels. C'est donc à partir de ce contexte scientifique que nous avons tenté de comprendre par quels mécanismes moléculaires les inhibiteurs de topoisomérases I et II, soit la camptothécine (CPT) et l'étoposide (VP16), peuvent induire la mort par apoptose des cellules HL-60. Cette lignée cellulaire, établie en 1976 à partir d'un patient atteint de leucémie de type APL, est connue pour l'absence du gène codant pour la protéine p53 au sein de son génome. Les travaux présentés dans cette thèse suggèrent que les cellules leucémiques HL-60, traitées avec les agents chimiothérapeutiques étudiés, activent simultanément différentes voies de signalisation. Notamment, l'activation de la voie de signalisation associée à la kinase Abl favoriserait l'induction de l'apoptose au sein de la cellule cancéreuse. Parallèlement à cette voie, un mécanisme de protection est instauré par

la cellule par l'intermédiaire des voies de signalisation associées à la mapkinase p38 et au facteur de transcription NF- $\kappa$ B. L'activation de ces voies résulterait sur l'inhibition de l'apoptose associée aux agents anticancéreux. De plus, une troisième voie qui agirait comme mécanisme alternatif et qui impliquerait certains des récepteurs de la mort cellulaire pourrait faire office de boucle d'amplification et accélérerait la cinétique apoptotique suite à un traitement combiné de TRAIL avec la CPT ou le VP16. Bien que le modèle cellulaire étudié soit très sensible à l'apoptose et que ces cellules meurent facilement suite aux traitements, il est intéressant de constater que la cellule cancéreuse active simultanément des voies de signalisation dont la fonction biologique est diamétralement opposée, soit la survie ou la mort.

# **Chapitre I**

## **INTRODUCTION**

## 1.1 LA CHIMIOTHÉRAPIE

### 1.1.1 Historique et généralités

L'idée de traiter le cancer par voie systémique prend racine avec les travaux de Paul Ehrlich qui fut le premier à utiliser le terme de chimiothérapie. Ehrlich avait développé un modèle de rongeurs afin de créer un système *in vivo* qui lui permettait d'étudier l'effet de substances antibiotiques dirigées contre certaines maladies infectieuses. La chimiothérapie anticancéreuse telle que nous la concevons aujourd'hui, naquit véritablement avec les travaux de George Clowes. Inspiré par le modèle de Ehrlich, Clowes développa au début du 20<sup>e</sup> siècle une lignée de rats porteurs de tumeurs transplantées permettant ainsi de tester une multitude de composés. Ce système permit la découverte de plusieurs nouveaux composés possédant un potentiel anticancéreux [1]. Néanmoins, c'est grâce au plus grand drame de l'humanité contemporaine qu'est né la première vraie classe d'agents chimiothérapeutiques à être utilisés en clinique. En effet, les agents alkylants furent initialement développés par l'armée américaine pendant la 1<sup>re</sup> et la 2<sup>e</sup> guerre mondiale comme arme chimique. Présent dans le gaz moutarde, ce n'est que par hasard que les scientifiques américains ont découvert que les soldats exposés au gaz présentaient une diminution dramatique des lymphocytes et des cellules présentes dans la moelle osseuse. Compte tenu de la nature sensible et secrète du sujet, ce n'est qu'en 1946 que l'armée autorisa la publication de ses observations concernant les propriétés anticancéreuses des agents alkylants présents dans le gaz moutarde [2, 3]. Il faudra attendre jusqu'en 1960 pour que la chimiothérapie puisse être introduite officiellement en clinique. Depuis, la chimiothérapie est couramment administrée et les classes d'agents qui composent son arsenal se sont passablement diversifiées depuis la découverte des agents alkylants.

### 1.1.2 Les différentes classes d'agents chimiothérapeutiques

Un problème majeur s'est rapidement présenté dès les premières utilisations de la chimiothérapie, soit la résistance des cellules cancéreuses au traitement. De ce problème naquit un concept stipulant que pour contourner ou diminuer le problème de résistance cellulaire, il était essentiel d'administrer en combinaison plusieurs agents chimiothérapeutiques possédant des modes d'action différents. Évidemment, ce concept poussa les scientifiques à isoler des composés offrant de nouveaux modes d'action, ce qui entraîna une diversification importante de l'arsenal thérapeutique.

On peut diviser les agents chimiothérapeutiques à l'intérieur de différentes classes en les regroupant selon leurs structures ou encore, en se basant tout simplement sur leurs modes d'action. Les agents alkylants tels que le cyclophosphamide, le procarbazine et le temozolomide constituent la première grande classe d'agents anticancéreux. Les antimétabolites, tels que le méthotrexate ainsi que les composés qui affectent les microtubules comme le paclitaxel et la vincristine, constituent également des classes importantes. On retrouve également les antiestrogènes tels que le tamoxifène et le toremifène, les agents de différenciation tels que l'acide rétinoïque et la classe des antibiotiques qui comprend entre autres la bléomycine. Finalement, les inhibiteurs de topoisomérases appartenant à la famille des anthracyclines, qui comprend des composés tels que la doxorubicine et l'épirubicine ainsi que d'autres inhibiteurs de topoisomérases qui ont une structure moléculaire différente des anthracyclines tels que la camptothécine et l'étoposide, représentent aussi une classe importante d'agents chimiothérapeutiques utilisés dans le domaine clinique.

**Les agents alkylants :** Cette famille d'agents chimiothérapeutiques possède la capacité de former des liens covalents avec les atomes riches en électrons dans la cellule, notamment les bases de l'ADN. Selon le composé, ils peuvent former des liens croisés entre les deux brins de l'ADN ou encore dans un seul des deux brins. Dans le cas où ces lésions ne sont pas réparées, la cellule est incapable de se répliquer efficacement [4].

**Les antimétabolites :** Considérés comme la classe la plus versatile des agents chimiothérapeutiques, ils sont également utilisés dans le traitement de maladies autre que le cancer, telles que le psoriasis, l'arthrite et certaines infections bactériennes [5]. Par exemple, le méthotrexate inhibe l'enzyme DHFR nécessaire à la synthèse des acides foliques réduits, élément essentiel dans la production des bases de l'ADN et les métabolites intracellulaires du méthotrexate inhibent la TS, enzyme requise pour la synthèse de la thymidine. Une déplétion importante des acides foliques réduits conduit à un arrêt de la biosynthèse de certains nucléotides, ce qui entraîne un arrêt complet de la synthèse de l'ADN et par conséquent, la prolifération cellulaire en est grandement affectée [6].

**Les agents antimicrotubules :** Les microtubules constituent une composante essentielle du fuseau mitotique et son rôle, lors de la division cellulaire, est crucial [7]. Les composés

anticancéreux de cette famille peuvent provoquer la destruction des microtubules en affectant directement les sous-unités de tubulines qui composent le microtubule. D'autres agents vont plutôt interférer avec le niveau de polymérisation des microtubules et favoriser leur désassemblage [8, 9].

**Les antiestrogènes :** Uniquement utilisés dans les cancers de type hormonal, ces drogues inhibent la liaison de l'estrogène à son récepteur, ce qui empêche sa translocation au compartiment nucléaire. Par conséquent, toute activité transcriptionnelle associée au récepteur à l'œstrogène est inhibée [10].

**Les agents de différenciation :** L'idée de pousser les cellules vers leur différenciation terminale pour les empêcher de proliférer a connu plus ou moins de succès. En fait, parmi toutes les familles d'agents chimiothérapeutiques, c'est cette classe qui a obtenu le moins de succès clinique. Néanmoins, les succès les plus frappants furent obtenus avec l'acide rétinoïque qui, dans le cadre de certaines formes spécifiques de leucémies, semble efficace pour bloquer la prolifération cellulaire [11].

**Les antibiotiques :** La bléomycine est le composé le plus utilisé et le mieux caractérisé de cette classe d'agents chimiothérapeutiques. Composée d'un groupe de glycopeptides isolé à partir d'une souche japonaise de *Streptomyces verticillus* [12], la bléomycine s'intercale entre les bases de l'ADN et induit des cassures de type double brin. Cet agent produit également des radicaux libres fortement réactifs et est connu pour causer une forte toxicité pulmonaire [13, 14].

**Les anthracyclines :** Cette famille d'agents chimiothérapeutiques est très certainement celle qui est la plus abondamment utilisée au sein de la pratique clinique. Leurs structures se caractérisent par la présence d'un pigment de glycone et d'une chaîne latérale contenant une molécule de sucre. Ces composés induisent la formation de complexes stables entre la topoisomérase et le brin d'ADN [15]. Il existe d'autres composés qui ont une structure moléculaire distincte des anthracyclines et qui ciblent également les topoisomérases. Puisque nous nous intéressons particulièrement à cette dernière classe d'agents anticancéreux, la section suivante traitera plus en détails des connaissances relatives au sujet de ces composés (voir la section 1.1.3).

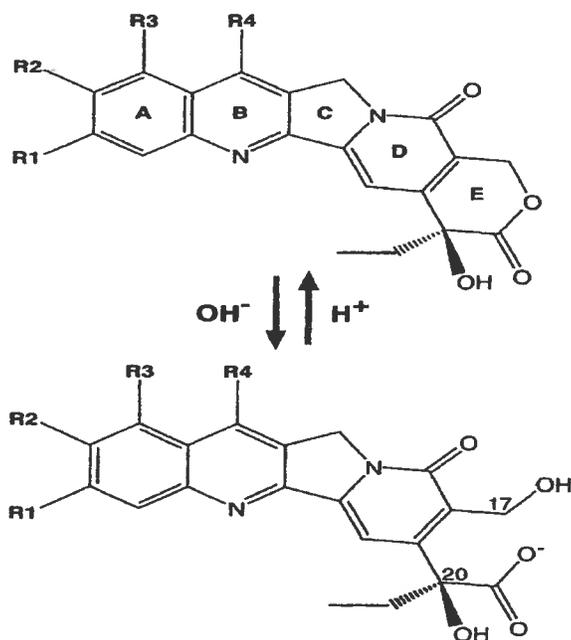
### 1.1.3 Les inhibiteurs de topoisomérase n'appartenant pas aux anthracyclines

Bien que cette classe d'agents chimiothérapeutiques comprend plusieurs composés, je discuterai uniquement des notions se rapportant aux drogues que nous avons étudiées, soit la camptothécine qui est un inhibiteur de la topoisomérase I et l'étoposide qui est connu pour inhiber la topoisomérase II.

#### 1.1.3.1 La camptothécine

On connaît les propriétés anticancéreuses de la camptothécine depuis plus de 25 ans. Initialement isolée à partir de *Camptotheca acuminata*, les chinois furent les premiers à démontrer les vertus chimiothérapeutiques de ce composé alcaloïde de plante. Cependant, de sévères effets toxiques qui entraînent entre autres une destruction massive des cellules de la vessie ont également été observés [16, 17], poussant les scientifiques à développer des composés dérivés.

Tel qu'illustré au schéma 1, la camptothécine possède une structure pentacyclique et un anneau de lactone essentiels aux propriétés anticancéreuses de la molécule. La forme hydroxyle de la molécule conduit à l'ouverture de l'anneau E et perd ses propriétés actives. Les composés dérivés de la camptothécine se distinguent uniquement par le remplacement de certains atomes d'hydrogènes par différents groupes chimiques. Par exemple, le remplacement de deux atomes d'hydrogène, situés sur les carbones 10 et 7 par un groupe hydroxyle et par un groupe diméthylaminométhyle, donne naissance au topotecan (schéma 1). À l'heure actuelle, parmi tous les dérivés de la camptothécine, seuls le topotecan et l'irinotecan sont prescrits couramment en clinique. Contrairement au topotecan, l'irinotecan nécessite une conversion métabolique effectuée par la carboxylestérase pour que les propriétés antitumorales de la molécule soit actives. En comparaison avec le topotecan, cette étape de conversion augmente le risque de développer une résistance au traitement. En effet, une forte relation a été suggérée entre la diminution de l'activité de la carboxylestérase et l'augmentation de la résistance des cellules cancéreuses au traitement de l'irinotecan [18]. En revanche, les effets cytotoxiques secondaires associés à l'irinotecan sont moins sévères que le topotecan [19, 20].

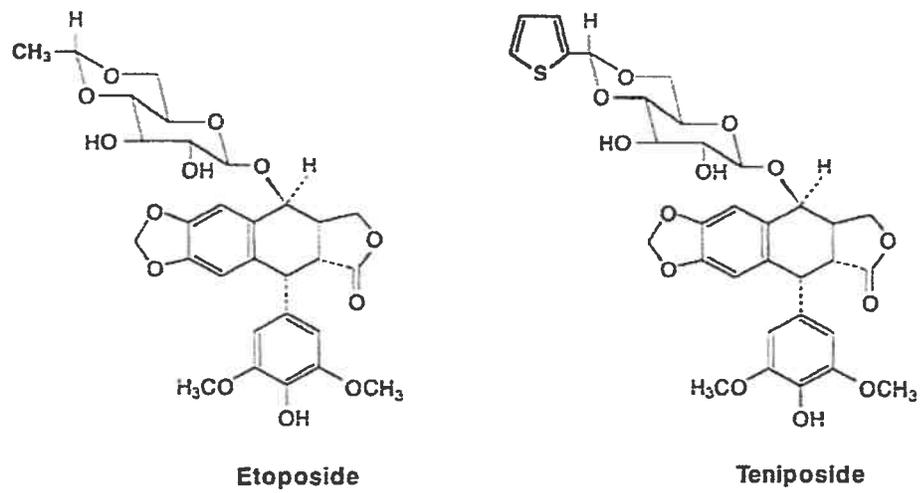


Compound	R1 (C-11)	R2 (C-10)	R3 (C-9)	R4 (C-7)
Camptothecin	H	H	H	H
Irinotecan	H		H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
Topotecan	H	OH		H
Lurtotecan		H	H	
9-Aminocamptothecin	H	H	NH <sub>2</sub>	H
9-Nitrocamptothecin	H	H	NO <sub>2</sub>	H

Schéma 1 : Structure moléculaire de la camptothécine et de ses analogues

### 1.1.3.2 L'étoposide

Le chemin qui allait conduire au développement de l'étoposide débute en 1820 avec l'insertion de la podophylline à l'index américain des drogues pharmaceutiques, le *United States Pharmacopeia Drug Information*. Bien que les populations sud-américaines autochtones utilisaient depuis longtemps des extraits de plantes contenant de la podophylline pour guérir diverses maladies, il fallut attendre jusqu'en 1942 pour démontrer les effets anticancéreux de la podophylline. En fait, c'est plutôt un constituant présent dans les extraits résineux de la podophylline, la podophyllotoxine, qui semble posséder toutes les propriétés recherchées, y compris une forte cytotoxicité qui rend le composé inutilisable pour la pratique clinique [21]. Néanmoins, des modifications chimiques apportées à la molécule de la podophyllotoxine permirent, dans un premier temps, de synthétiser la molécule de teniposide et quelques années plus tard, la molécule d'étoposide. Bien que la structure des molécules soit très similaire, on peut noter les modifications chimiques qui les distinguent en étudiant le schéma 2. L'étoposide, aussi connu sous le nom de VP16, est un dérivé semi-synthétique de la podophyllotoxine qui a subi ses premiers essais cliniques en 1973. Il faudra attendre environ 10 ans avant que l'étoposide puisse être couramment utilisé contre différentes formes de cancer dont la leucémie et les cancers pulmonaires à petites cellules[21]. Récemment, une deuxième génération de composés dérivés a vu le jour soit le phosphate d'étoposide. L'ajout d'un groupe phosphate sur la molécule d'étoposide a permis d'améliorer la solubilité de la molécule et de raffiner ses propriétés physico-chimiques. Les phosphates d'étoposide améliorent grandement les problèmes techniques associés à la préparation et la formulation de l'étoposide dans un contexte clinique [22]. De plus, les phosphates d'étoposide sont rapidement convertis par les phosphatases endogènes en étoposides, et des analyses cliniques de phases I et II ont démontré qu'ils semblent posséder les mêmes propriétés antitumorales et pharmacocinétiques que l'étoposide classique [23, 24]. Finalement, en plus d'améliorer l'administration clinique de la drogue, cette nouvelle génération de composés dérivés semble induire des effets cytotoxiques secondaires moins sévères que ceux décrits pour l'étoposide classique. Évidemment, il reste à déterminer si les avantages observés se traduiront également par une amélioration de l'efficacité des traitements cliniques actuels. Si tel est le cas, les phosphates d'étoposide pourront peut-être rejoindre l'étoposide et le teniposide dans l'arsenal chimiothérapeutique actuel.



**Schéma 2: Structure moléculaire de l'étoposide et du teniposide.**

### 1.1.3.3 Mécanisme d'action de la camptothécine et de l'étoposide

Tel que mentionné précédemment, les agents chimiothérapeutiques utilisés dans cette étude ont été décrits pour inhiber les topoisomérases. Ces enzymes, qui existent aussi bien chez les organismes procaryotiques que chez les organismes supérieurs, constituent une machinerie moléculaire complexe dont le rôle est de modifier la structure de l'ADN. La forme en double hélice de l'ADN ainsi que la présence d'histones qui lui confèrent une structure extrêmement compacte rendent l'activité des topoisomérases essentielle pour la cellule. Celles-ci ont la capacité d'induire des cassures transitoires dans les brins de l'ADN, permettant ainsi un relâchement de la structure et une séparation temporaire des deux brins [25, 26, 27]. Les topoisomérases possèdent également une activité ligase leur conférant la capacité de réparer leurs propres lésions [28]. La fonction biologique des topoisomérases semble nécessaire pour le bon fonctionnement de certains processus cellulaires tels que la réplication de l'ADN, la recombinaison et le remodelage de la chromatine [29-31]. De plus, les topoisomérases favorisent l'activité transcriptionnelle puisque celles-ci rendent l'ADN plus accessible aux facteurs de transcription et aux autres protéines qui lient l'ADN [32, 33].

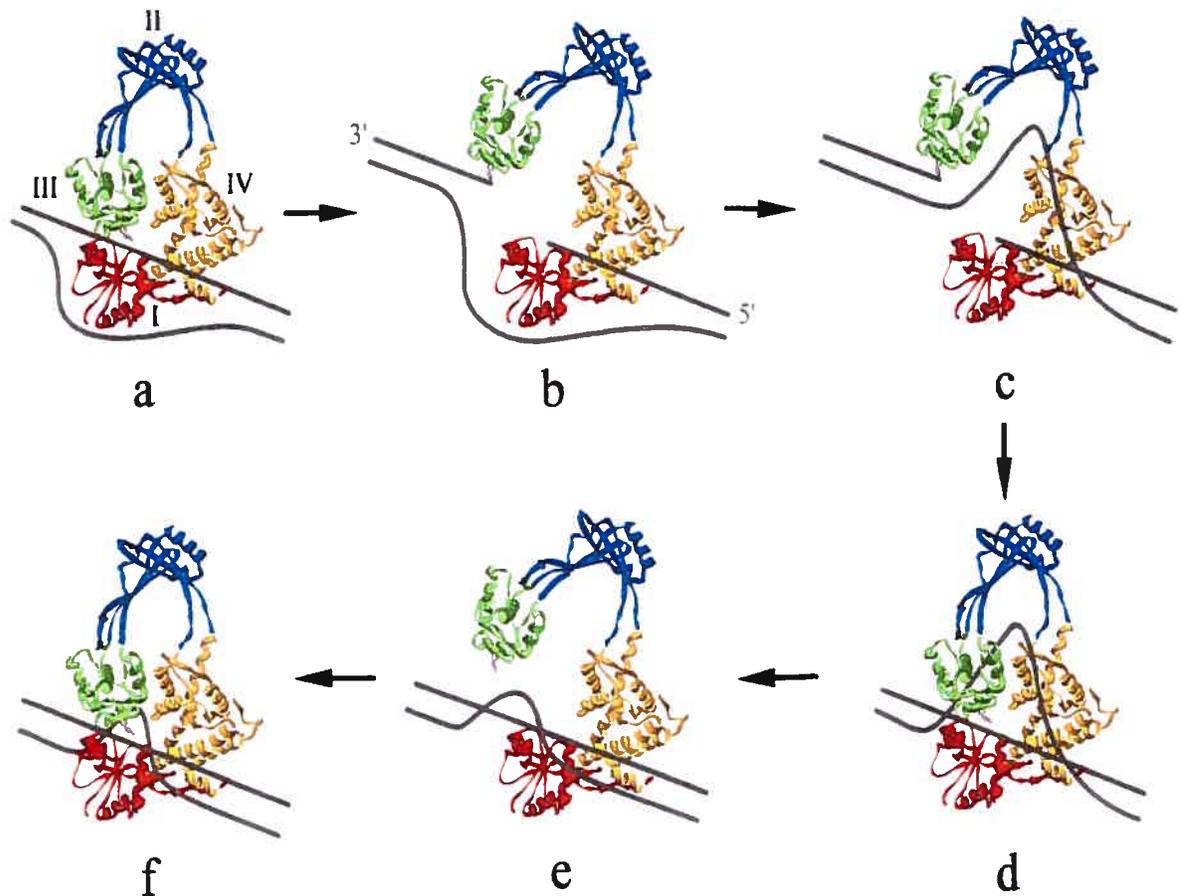
En se basant sur des considérations fonctionnelles et structurales de l'enzyme, on divise les topoisomérases humaines en trois grandes familles : les topoisomérases de type I, II et III. Chacune des familles possède deux isoformes,  $\alpha$  et  $\beta$ , mis à part les topoisomérases I qui existent sous une seule forme [25]. Pendant longtemps, la communauté scientifique croyait que la topoisomérase III existait uniquement chez les organismes inférieurs. Récemment, Goulaouic et ses collaborateurs ont réussi à purifier et à démontrer l'existence d'une forme humaine de la topoisomérase III [34]. À l'heure actuelle, nous disposons de très peu d'informations au sujet de sa fonction biologique. Il semblerait que l'expression de l'enzyme varie selon le cycle cellulaire et qu'elle peut interagir directement avec les hélicases [35, 36]. La topoisomérase III n'est pas essentielle pour la viabilité des cellules de drosophiles [37] et semble particulièrement active lors de l'embryogénèse des souris [38]. Il faudra patienter encore quelques années avant de pouvoir connaître le rôle biologique exact de cette nouvelle classe de topoisomérases humaines.

Particulièrement active lors de la phase S du cycle cellulaire, la topoisomérase I (TopI) coopère avec le déplacement de la fourche de réplication et est tout à fait indispensable

pendant la division cellulaire et lors du développement embryonnaire [39 , 40, 41]. Celle-ci peut lier préférentiellement l'ADN double brin et induire une cassure dans un seul des deux brins. Ensuite, l'interaction entre un résidu tyrosine de l'enzyme et l'extrémité 3' du brin d'ADN clivée induit la formation d'un pont phosphodiester. Par un mécanisme complexe, l'enzyme fait passer le brin intact au travers de la cassure, permettant un relâchement de la tension au niveau de la structure de l'ADN. Finalement, la TopI répare la cassure et se décroche de la matrice d'ADN[42]. Le mécanisme enzymatique est illustré en détail au schéma 3 [25].

Chez les organismes supérieurs, la Top II $\alpha$  est exprimée dans tous les types cellulaires et son rôle semble essentiel lors de la réplication de l'ADN. Par contre, le rôle de la Top II $\beta$  n'est pas essentiel pour la division cellulaire [43, 44] quoique les souris homozygotes avec une déficience au locus *TopII $\beta$*  meurent à la naissance avec des problèmes de développement au niveau du système nerveux [45]. Cette observation suggère que la Top II $\beta$  aurait un rôle spécifique au niveau des neurones lors du développement embryonnaire. Néanmoins, tout comme les TopI, les isoformes de la topoisomérase II se lient à l'ADN, via un résidu tyrosine de l'enzyme et les extrémités 5' du duplex d'ADN clivé. Cependant, contrairement à la TopI, la TopII induit une cassure dans les deux brins de l'ADN (DSB), permettant ainsi le passage d'un ADN double brin à travers la cassure. Cette réaction permet d'une part, un relâchement de la tension au niveau de la structure de l'ADN, et d'autre part, l'enchevêtrement et le désempeêtrement des chromosomes (Schéma 4) [25, 42 ].

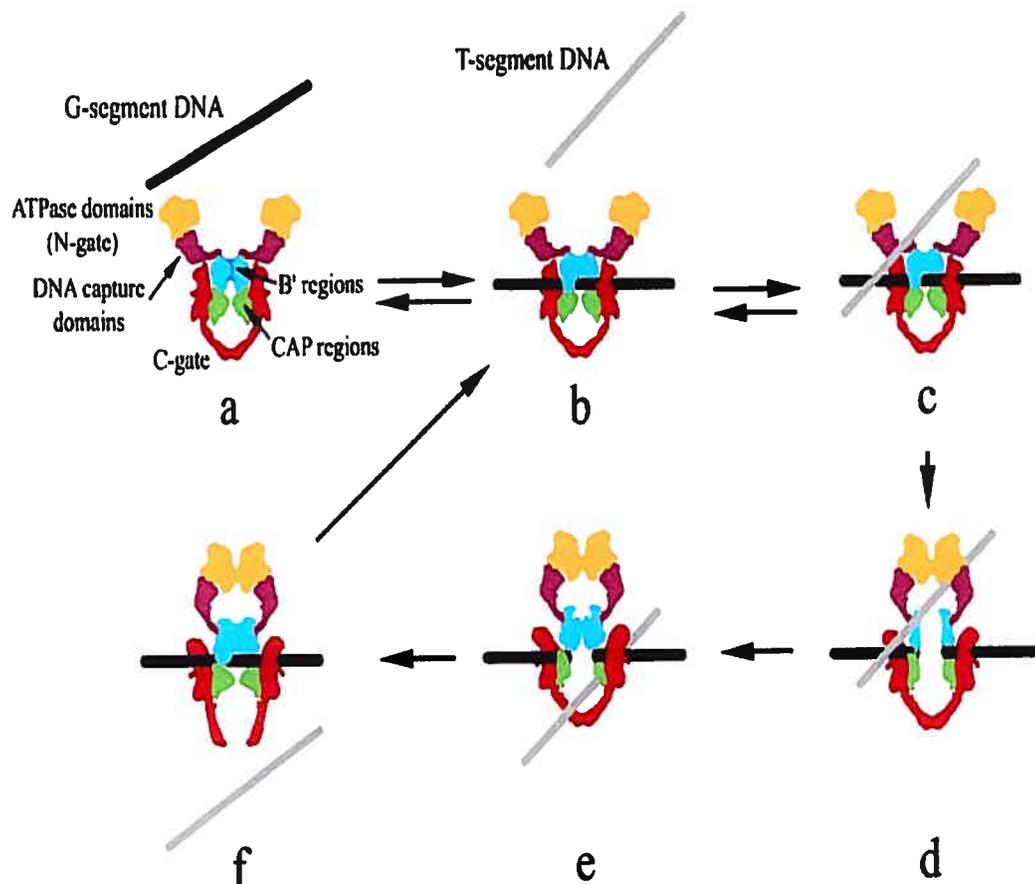
Efficace principalement contre les cellules en phase S du cycle cellulaire, la camptothécine est un composé qui inhibe spécifiquement la TopI et les lésions qu'elle induit au sein de l'ADN cellulaire semblent réversibles [46]. Néanmoins, l'utilisation de la camptothécine à de fortes concentrations permet de tuer les cellules qui se trouvent dans les autres phases du cycle cellulaire [47]. La camptothécine s'insère dans la cassure induite par la TopI et se lie à l'interface située entre l'ADN et l'enzyme, formant un complexe stable [48]. Ce complexe inhibe l'étape de ligation et empêche l'enzyme de réparer la lésion qu'elle a provoquée [49].



D'après Champoux (Annu Rev Biochem, 2001. 70: p.369-413)

**Schéma 3: Modèle pour le mécanisme d'action de la topoisomérase I de *E.coli*.**

Ce schéma illustre les étapes pour la relaxation de la structure de l'ADN. Les deux brins de l'ADN sont représentés par les lignes colorées en gris et les quatre domaines de la topoisomérase I sont représentés par différentes couleurs. L'enzyme clive un simple brin de l'ADN et en se fixant aux deux extrémités de la cassure, elle fait le pont entre l'espace par lequel le brin intact passera. Suite au clivage, la Tyr319 se lie à l'extrémité 3' du brin de l'ADN clivé. Immédiatement après le clivage de l'ADN, le domaine III, qui est lié à l'extrémité 3' de l'ADN clivé, se dissocie du domaine I (étape b) créant un espace qui permettra au brin intact de passer au travers de cette cassure. Une fois que le brin a passé au travers de la cassure, la TopI adopte une conformation fermée et le brin clivé est réparé grâce à l'activité ligase de l'enzyme (étape d). L'enzyme doit adopter une seconde fois une conformation ouverte puis fermée pour compléter le cycle. Finalement, la TopI se dissocie de l'ADN. Il a été proposé que l'enzyme oscille entre la conformation fermée (étape a, d et f) et ouverte (étape b, c et e) permettant ainsi à l'enzyme d'avoir accès à l'ADN.



D'après Champoux (Annu Rev Biochem, 2001. 70: p.369-413)

**Schéma 4: Modèle pour le mécanisme d'action de la topoisomérase II $\alpha$  de *E.coli*.**

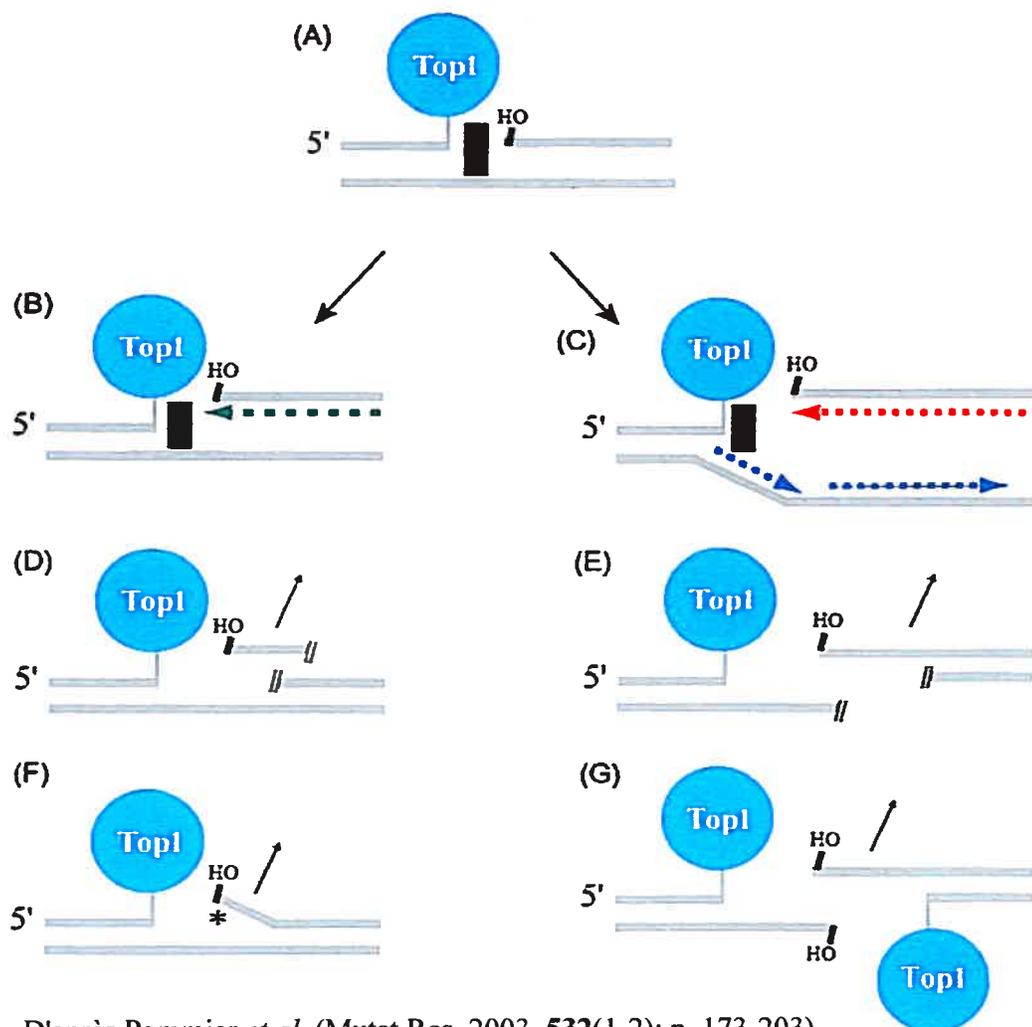
Ce schéma illustre les étapes pour la relaxation de la structure de l'ADN. Les deux brins de l'ADN sont représentés par les lignes colorées en gris pâle (segment T) et colorées en gris foncé (segment G). Les différents domaines de la topII $\alpha$  sont représentés par différentes couleurs. Après s'être lié au segment G de l'ADN, l'enzyme subit un changement de conformation qui amorcera un cycle d'oscillation entre la conformation ouverte (étape a-c) et fermée (d-f) pour le domaine ATPase (N-gate). Après liaison de l'ATP, le segment T de l'ADN est piégé par le domaine de capture de l'enzyme (étape c et d). Par la suite, un changement de conformation de l'enzyme vers son état fermé permet le clivage du segment G (étape d). Le segment T est transporté au travers de l'espace créé par la brisure au sein du segment G (étapes d et e). Finalement, un dernier changement de conformation de la TopII facilitera le relâchement du segment T, et réparation de la cassure.

Tel que mentionné précédemment, la TopI est une enzyme qui induit des dommages dans un seul des brins de l'ADN et par conséquent, ce type de lésions est insuffisant pour induire un signal apoptotique et entraîner la mort de la cellule cancéreuse.

Le modèle de collision avec la fourche de réplication décrit par Hsiang et Tsao, représente le principal mécanisme moléculaire retenu jusqu'à ce jour pour expliquer la cytotoxicité liée à la camptothécine [50, 51]. Tel qu'illustré au schéma 5, ce modèle propose que pendant la réplication de l'ADN, lors de son déplacement, la fourche de réplication entrerait en collision avec le complexe stable TopI-CPT-ADN [52]. Cette collision induirait des cassures DSB et provoquerait un arrêt irréversible de la fourche de réplication. Il a été démontré chez la levure que la présence des cassures DSB induites par la camptothécine était létale [53]. De plus, ce type de lésions a été décrit pour induire la mort cellulaire par apoptose [54, 55].

D'autres mécanismes secondaires ont été décrits pour jouer un rôle dans la cytotoxicité générée par la camptothécine. Par exemple, un effet biologique important associé à la camptothécine est l'arrêt de la synthèse de l'ARN qui se produit pendant la transcription, lors de l'étape d'élongation. Cet événement favoriserait l'accumulation de complexes d'élongation d'ARN polymérase à l'extrémité 5' de l'ADN transcrit [56, 57]. Le modèle suivant a été proposé : la collision entre les complexes d'ARN polymérase et le complexe stable TopI-CPT-ADN conduirait à l'arrêt de la synthèse de l'ARN, permettant la conversion des lésions réversibles induites par la camptothécine en cassures simple brin irréversibles. De plus, une petite fraction des lésions est également convertie en cassure doubles brins irréversibles [58]. Toutefois, ce mécanisme se produit uniquement dans la situation où le complexe stable TopI-CPT-ADN est initié sur le brin d'ADN qui sert de matrice pour la transcription [58].

En plus d'induire la mort par apoptose, la camptothécine a la capacité de générer d'autres types de réponses dans la cellule, telles qu'un arrêt du cycle cellulaire en phase S ou G2, une stabilisation de p53, l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et la phosphorylation des protéines Chk1 et RPA [59, 60, 61-64]. De plus, de récentes études suggèrent que la camptothécine favoriserait la dégradation de la TopI en activant les voies de signalisation associées à l'ubiquitine et au protéosome 26S [65, 66]. La dégradation de la



D'après Pommier *et al.* (Mutat Res, 2003. 532(1-2): p. 173-203)

### Schéma 5 : Modèle pour le mécanisme d'action de la camptothécine.

**A)** Représentation du complexe stable TopI-CPT-DNA (la CPT est représenté par le rectangle noir). La TopI est liée à l'extrémité 3' de l'ADN clivé. L'extrémité 5' est caractérisée par la présence d'un résidu hydroxyl (OH). La CPT piège la TopI formant un complexe stable. A cette étape, les lésions engendrées sont encore réversibles. **B)** La conversion du complexe stable en une lésion irréversible s'effectue par l'intermédiaire d'une collision avec le complexe de transcription (l'ARN est montré en vert). **C)** La conversion du complexe stable en lésions de type DSB par l'intermédiaire de la collision du complexe avec la fourche de réplication (selon l'orientation du brin de l'ADN, la réplication est illustrée par la couleur rouge ou bleue). **D et E)** La formation de complexes suicides par la présence de brisures de type SSB sur le même brin que la TopI (**D**) ou sur le brin opposé (**E**). **F)** Conversion du complexe stable en lésion irréversible induite par la présence de bases oxydées, d'erreurs d'appariement des bases, d'un site abasique à l'extrémité 5' de la brisure. **G)** Formation de cassure de type DSB causée par la présence de deux TopI situées sur les deux brins.

TopI par la camptothécine pourrait être également médiée par l'arrêt de la synthèse de l'ARN et par la collision entre les complexes d'ARN polymérase et le complexe stable TopI-CPT-ADN qui en résulte. Cette collision induirait la multiubiquitination de la TopI et favoriserait sa dégradation [67]. La dégradation de la TopI favoriserait l'activation des mécanismes de réparation associés à la transcription tels que le complexe TCR et l'activation de l'enzyme de réparation TDP1, dont le rôle est d'éliminer les résidus peptidiques restés accrochés à l'ADN suite à la dégradation de la Top1 [68]. En d'autres termes, c'est en favorisant la dégradation de la TopI que la camptothécine active indirectement la machinerie moléculaire impliquée dans la réparation de l'ADN.

Comme toutes les podophyllines, l'étoposide utilisé à de très fortes concentrations tue les cellules en inhibant l'assemblage des microtubules. Néanmoins, aux concentrations utilisés *in vivo*, l'étoposide induit des cassures doubles brins dans l'ADN [69]. L'étoposide, qui est un inhibiteur de la TopII, fonctionne sensiblement de la même façon que le mécanisme d'action décrit pour la camptothécine. Le composé s'insère dans les cassures doubles brins induites par la TopII, forme un complexe stable avec l'ADN et l'enzyme, et empêche la TopII de réparer ses propres lésions. Les lésions sont réversibles puisque le retrait de la drogue permet la réparation des lésions [70]. C'est donc l'accumulation des complexes stables TopII-VP16-ADN et des lésions qui en découlent qui induisent la mort de la cellule. On croit que le potentiel de létalité associé à l'étoposide augmente dramatiquement si les hélicases ou les complexes de réplication tentent de traverser les liens covalents qui lient la topoisomérase à l'ADN. Ces événements convertissent les lésions en lésions permanentes qui peuvent se traduire par l'apparition de larges délétions, d'insertions et autres aberrations génétiques classiques [70]. Certaines études ont rapporté que la présence de certains inhibiteurs de la topoisomérase II, tels que l'étoposide, affecterait l'activité de la télomérase et/ou induirait directement des dommages aux télomères, conduisant à un dysfonctionnement de ceux-ci [71, 72]. Au contraire, certaines évidences expérimentales ont suggéré que l'étoposide activerait la télomérase, induisant une réponse antiapoptotique dans la cellule [73] alors que d'autres études suggèrent que la réponse cellulaire changerait en fonction de la concentration de la drogue utilisée [612]. Finalement, certains chercheurs croient que les télomères et l'activité de la télomérase ne semblent pas représenter un signal majeur dans la réponse cellulaire induite par l'étoposide [74, 75].

Comme c'est le cas avec la majorité des agents chimiothérapeutiques, l'étoposide induit chez la cellule une réponse cellulaire complexe, qui implique entre autres un arrêt du cycle cellulaire en G2 et l'activation de la machinerie moléculaire impliquées dans la réparation de l'ADN [76]. Lorsque les lésions atteignent un niveau suffisamment important, la cellule meurt par apoptose [77, 78].

#### **1.1.4 Types de réponses cellulaires induites par la chimiothérapie**

Suite à un traitement avec la camptothécine, l'étoposide ou tout autre agent chimiothérapeutique connu pour induire des dommages à l'ADN, la réponse cellulaire qui est générée est extrêmement complexe et diversifiée. Au cours de cette section, nous présenterons un survol rapide des différents types de réponses cellulaires et dans les sections suivantes, nous traiterons plus en détails les voies de signalisation étudiées dans le cadre de cette thèse.

Suite à l'apparition de lésions au sein de leur génome, les organismes unicellulaires activent les points de contrôle du cycle cellulaire ainsi que les mécanismes de réparation. Une option supplémentaire s'offre aux organismes pluricellulaires: l'élimination de la cellule endommagée par nécrose ou par apoptose (schéma 6). Un concept, qui est généralement accepté et qui est vrai dans bien des cas, est l'idée qu'une cellule qui a un système de réparation défectueux ou qui subit des lésions trop importantes au niveau de son génome, augmente considérablement ses chances de développer un phénotype tumoral. Afin d'éviter la propension de cette cellule à proliférer et possiblement de développer un cancer, celle-ci se suicidera par l'intermédiaire de son programme apoptotique. Pourtant, certains types de cellules, dont les fibroblastes, peuvent subir des dommages très importants et survivre sans pour autant développer un phénotype tumoral. Ces cellules peuvent maintenir un arrêt prolongé de leur cycle cellulaire en G1 ou G2 [79, 80]. De ce point de vue, la menace de la prolifération de cellules potentiellement cancéreuses est écartée sans avoir eu recours à l'apoptose. La notion qu'un défaut dans le programme apoptotique et l'inhibition du processus engendrent nécessairement un phénotype de prolifération est une grossière simplification de la réalité, comme l'a démontré l'exemple des fibroblastes. Néanmoins, il n'y a aucun doute que la perte des éléments de régulation proapoptotique dans la cellule et/ou la surexpression de protéines antiapoptotiques favorisant la survie de la cellule contribuent significativement à la résistance des cellules cancéreuses contre l'action des

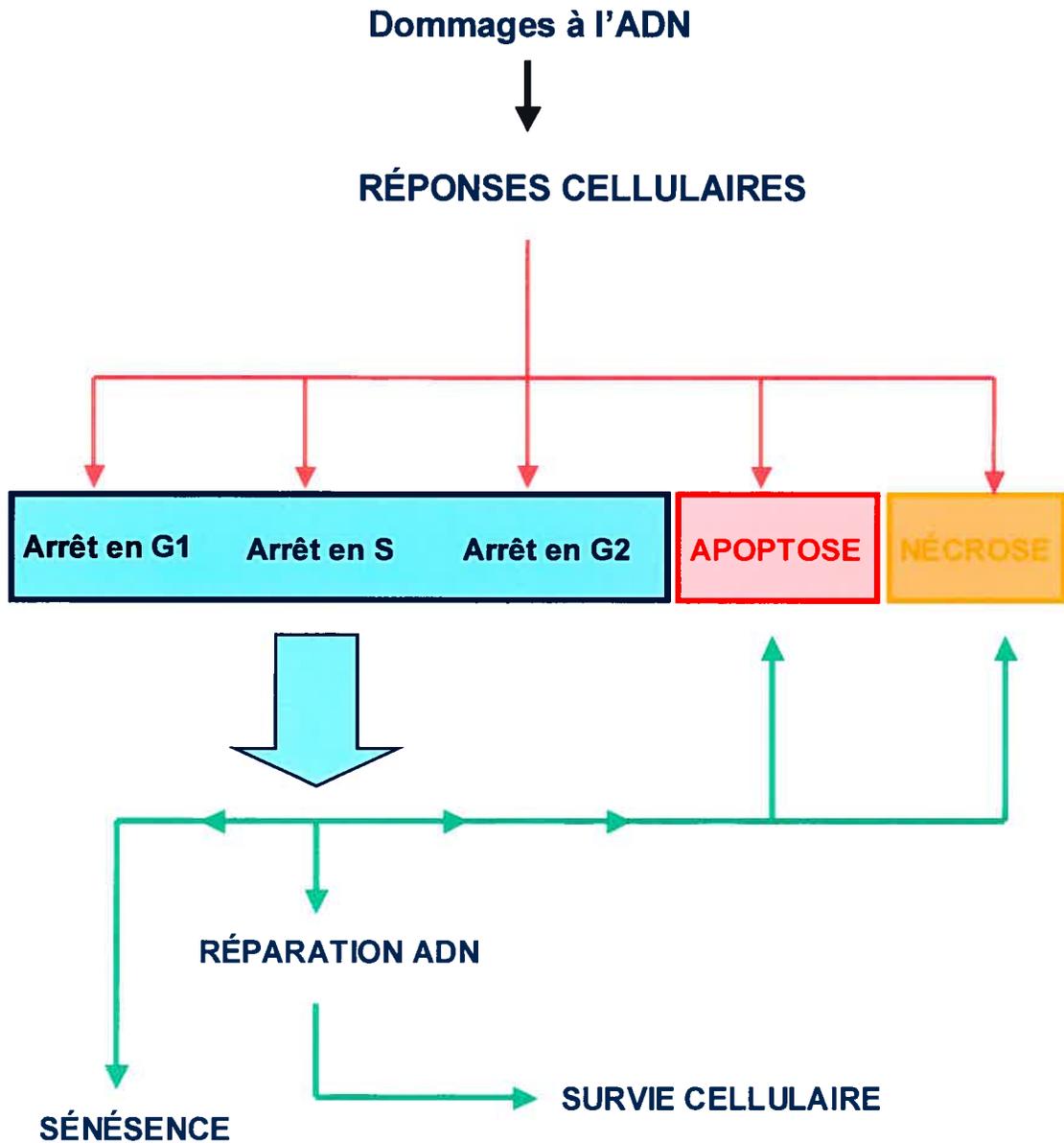


Schéma 6: Type de réponses cellulaires induites par des dommages à l'ADN

agents chimiothérapeutiques [81, 82]. De plus, l'efficacité des mécanismes de réparation est très certainement un avantage pour une cellule normale ayant subi des lésions génomiques, mais peut représenter un élément fâcheux dans un contexte de chimiothérapie.

Effectivement, une cellule tumorale qui répare efficacement les lésions qu'elle a subies évitera la mort par apoptose et continuera de proliférer. D'ailleurs, certaines lignées tumorales résistantes à l'action des agents anticancéreux démontrent une activité accrue de leurs mécanismes de réparation par comparaison à une lignée sensible [83, 84]. Par conséquent, il existe une relation directe entre la capacité, pour un agent anticancéreux d'induire l'apoptose et l'efficacité des mécanismes de réparation des cellules tumorales traitées.

La première étape suivant l'induction de dommages à l'ADN est l'activation de complexes senseurs, dont le rôle est de reconnaître la présence et le type de lésions. Ces senseurs sont normalement couplés à des constituants effecteurs capables de médier différentes réponses telles l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation des différents mécanismes de réparation et la mort par apoptose. Les kinases ATM et ATR qui sont apparentées à la famille des PI3-kinases, sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes étudiées jusqu'à ce jour, sauf dans certains types tumeurs tel que discuté à la section 1.3.3. ATM et ATR agissent comme effecteur central dans la signalisation du dommage [85]. ATM est particulièrement sensible aux cassures doubles brins et phosphoryle de nombreuses cibles, notamment les kinases Chk1 et Chk2 qui induisent un arrêt du cycle cellulaire en agissant sur les points de contrôle appartenant aux phases S et G2 [86]. De plus, ATM intervient directement dans les mécanismes de réparation de l'ADN endommagé et est capable d'induire l'apoptose dans la cellule. Pour connaître le détail des voies de signalisation employées par ATM, se référer à la section 1.4.3.1.

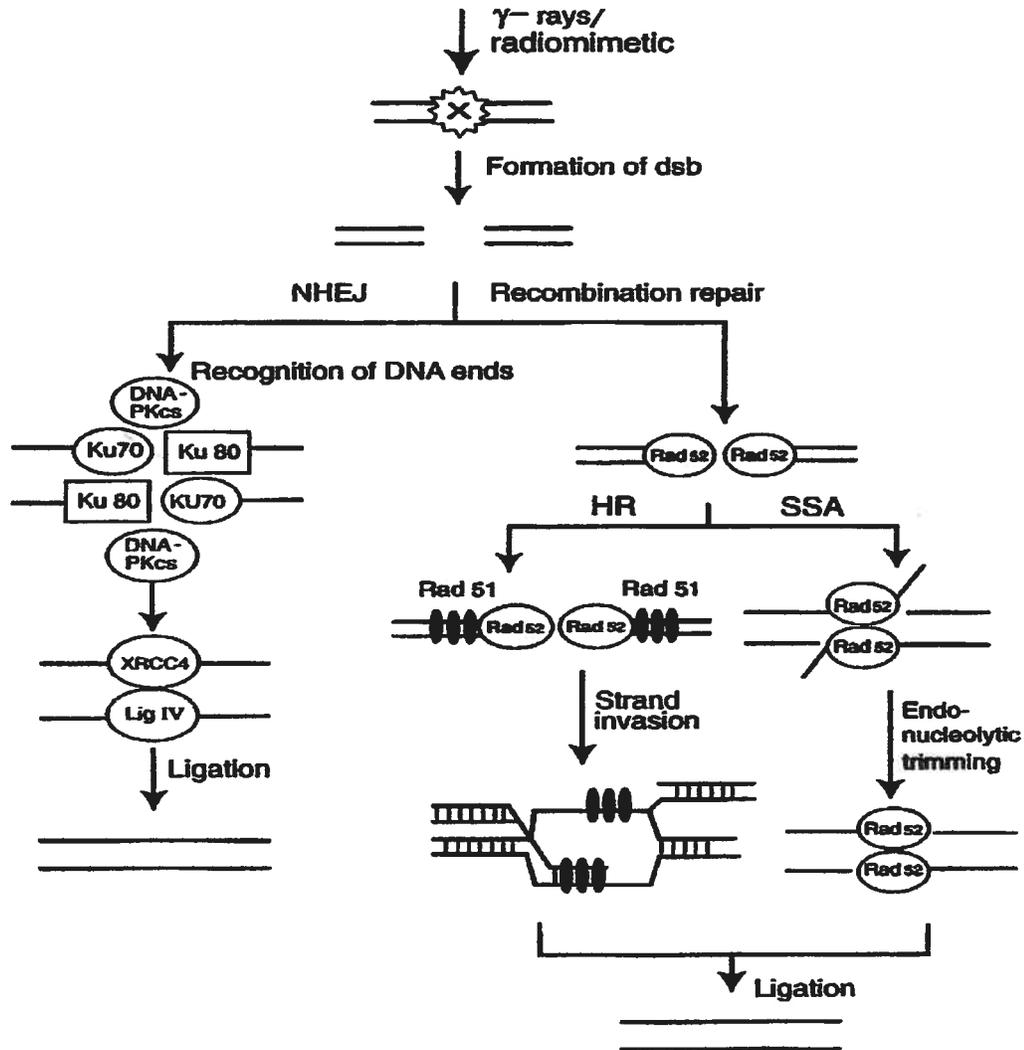
Suivant l'arrêt du cycle cellulaire et dans le but de circonscrire les dommages présents dans son génome, la cellule active différents mécanismes moléculaires de réparation. Trois mécanismes principaux s'offrent à la cellule pour tenter de réparer les lésions de type DSB générées par les traitements à la camptothécine et à l'étoposide : la recombinaison homologue (HR), le *single-strand annealing* (SSA) et le *nonhomologous end-joining* (NHEJ) (schéma 7) [87].

La protéine Rad51 initie la HR qui se caractérise par une étape d'appariement avec des séquences homologues situées sur une autre molécule d'ADN et un échange d'information génétique entre cette région et la cassure à réparer. Différentes protéines agissent de concert avec RAD51 lors du processus de réparation. Par exemple, les protéines RAD52 et RPA peuvent coopérer avec RAD51 et améliorer l'efficacité de la recombinaison [88, 89]. La protéine RAD54 est une ATPase présente dans le complexe Swi/Snf qui favorise l'appariement des séquences homologues médiées par RAD51 [90, 91]. Chez la levure, les hétérodimères Rad55/57 participent à la recombinaison en collaborant avec RAD51. Leurs équivalents humains, soit les protéines XRCC2 et XRCC3, collaborent également au processus de réparation et on suppose qu'ils agissent comme homologue fonctionnel des protéines de levure [92, 93]. Les protéines BRCA1 et BRCA2 décrites comme des supresseurs de tumeurs, jouent également un rôle important dans la réparation des cassures DSB. Elles peuvent former un complexe en se liant directement avec RAD51 et agiraient comme éléments intermédiaires entre les facteurs qui reconnaissent les dommages et la machinerie de réparation [94, 95].

Tout comme la HR, le SSA est un processus similaire qui implique le colmatage de la cassure DSB en utilisant l'information génétique située sur une région homologue de la molécule d'ADN. Cependant, ce mécanisme de réparation se distingue de la HR par certains détails. Contrairement à la HR, le SSA ne permet pas l'invasion de la cassure par le brin d'ADN homologue. Cependant, il implique le clivage de l'ADN endommagé afin de générer une molécule d'ADN simple brin et par la suite, de courtes séquences d'ADN complémentaires sont hybridées. Les séquences, qui ne sont pas utilisées, sont coupées par des endonucléases tels que XPF-ERCC1 et le tout se termine par une étape de ligation [87]. Contrairement à RAD51 qui ne semble pas essentiel pour ce mécanisme de réparation, la protéine RAD52 est un effecteur central du SSA en liant l'ADN au site endommagé et en favorisant l'hybridation des séquences homologues [96]. Les complexes de réparation constitués de protéines telles que RAD50, MRE11 et NBS1 sont impliqués dans le clivage de l'ADN endommagé et la production de la molécule d'ADN simple brin [97].

Contrairement aux mécanismes précédents, le NHEJ est un mécanisme de réparation unique aux eucaryotes qui permet d'unir les extrémités de la brisure DSB avec des séquences d'ADN qui ne possèdent aucune homologie. Tel qu'illustré au schéma 7, les protéines Ku70, Ku80 et la sous-unité catalytique des DNA-PK s'associent sous forme de

## DNA double-strand break repair



D'après Norbury *et al.* (Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. 41: p. 367-401.)

### Schéma 7: Représentation des 3 voies de signalisation impliquées dans la réparation des cassures double brins

Les cassures doubles brins générées par les agents chimiothérapeutiques et autres stress génotoxiques sont réparées par le mécanisme de '*nonhomologous end-joining*' (NHEJ) (gauche) ou par les mécanismes de recombinaison (droite). Pour le NHEJ, les complexes Ku recrutent les DNA-PKcs et le complexe XRCC4/ligase IV afin d'effectuer la réparation. Pour la recombinaison homologue, Rad52 recrute Rad51 afin de promouvoir l'invasion du brin de l'ADN d'un chromosome homologue. Le '*single-strand annealing*' (SSA) implique un mécanisme similaire mais précédant l'étape de ligation, de courtes séquences d'ADN complémentaires sont hybridées. Les séquences qui ne sont pas utilisées sont coupées par des endonucléases tels que XPF-ERCC1.

complexes dont le principal rôle est de reconnaître les brisures DSB et de lier l'ADN endommagé [87, 98, 99]. Le complexe hétérodimérique XRCC4-ligase IV est recruté par le complexe Ku et colmate la cassure par une réaction de ligation [100]. Finalement, si la cellule est incapable de réparer ces lésions par l'un ou l'autre de ces mécanismes, celle-ci mourra soit par nécrose ou par apoptose.

Depuis l'introduction des agents chimiothérapeutiques dans la pratique clinique courante, les chercheurs ont toujours cherché à comprendre de quelle façon ces agents tuaient les cellules cancéreuses sans pour autant obtenir de réponses satisfaisantes. Depuis une quinzaine d'années, les scientifiques ont réalisé une percée majeure au niveau de la compréhension des différents modes de mort cellulaire. Le raffinement des processus moléculaires impliqués fit naître une foule de nouveaux concepts et a permis de comprendre, du moins en partie, certains des mécanismes moléculaires associés à ces drogues. Aujourd'hui, il apparaît évident que tous les agents chimiothérapeutiques qui endommagent l'ADN activent souvent le même programme de mort cellulaire qu'est l'apoptose [101, 102]. À titre d'exemple, il a été démontré que les cellules leucémiques HL-60 traitées à la camptothécine ou à l'étoposide mourraient par apoptose [60, 103, 104, 105]. Ces agents activent la voie mitochondriale de l'apoptose et sont capables d'activer certaines des caspases, protéines effectrices essentielles pour le déclenchement de l'apoptose. Néanmoins, bien que les progrès réalisés furent capitaux et que nous connaissions maintenant certaines constantes de l'équation, aujourd'hui encore nous ignorons précisément l'identité des effecteurs impliqués dans la transmission du signal à partir de la chromatine endommagée vers le déclenchement de l'apoptose cellulaire. Dans le cadre de cette thèse, nous avons tenté d'identifier ces effecteurs dans le contexte de notre modèle expérimental. Ainsi, les prochaines sections traiteront uniquement des voies de signalisation que nous avons étudiées dans ce contexte.

## 1.2 LA SIGNALISATION CELLULAIRE IMPLIQUÉE DANS L'APOPTOSE

### 1.2.1 L'apoptose et ses principaux éléments régulateurs

L'apoptose est un processus biologique essentiel pour les organismes pluricellulaires et se définit comme un phénomène génétiquement programmé qui, une fois activé, conduit au suicide de la cellule. De cette façon, l'organisme peut éliminer toutes les cellules indésirables ou potentiellement dangereuses. L'apoptose joue un rôle clé, lors du développement, en sculptant certains organes et en définissant l'architecture tissulaire, de même qu'elle élimine les neurones indésirables du système nerveux lors de l'embryogénèse. Elle permet également de maintenir l'homéostasie de l'organisme en éliminant, par exemple, les cellules du système immunitaire qui sont produites en excès. L'apoptose agit comme un important mécanisme de défense contre les infections virales, bactériennes et parasitaires en éliminant les cellules infectées, limitant ainsi la propagation de l'infection. En tuant les cellules qui ont subi des mutations importantes dans leur génome, l'apoptose protège également l'organisme contre une prolifération incontrôlée de ces cellules potentiellement cancéreuses. Conséquemment, une dérégulation du processus apoptotique facilite le développement de certaines maladies. Par exemple, dans une situation où l'élimination des cellules par apoptose serait trop sévère, cela pourrait donner naissance à des maladies d'ordre neurodégénérative telles que l'Alzheimer, le Parkinson et la maladie d'Huntington et pourrait aussi favoriser le développement du SIDA en éliminant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. À l'inverse, l'inhibition de l'apoptose pourrait entraîner des malformations au niveau du développement embryonnaire, l'apparition du cancer ou de certaines maladies auto-immunes et faciliterait la propagation des infections au sein de l'organisme [106-109].

L'apoptose se caractérise par des altérations morphologiques spécifiques qui ont été initialement décrites par Kerr et ses collaborateurs [110]: la membrane boursoufle ("*blebbing*"), on observe une réduction importante du cytoplasme, la chromatine se condense et certaines endonucléases spécifiques induisent la fragmentation du génome en clivant les séquences internucléosomales de l'ADN. La fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose prend la forme d'une échelle caractéristique lorsqu'elle est visualisée après migration par électrophorèse sur gel d'agarose. Contrairement à la nécrose, qui implique l'éclatement de la cellule et le déversement du contenu intracellulaire dans le milieu

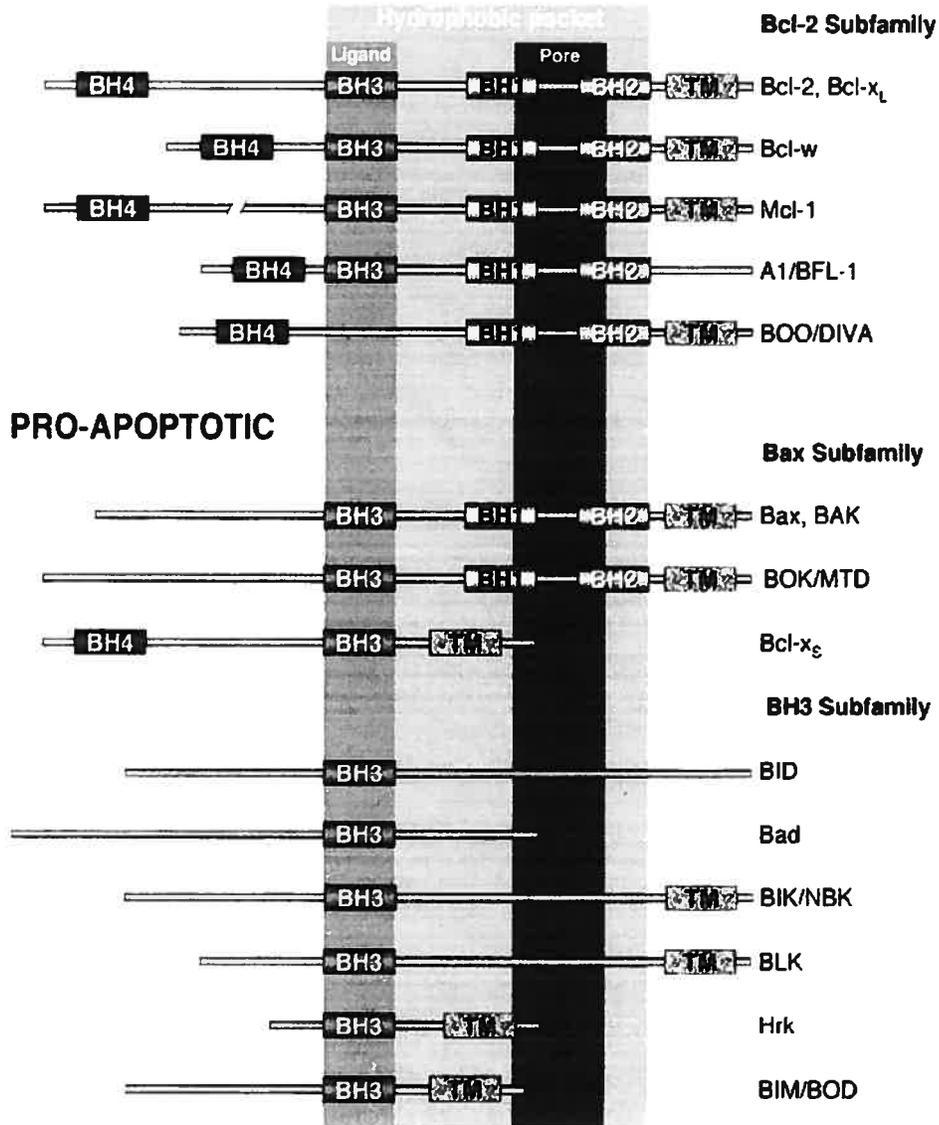
généralant une réponse inflammatoire importante, la membrane plasmique et les organelles des cellules apoptotiques conservent leur intégrité pour une longue période. Ensuite, la cellule se désintègre sous forme de corps denses, appelés corps apoptotiques, qui seront tout simplement phagocytés par les cellules voisines [111, 112]. Entre l'apoptose et la nécrose, il existerait des formes intermédiaires de la mort cellulaire comme par exemple des nécroses post-apoptotiques qui seraient déclenchées dans les cas de défaillance du processus apoptotique [112, 113, 114].

Les événements apoptotiques sont orchestrés par une multitude de protéines qui agissent comme points de contrôle positifs ou négatifs sur le processus. Les membres de la famille Bcl-2 ainsi que les protéines SODD, FLIP et les différents IAPs agissent comme des éléments régulateurs alors que les caspases sont plutôt considérées comme les exécuteurs de l'apoptose. C'est en clivant spécifiquement leurs substrats que les caspases permettent le démantèlement de la cellule et le déclenchement de l'apoptose [115]. Néanmoins, malgré leur grande importance dans l'induction de l'apoptose, nous savons aujourd'hui que le processus peut tout de même se produire indépendamment des caspases [116-118]. Au milieu des années 90, plusieurs équipes dont celles de Kroemer, Wang et Newmeyer allaient bouleverser les connaissances sur l'apoptose en démontrant l'importance de la mitochondrie dans l'induction du phénomène [119-124]. Aujourd'hui, on reconnaît que la voie mitochondriale de l'apoptose, aussi appelée la voie intrinsèque, joue un rôle central dans le déclenchement du processus. La voie extrinsèque est une seconde voie de signalisation qui conduit à l'apoptose et est généralement associée à l'activation des récepteurs de la mort cellulaire (RMC). Bien que ces deux voies puissent agir de façon indépendante, elles fonctionnent très souvent de concert afin d'amplifier le signal apoptotique dans la cellule. Récemment, des évidences expérimentales ont suggéré l'existence d'une troisième voie de signalisation qui serait associée au réticulum endoplasmique et qui serait régulée par Bax, Bak et Bik, des protéines qui contrôlent aussi la voie mitochondriale de l'apoptose [125-127]. Bien que cela reste à être démontré, pour certains scientifiques, l'importance de cette voie dans le déclenchement de l'apoptose est aussi cruciale que la voie mitochondriale.

### 1.2.1.1 La famille des Bcl-2

Les membres qui composent la famille des Bcl-2 opèrent comme point de contrôle à différentes étapes de la signalisation apoptotique et leur principale fonction se résume à engager ou à freiner le processus apoptotique. Le membre fondateur de cette famille, l'oncogène Bcl-2, a été initialement identifié lors de la translocation chromosomique t(14:18) impliquée dans les lymphomes B humains [128, 129]. Actuellement, plus d'une quarantaine de protéines appartenant à cette famille ont été identifiées et, tel que présenté au schéma 8 [130], dépendamment de leur fonction biologique, elles sont regroupées principalement sous deux familles : les proapoptotiques et les antiapoptotiques. Bien qu'elles possèdent une faible homologie au niveau de l'ensemble de leur séquence d'acides aminés, ces protéines possèdent tout de même quatre régions distinctes avec une forte homologie, communément appelées domaine BH. Les domaines BH sont responsables des interactions protéiques qui permettent aux différents membres d'interagir entre eux, afin de former des homodimères ou des hétérodimères [131, 132]. Dépendamment du type d'association protéique, les complexes formés fonctionneront comme des agonistes ou des antagonistes de l'apoptose. Contrairement aux domaines BH3 et BH4 qui confèrent les propriétés proapoptotiques ou antiapoptotiques de la protéine, les domaines BH1 et BH2 ont pour unique fonction de permettre les interactions protéiques entre les différents membres de la famille et existent aussi bien chez les Bcl-2 antiapoptotiques que proapoptotiques. Par exemple, les domaines BH1 et BH2 présents dans les protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> sont requis pour qu'elles puissent interagir avec Bax ou Bak et inhiber la fonction apoptotique de ces protéines [133, 134]. Par ailleurs, le domaine BH4 présent chez Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> est responsable en partie de la fonction antiapoptotique de ces protéines [135, 136]. En fait, mis à part la protéine proapoptotique Bcl-X<sub>s</sub> qui possède aussi ce type de domaine, le domaine BH4 existe uniquement chez les membres antiapoptotiques de la famille [137]. De plus, la présence du domaine BH3 semble essentielle pour la fonction apoptotique des protéines appartenant à la sous-famille des Bcl2 proapoptotiques [138]. D'ailleurs, la transposition du domaine BH3 au sein d'une protéine antiapoptotique telle que Bcl-2 est suffisante pour convertir Bcl-2 en protéine proapoptotique [139]. Certaines protéines, appartenant à la famille des Bcl-2 proapoptotiques tels que Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa, Puma/Bbc3 et Hrk, ne possèdent pas de domaines BH1 et BH2, sont uniquement affectées d'un ou deux domaines BH3 et sont communément appelées les protéines BH3-unique. Ces protéines conservent leur capacité

## ANTI-APOPTOTIC



D'après Almawi *et al.* (J Leukoc Biol, 2004. 76(1): p. 7-14.)

Schéma 8: Représentation des membres de la famille des Bcl-2

de se complexer avec les autres membres de la famille Bcl-2 de par leur domaine BH3 qui se lie aux domaines BH1 et BH2 de ses partenaires [140, 141]. Les protéines BH3-unique peuvent être divisés en deux sous-catégories : les BH3-unique activateurs dont la fonction est de se lier et d'activer les proapoptotiques tels que Bax et Bak, et les BH3-unique sensibilisateurs dont la fonction est de se lier et d'inhiber les antiapoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> [142, 143].

### 1.2.1.2 La famille des caspases

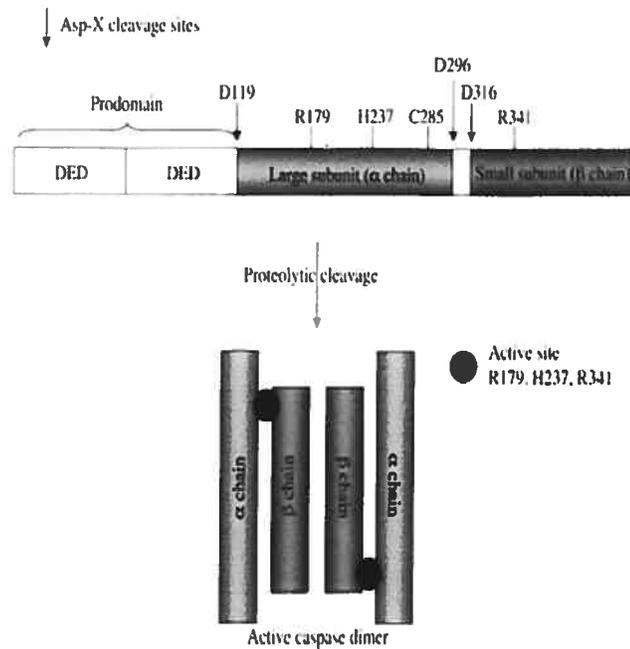
Les caspases sont des enzymes qui se sont très bien conservées au cours de l'évolution. Cette famille de cystéine protéases démontre une affinité spécifique pour ses substrats en clivant invariablement les protéines après un résidu aspartate, permettant ainsi l'inhibition, l'activation ou le désassemblage de la protéine ciblée. À ce jour, plus de 200 substrats de caspases ont été identifiés et c'est définitivement l'ensemble de ces protéines clivées qui conduisent au démantèlement de la cellule et au déclenchement de l'apoptose [115, 144]. Il existe 14 caspases distinctes chez les mammifères (11 chez l'humain) qu'on peut regrouper en sous-familles en se basant sur certains critères tels que leur fonction *in vivo* [145], la composition de leur domaine [146] ou encore selon la spécificité de leur substrat [147].

La première grande famille est composée des caspases-1,-4,-5,-11,-12,-13 et -14, et mis à part la caspase-12 qui semble jouer un rôle dans l'apoptose dépendante du réticulum endoplasmique chez la souris, les autres caspases de cette famille sont plutôt associées aux fonctions inflammatoires de la cellule contrairement à la seconde famille constituée des caspases-2,-3,-6,-7,-8,-9,-10 qui participent activement dans l'apoptose cellulaire [126, 145]. Ceci dit, on peut également diviser cette deuxième famille en sous-groupes de caspases. Le premier est composé des caspases initiatrices, soit les caspases-2,-8,-9 et -10. Ce type de caspases se caractérise par la présence d'un long prodomaine, comprenant des domaines de type CARD ou de type DED, qui est responsable des interactions protéine-protéine existant entre les complexes d'initiation de l'apoptose et les caspases initiatrices. Le deuxième est constitué des caspases effectrices telles que les caspases-3,-6 et -7 et ne comportent qu'un court prodomaine [148, 149] (schéma 9).

A)

Domain organization type	Human	Drosophila
Long prodomain (DED, CARD), apoptotic initiator type	Caspases 2, 8, 9, 10	Dronc, Dredd
Short prodomain, apoptotic effector type	Caspases 3, 6, 7	Decp1, Dricc, Decay, Damm
Long prodomain (CARD), cytokine activator type	Caspases 1, 4, 5	
Others	Caspase 14	Strica

B)



D'après Donepudi *et al.* (Biophysical Chemistry, 2002. 101–102 : p. 145–153.)

### Schéma 9: Représentation des membres de la famille des caspases

A) Sous-famille de caspases regroupées en fonction de leurs structures et de leurs fonctions biologiques. B) Mécanisme général d'activation des caspases en prenant comme modèle la caspase-8.

Les caspases sont synthétisées dans la cellule sous forme de précurseurs inactifs (procaspases) et s'activent d'elles-mêmes ou entre elles par l'intermédiaire de leur clivage protéolytique à deux sites distincts, produisant une longue et une courte sous-unité. Sous leur forme active, chaque caspase s'associe avec deux hétérodimères formés à partir des deux sous-unités, formant ainsi une structure tétramérique. Ainsi, chaque caspase sous sa forme active est dérivée du clivage de deux procaspases (schéma 9) [150, 151]. De par leur activation, les caspases initiatrices intègrent les signaux issus de différents stimuli et constituent un point de contrôle important pour la cellule puisqu'elles lui permettent d'amorcer le programme de mort cellulaire. Le processus apoptotique est encore réversible à cette étape et ce point de contrôle implique également une régulation négative de l'activité caspase. Par conséquent, l'inhibition des caspases initiatrices par des inhibiteurs endogènes présents dans le cytoplasme, permet de bloquer l'apoptose dans la cellule. Néanmoins, une fois activée, les caspases initiatrices transmettent le signal de mort à la phase exécutoire de l'apoptose en activant par clivage les caspases effectrices. Le mandat des caspases effectrices est d'exécuter l'apoptose en procédant au clivage des substrats cellulaires et généralement, cette étape du processus constitue un point de non-retour pour la cellule [149]. Les caspases effectrices s'attaquent à tout type de substrats tels que, à titre d'exemple, les protéines structurales (actine, lamine, fodrin), les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (DNA-PK, ATM, PARP), les protéines de signalisation (PKC, MEKK-1, Akt, PAK, FAK, Raf-1), les protéines impliquées dans le cycle cellulaire (Rb), les protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose (Bid, Bcl-2, Bcl-xL) et les autres caspases. Les éléments régulateurs et effecteurs de l'apoptose, tels que les caspases, les membres appartenant à la famille des Bcl-2 et certains inhibiteurs tels que SODD, FLIP et les IAPs, régulent les voies de signalisation intrinsèque (mitochondrie) et extrinsèque (RMC) de l'apoptose.

Les IAPs sont une famille de protéines qui se caractérisent par la présence d'un domaine RING finger et d'un ou plusieurs domaines BIR [152]. Initialement isolées à partir du baculovirus [153], ces protéines sont bien connues pour leur capacité à se lier et à inhiber les caspases dans la cellule. Alors que le domaine RING confère une activité d'ubiquitination aux IAP [154], le domaine BIR semble essentiel pour la capacité des IAPs à inhiber les caspases [155]. En plus de leur fonction d'inhibiteurs, les IAPs seraient également impliqués dans la régulation de différents processus biologiques tels que le cycle

cellulaire [156, 157], l'inhibition de la voie de signalisation associée au TNFR1 [158] et dans la dégradation protéolytique de différentes protéines telles que c-Cbl et Mdm2 [159, 160]. La fonction des inhibiteurs SODD et FLIP sera discutée plus en détail à la section 1.2.1.5.

### **1.2.1.3 La voie intrinsèque de l'apoptose: la mitochondrie**

La mitochondrie n'est pas seulement une formidable usine de production énergétique mais représente également un puissant arsenal mortel. Aujourd'hui considérée comme une voie de signalisation centrale de l'apoptose, la mitochondrie produit l'ATP nécessaire pour le bon déroulement du processus apoptotique et libère plusieurs molécules proapoptotiques telles que les procaspases-2, -3 et -9, le cytochrome c, le facteur AIF, les protéines Smac/Diablo et HTR2A/Omni, l'endonucléase G et les molécules oxydatives de type ROS [161-164, 165 ].

La perméabilisation de la membrane mitochondriale est associée à la mort cellulaire par apoptose et semble importante pour allouer le relâchement des molécules proapoptotiques de la mitochondrie vers le cytoplasme [166]. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans la perméabilisation membranaire ne sont pas encore complètement élucidés. Nous savons cependant que les membres de la famille Bcl-2 régulent le processus. Les membres proapoptotiques tels que Bax ou Bak sont transloqués à la membrane mitochondriale, s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent, ce qui permet d'accroître la perméabilité membranaire et le relâchement des molécules apoptotiques dans le cytoplasme [167]. De plus, la caspase-8 clive la portion C-terminal de la protéine proapoptotique Bid qui appartient à la sous-famille des Bcl-2 contenant uniquement un domaine BH3 [168]. La partie C-terminale de Bid (tBid) se relocalise à la mitochondrie et s'associe à la protéine Bax ou Bak, favorisant ainsi leur activation. Il semble que cette interaction entraînerait des changements d'ordre conformationnel au niveau de Bax et de Bak, ce qui favoriserait leur oligomérisation et leur insertion dans la membrane mitochondriale [169]. De plus, selon Roucou et ses collaborateurs, la coopération de tBid est essentielle pour que la protéine Bax puisse agir comme un canal membranaire, une caractéristique nécessaire pour allouer le relâchement de molécules apoptotiques telles que le cytochrome c. D'un autre côté, contrairement à ce qui avait été observé par le passé, les évidences expérimentales qu'ils ont obtenues suggèrent que la seule présence de tBid est insuffisante pour induire

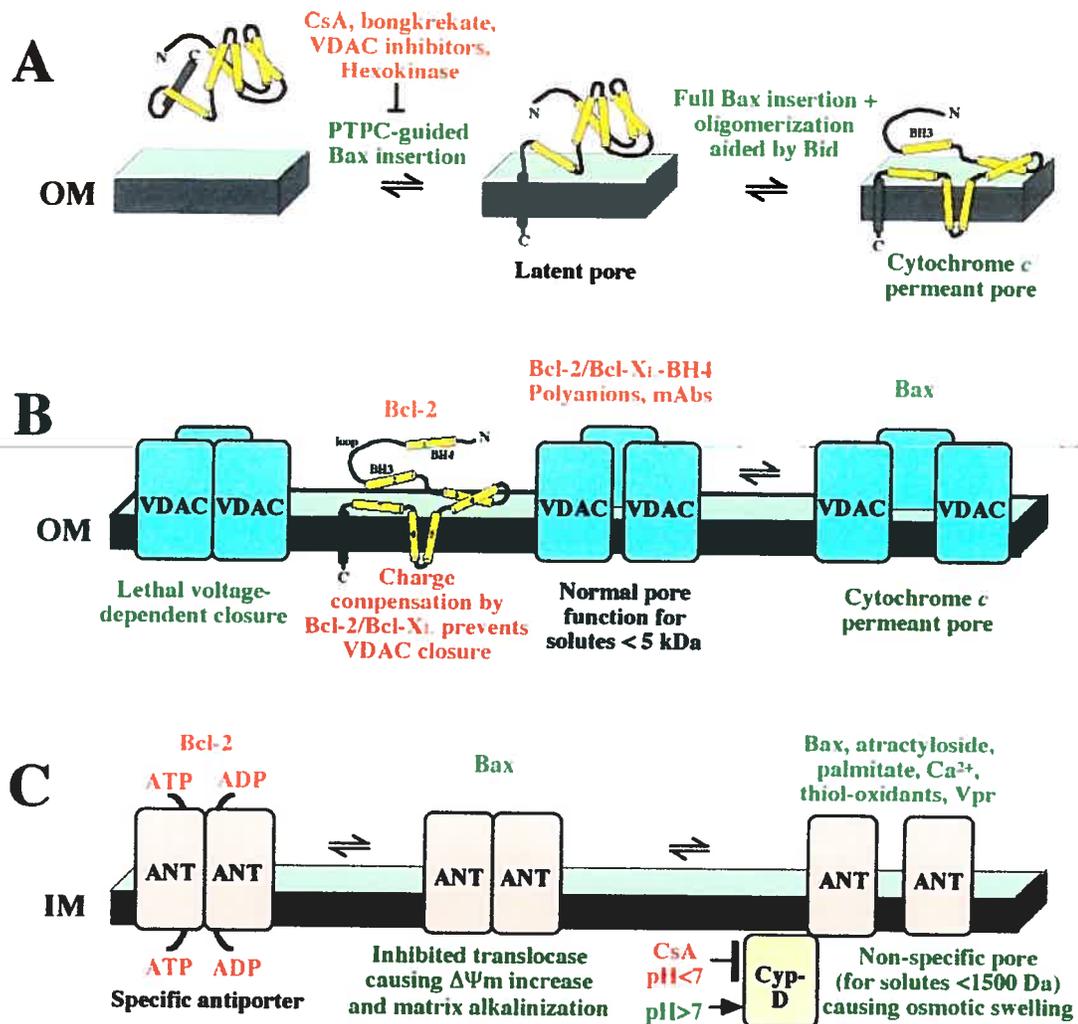
l'oligomérisation de Bax et le processus requerrait un facteur supplémentaire [170]. Tout comme Bid, la protéine proapoptotique Bad fait partie de la famille des Bcl-2 avec un domaine BH3 unique et régule les événements de la voie mitochondriale. La fonction biologique de Bad a surtout été observée avec les voies de signalisation associées aux facteurs de croissance et peut être phosphorylée par différentes kinases telles que AKT, ERK, PKA, RSK et PKA [171, 172]. Sous sa forme phosphorylée, Bad est séquestrée dans le cytoplasme par une protéine de la famille des 14-3-3 et sa fonction est inhibée. Par contre, lors d'un stimulus apoptotique, spécialement dans une situation où les cellules subissent une carence en facteurs de croissance, certaines phosphatases telles que la PP2C déphosphorylent Bad, ce qui lui permet de se dissocier de la protéine 14-3-3 [173]. Une fois libérée, Bad est relocalisée à la mitochondrie et cible spécifiquement les protéines Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, inhibant leurs fonctions antiapoptotiques. D'autres protéines appartenant à la famille des Bcl-2 avec un domaine BH3 unique telles que Noxa, Puma/Bbc3, Bim et Bmf induisent l'apoptose en activant les événements mitochondriaux. À titre d'exemple, les protéines Noxa et Puma/Bbc3 sont activées dans un contexte de dommage à l'ADN et peuvent être régulées transcriptionnellement par p53, E2F1 ou p73 [174, 175, 176, 177, 178, 179]. Par leur interaction avec les molécules de dynéines présentes dans les éléments structuraux de la cellule, les protéines Bim et Bmf sont séquestrées dans les microtubules et dans les filaments d'actines. Lors de certains stimuli apoptotiques, Bim et Bmf se dissocient du réseau microtubulaire et du cytosquelette et se relocalisent à la mitochondrie pour induire l'apoptose [180, 181]. De plus, certaines isoformes de Bim s'associeraient à la protéine Bax induisant des changements, au niveau de la conformation de Bax, similaires à ceux qui avaient été décrits avec l'interaction Bid-Bax, favorisant ainsi le déclenchement des événements mitochondriaux et l'induction de l'apoptose dans la cellule [182].

Les protéines proapoptotiques possédant un domaine BH3 unique (ex : Bid, Bad, Bim, Noxa, Puma, etc.) sont de petites molécules qui sont localisées au sein des différents compartiments cellulaires (nucléaire, microtubule, cytoplasme). Elles agissent comme sentinelles et leur principale mission est de surveiller tout dommage ou autres stimuli apoptotiques que leur compartiment respectif pourrait subir. Le cas échéant, elles quittent leur fonction de sentinelle pour devenir des messagères en effectuant la navette entre le compartiment cellulaire où elles étaient postées et la mitochondrie. Les protéines BH3-unique peuvent être divisés en deux sous-catégories : les BH3-unique activateurs dont la

fonction est de se lier et d'activer les proapoptotiques tels que Bax et Bak et les BH3-unique sensibilisateurs dont la fonction est de se lier et d'inhiber les antiapoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> [142, 143]. Elles transportent donc un signal de mort et leur coopération avec les autres membres de la famille Bcl-2 conduit à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose qui résultera sur la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Cet événement entraîne le relâchement de certaines molécules proapoptotiques dans le cytoplasme telles que le cytochrome c dont la présence est essentielle dans l'induction de plusieurs types d'apoptose [183, 184]. Le mécanisme exact par lequel ces molécules sortent de la mitochondrie est toujours incertain, mais il existe trois différents modèles qui pourraient expliquer le processus (schéma 10) [185].

Le premier modèle prit naissance avec des études de cristallographie qui avaient révélé une ressemblance entre la structure de certains membres de la famille des Bcl-2 (ex. : Bcl-X<sub>L</sub>, Bax, Bid) et certaines toxines bactériennes connues pour agir comme canal ionique afin de permettre le passage des petites molécules [167, 186, 187]. Il semblait également que la seule présence de Bax pouvait induire directement la sortie du cytochrome c de la mitochondrie [188, 189]. Dans le but de mimer la membrane mitochondriale, Korsmeyer, Saito et leurs collaborateurs échafaudèrent un modèle synthétique conçu à partir de liposomes et démontrèrent que Bax pouvait former des canaux fonctionnels dans la membrane lipidique et permettre le transport du cytochrome c [190]. L'utilisation d'un modèle similaire par l'équipe de Martinou permit de démontrer que les propriétés de canaux attribués à Bax nécessitaient obligatoirement l'oligomérisation de la protéine afin de former des canaux assez larges pour permettre le passage du cytochrome c [191, 192]. L'ensemble de ces observations expérimentales tend à démontrer que certains membres proapoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bax et Bak possèdent la capacité de former un canal dans la membrane de la mitochondrie, permettant ainsi le transport du cytochrome c et des autres molécules apoptotiques dans le cytoplasme.

Les deux autres modèles impliquent l'ouverture d'énormes canaux situés à la jonction des membranes internes et externes de la mitochondrie et connue sous l'appellation des pores de perméabilité transitoire (PTP). Le PTP est constitué de plusieurs protéines telles que VDAC et ANT, la créatine kinase mitochondriale, la hexokinase ainsi que la cyclophiline D



D'après Debatin *et al.* (Oncogene, 2002. 21: p. 8786-8803)

**Schéma 10: Mécanismes potentiels pour la perméabilisation de la membrane mitochondriale.**

La perméabilisation de la membrane interne est identifiée IM et la perméabilisation de la membrane externe est identifiée OM. La couleur rouge représente les inhibiteurs de la perméabilisation alors que le vert représente les activateurs. **A)** Bax est transloqué à la mitochondrie en réponse à divers signaux. L'incorporation de Bax sous sa forme monomérique dans la membrane mitochondriale. Aidé par les BH3 uniques, Bax s'oligomérisant créant un canal perméable dans la membrane externe de la mitochondrie. **B)** Le canal ionique VDAC est converti en canal permettant le passage du cytochrome *c* en interagissant avec Bax (droite) et cette interaction peut-être inhibée par les protéines Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>. **C)** La protéine ANT agit comme transporteurs de l'ATP/ADP. Durant la période précoce de l'apoptose, l'activité de ANT est inhibée et plus tard, ANT est converti en pore non-spécifique. La formation du pore est facilitée par l'interaction avec la cyclophilin D et Bax, affectant la conformation de ANT.

et l'ouverture de ces canaux lors de l'apoptose serait suffisamment large pour laisser passer le cytochrome c [137]. Le PTP est particulièrement sensible à toute perturbation au niveau de l'homéostasie cellulaire comme, par exemple, une augmentation de la concentration des céramides, la présence des molécules oxydatives telles que les ROS, une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire ou une fluctuation du pH [193]. Le second modèle suggère que pendant l'apoptose, l'ouverture du PTP permettrait à l'eau et aux ions présents dans le cytoplasme de s'infiltrer dans la mitochondrie. Ceci entraînerait une perte du potentiel membranaire ( $\Delta\Psi_m$ ) et un gonflement de la matrice mitochondriale, provoquant éventuellement la rupture de la membrane mitochondriale, ce qui favoriserait la libération passive du cytochrome c et des autres molécules apoptotiques dans le cytoplasme [194, 195]. Le troisième modèle implique une régulation du PTP par les membres de la famille Bcl-2. Par leur interaction avec les protéines mitochondriales VDAC ou ANT, les protéines Bax et Bak inciteraient l'ouverture du PTP, favorisant ainsi la libération du cytochrome c dans le cytoplasme, contrairement aux protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> qui empêcheraient le relâchement des molécules apoptotiques en régulant la fermeture du canal [196, 197, 198]. Bien que les trois mécanismes décrits pour perméabiliser la membrane mitochondriale soient généralement considérés comme des modèles antagonistes l'un de l'autre, certains scientifiques croient qu'au contraire, ces mécanismes pourraient agir de concert ou encore de façon séquentielle, dépendamment du type cellulaire et de l'intensité du signal apoptotique [199].

D'un autre côté, ces mécanismes restent hypothétiques puisque certaines évidences expérimentales infirment les modèles précédents. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre le PTP, dont la cyclosporine, n'empêche pas Bax ou Bid d'induire le relâchement du cytochrome c dans le cytoplasme [188]. Certains ont observé que le relâchement du cytochrome c se produisait avant la chute du  $\Delta\Psi_m$  [184]. Dans plusieurs types cellulaires, au lieu de gonfler, la mitochondrie diminue de volume, contredisant la thèse de la rupture membranaire [200, 201]. Indépendamment du mécanisme utilisé par la mitochondrie, il semble que les cardiolipines pourraient dans certains cas, jouer un rôle dans le processus de relâchement du cytochrome c. Ces protéines, qui sont spécifiques à la mitochondrie, piègent le cytochrome c à la membrane mitochondriale [193]. La libération du cytochrome c impliquerait donc avant tout une dissociation du complexe cytochrome

c-cardiolipine. D'ailleurs, il a été montré que l'activité de perméabilisation membranaire induite par Bax dépend avant tout de la peroxydation des molécules de cardiolipines [202].

Évidemment, il faudra poursuivre les recherches afin de raffiner notre compréhension au niveau des mécanismes mitochondriaux impliqués dans le relâchement des molécules apoptotiques. Néanmoins, il semble évident que dans la très grande majorité des cas, la translocation du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme représente une condition essentielle pour induire l'activation de la procaspase-9. Des études structurales et fonctionnelles ont permis d'établir un modèle sophistiqué concernant l'activation de la caspase-9. Par l'intermédiaire de ses deux domaines WD40, la protéine adaptatrice Apaf-1 lie le cytochrome c. La présence du cytochrome c induit des changements d'ordre conformationnel au niveau de Apaf-1, permettant le démasquage des domaines de recrutement CARD. En présence d'ATP et par l'intermédiaire de leurs domaines CARD respectifs, Apaf-1 pourra recruter la procaspase-9 et former ainsi un complexe protéique connu sous le terme d'apoptosome [203 , 204, 205 , 206]. La présence d'ATP est nécessaire pour induire un changement d'ordre conformationnel et permettre au complexe d'adopter une structure heptamérique en forme de roue et procéder à l'autoactivation de la procaspase-9 [207 , 208]. Tel illustré au schéma 11, une fois activée, la caspase-9 procède à l'activation des caspases effectrices telles que les caspases-3 et -7, qui pourront à leur tour cliver plus d'une centaine de substrats cellulaires dont la caspase-6, provoquant ainsi le démantèlement des structures cellulaires et l'induction du processus apoptotique [209, 210]. De plus, si les RMC sont impliqués, la caspase-8 peut également engager la voie mitochondriale, ce qui conduira subséquemment à l'activation de la caspase-3 (se référer à la section 1.3.1.4) [211]. Récemment, un nouveau complexe d'activation a été mis en évidence. Suite à des dommages à l'ADN induit par des stress génotoxiques, la protéine adaptatrice RAIDD formerait un complexe protéique avec la protéine PIDD. Par la suite, ce complexe recruterait la procaspase-2L et conduirait à son activation [212, 213]. La formation de ce complexe et l'activation de la caspase-2 participerait au déclenchement de l'apoptose et se produirait en amont des événements mitochondriaux.

Cependant, ce schéma classique de la cascade d'activation des caspases et cet ordre séquentiel d'activation ne sont pas aussi simples qu'ils puissent paraître. Par exemple, il

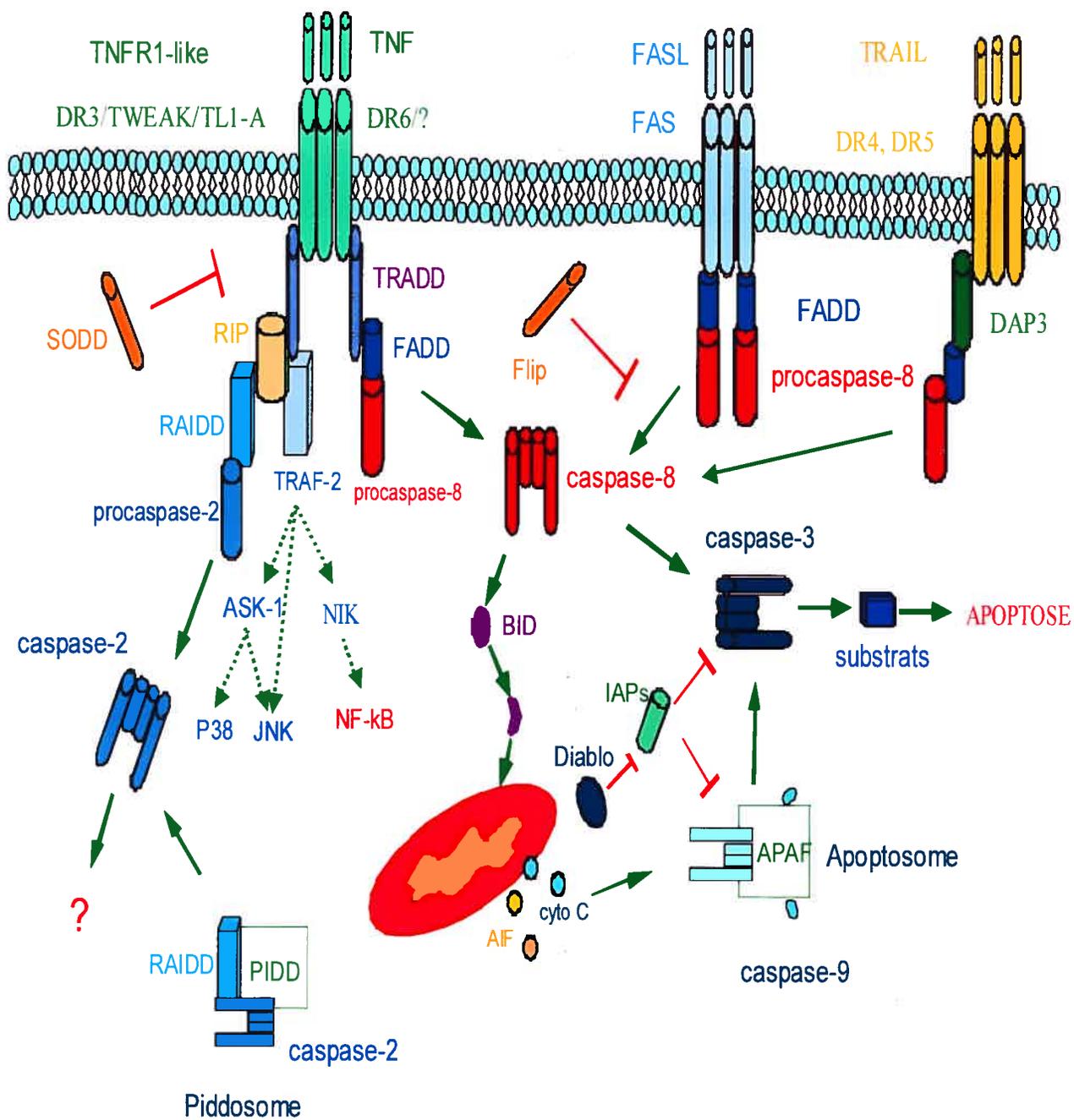


Schéma 11: Voies de signalisation associées à l'apoptose

semble que la caspase-3 a aussi la capacité d'activer les caspases initiatrices -8,-10 et -2 par un mécanisme de boucle de rétroaction, possiblement dans le but d'amplifier le signal apoptotique [209]. D'ailleurs, Weider et ses collaborateurs ont clairement confirmé cette observation en démontrant que dans les lymphocytes B, l'activation de la caspase-8 par la caspase-3 se produit après les événements mitochondriaux [214]. Dans une telle situation, on pourrait considérer que la caspase-8 agit davantage comme une caspase effectrice, qu'une caspase initiatrice. De façon similaire, la caspase-6 peut aussi activer la caspase-8 [215]. Il semble également que dans certains cas, la caspase-3 médie l'activation de la caspase-9 [216] et que la caspase-8 peut activer directement la caspase-9, sans recourir à la voie mitochondriale de l'apoptose [217]. En d'autres termes, le schéma d'activation des caspases est extrêmement complexe et à la lumière de ces récentes données, tenter de déterminer avec certitude l'ordre des événements de cette cascade peut paraître une entreprise ardue et incertaine.

Néanmoins, les événements associés à la voie intrinsèque de l'apoptose implique également la présence de points de contrôle négatifs, notamment par la présence des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> qui utilisent différents mécanismes pour inhiber la voie mitochondriale de l'apoptose. Il semble que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> ont la capacité d'empêcher la fonction de coopération entre Bid et Bax et inhiberaient la capacité de Bax à former un canal membranaire [170]. De plus, les petites protéines apoptotiques, possédant un domaine BH3 unique et agissant comme sensibilisateur à l'apoptose telles que Bad, Bik, Noxa, Puma et BimEL, auraient la capacité de séquestrer les protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, favorisant ainsi l'activation des protéines proapoptotiques comme Bax ou Bak [142, 143]. Les protéines Bid et BimS, qui font partie des protéines avec un domaine BH3 unique et agissant comme activateur de l'apoptose, activeraient directement Bax ou Bak. Ceci dit, les protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> ont la capacité d'inhiber la fonction biologique des protéines avec un domaine BH3 unique appartenant à la classe des activateurs, prévenant ainsi l'activation de Bax/Bak à la mitochondrie [218]. Finalement, il a été démontré que Bcl-X<sub>L</sub> lie directement Apaf-1, empêchant ainsi le recrutement et l'activation de la caspase-9 [219], bien que d'autres études ont remis cela en question. Le contrôle négatif exercé par Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> permet d'inhiber la translocation des molécules apoptotiques présentes dans la mitochondrie, empêchant ainsi la cascade d'activation des caspases et ultimement, bloquant l'induction de l'apoptose dans la cellule.

#### 1.2.1.4 La voie extrinsèque de l'apoptose : les récepteurs de la mort cellulaire

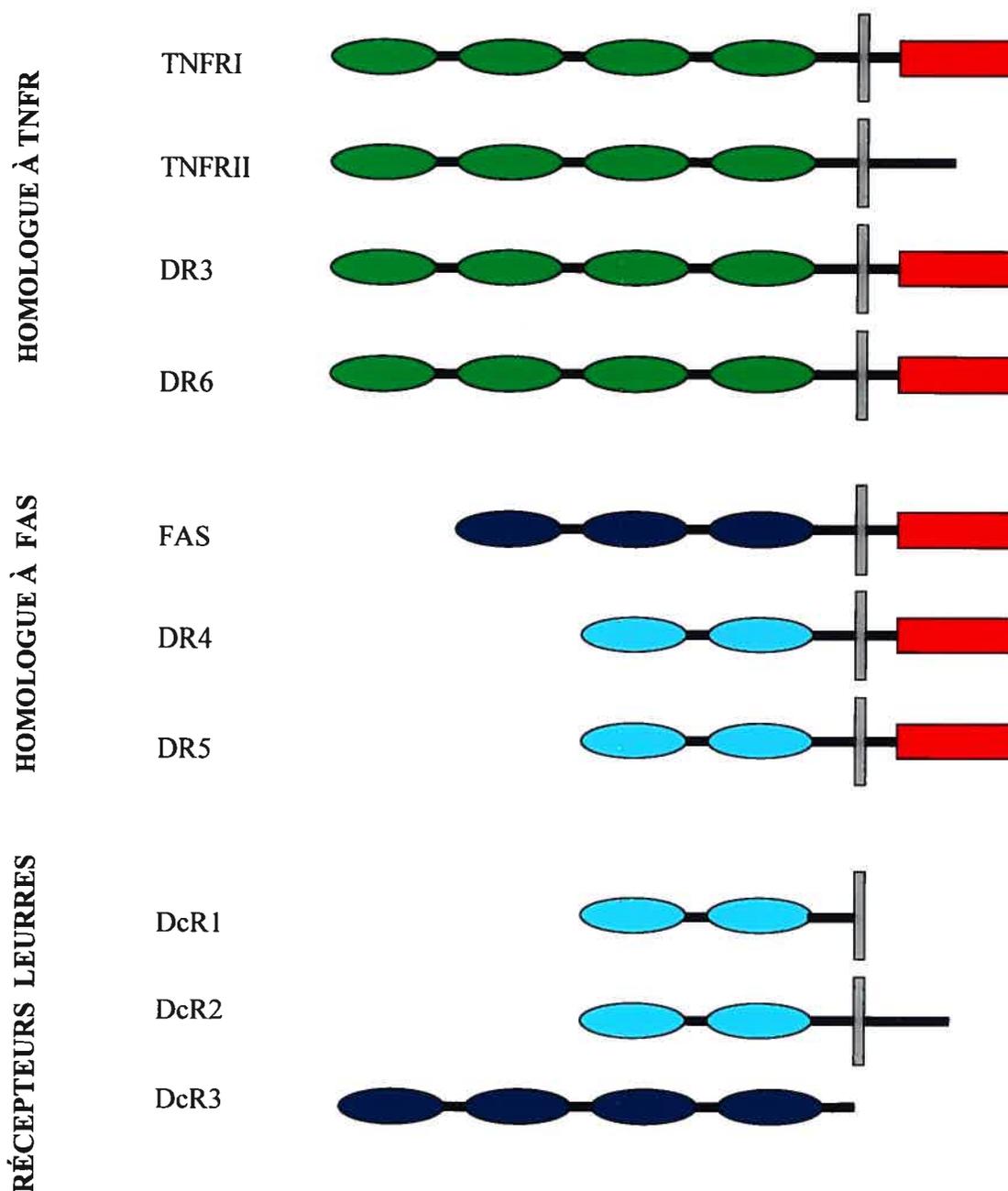
La découverte du TNF et de ses propriétés anticancéreuses remonte au milieu des années 70 [220] et allait devenir le précurseur de découvertes subséquentes concernant plusieurs récepteurs similaires, communément appelés aujourd'hui récepteurs de la mort cellulaire (RMC). Parmi les nombreux membres qui composent la super famille des récepteurs TNF, les RMC constituent une sous-famille de récepteurs capables d'induire l'apoptose dans la cellule et bien qu'ils possèdent une très faible homologie de séquences entre eux, ils sont tous unis par la présence d'une région de 80 acides aminés hautement conservés. Ce domaine protéique, connu sous le terme de DD (*death domain*), est essentiel pour transmettre le signal de mort du récepteur situé à la surface de la cellule vers les voies intracellulaires de l'apoptose [221].

À l'heure actuelle, la famille des RMC est constituée de huit membres : TNFR1, Fas/CD95/APO-1, DR3/TRAMP/Apo-3/WSL-1/LARD, DR4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2/TRICK2/KILLER, DR6, NGFR et EDAR. Chacun de ces récepteurs a la capacité d'interagir spécifiquement avec son ligand respectif tel que le TNF, FasL, NGF, l'ectodysplasine (Eda) pour le récepteur EDAR, TWEAK ou TL1A dans le cas du récepteur DR3, ainsi que TRAIL pour les récepteurs DR4 et DR5. L'identité du ligand pour DR6 est toujours inconnue [222] et il est à noter que l'identité du ligand de DR3 est incertaine et controversée. Initialement, TWEAK avait été identifié comme le ligand de DR3 [223]. Cependant, des études de liaisons ligand-récepteur effectuées par plusieurs groupes n'ont pas permis de confirmer l'interaction TWEAK-DR3 [224, 225, 226]. De plus, il semble que TWEAK peut se lier à la surface de cellules qui n'expriment pas DR3, suggérant l'existence d'un second récepteur pour TWEAK [227, 228]. Récemment, il a été proposé que TL1A soit le véritable ligand de DR3 bien que tout comme TWEAK, cette conclusion ne fasse pas l'unanimité parmi la communauté scientifique [229].

Parmi les RMC, les récepteurs leurres constituent une sous-population de récepteurs qui ont une fonction d'antagoniste et protègent la cellule de l'apoptose. Les récepteurs leurres tels que DcR1/TRAIL-R3/TRID/LIT et DcR2/TRUNDD, connus pour interagir avec le ligand TRAIL ou le récepteur leurre FDR qui lie le ligand FasL, sont tous des récepteurs membranaires qui possèdent un domaine intracytoplasmique tronqué ou totalement inexistant [230, 231, 232]. Conséquemment, ces leurres ont la possibilité de lier le ligand

mais sont incapables de transmettre un signal apoptotique dans la cellule. Le leurre DcR3 qui lie FasL, LIGHT et TL1A, et le leurre OPG qui lie TRAIL sont des récepteurs solubles qui piègent le ligand dans le cytoplasme ou dans le milieu extracellulaire s'ils sont sécrétés à l'extérieur de la cellule [233, 234]. C'est donc en compétitionnant les RMC pour la liaison avec le ligand que les récepteurs leurres solubles ou membranaires inhibent l'apoptose.

Les RMC possèdent tous une structure générale similaire dont un domaine transmembranaire servant à ancrer le récepteur à la membrane cytoplasmique, une portion intracytoplasmique constituée d'un DD et un domaine extracellulaire composé de 2 à 6 domaines riches en cystéines, crucial pour la reconnaissance du ligand (schéma 12). Néanmoins, les RMC possèdent des particularités structurales et emploient certaines voies de signalisation qui leur sont propres. À titre d'exemple, contrairement aux autres RMC, une étude de cristallographie a révélé la présence d'un site de liaison au zinc au centre de la structure de DR5 et ce site semble revêtir une importance capitale puisqu'en l'absence de cette structure, DR5 est 99 fois moins efficace pour induire l'apoptose dans la cellule [235, 236]. Le récepteur DR6 possède des domaines de type SH3 qui sont riches en proline et cette caractéristique unique lui permet d'activer des voies de signalisation qui lui sont propres puisqu'en l'absence de domaines SH3, les autres RMC ne peuvent recruter les mêmes molécules adaptatrices [237]. Ces particularités structurales ou fonctionnelles confèrent aux RMC des rôles biologiques distincts. Le récepteur TNFR1 participe activement dans la réponse inflammatoire, régule certaines fonctions immunitaires comme la maturation et la sécrétion de certaines cytokines, médit des réponses cellulaires aussi variées que la nécrose, la différenciation et la prolifération et, c'est peut-être également à cause de cette grande diversification fonctionnelle, que le TNFR1 est le moins bon inducteur d'apoptose parmi les RMC. Contrairement aux récepteurs Fas, DR4 et DR5, qui sont apparentés par leur fonction biologique et les voies de signalisation qu'ils utilisent, le récepteur DR3 est plus près du récepteur TNFR1 puisque tous deux recrutent le même genre de protéines adaptatrices et activent des voies de signalisation similaires. On connaît peu de choses sur le rôle biologique de DR3, mais pour l'instant, sa principale fonction semble se restreindre à la régulation du système immunitaire. Exclusivement exprimé chez les tissus riches en lymphocytes, DR3 participe à la sélection négative des lymphocytes et



### Schéma 12: Famille des récepteurs de la mort cellulaire

Les rectangles rouges représentent le *death domain* (DD). Les rectangles gris représentent la région transmembranaire et les cercles de couleur représentent les domaines extracellulaires riches en cystéine (CRD). La similarité des structures pour chacun des récepteurs est identifiée par un code de couleur. Le vert représente les récepteurs qui s'apparentent au récepteur TNFR1 alors que le bleu est associé aux récepteurs qui s'associent à Fas. Le bleu foncé et le bleu pâle identifie le degré d'homologie au sein de la sous-famille Fas. Le récepteur leurre DcR3 possède une très forte homologie avec Fas (bleu foncé) alors que les récepteurs leurres DcR1 et DcR2 ont une très forte homologie avec les récepteurs DR4 et DR5.

élimine par apoptose les lymphocytes produites en surplus ou potentiellement dangereuses pour l'organisme tels que les lymphocytes infectées ou ceux présentant des phénotypes cancéreux [238, 239]. Tout comme les récepteurs DR3 et TNFR1, Fas joue un rôle central dans la régulation du système immunitaire, particulièrement lors du développement des lymphocytes. Une déficience au niveau de l'expression de Fas entraîne le développement de diverses maladies immunitaires [240, 241]. Des voies de signalisation associées à la prolifération cellulaire peuvent également être activées par Fas, et plusieurs études suggèrent que ce RMC participerait au développement et à la régulation des hépatocytes, des cardiomyocytes, des cellules intestinales et des neurones du cerveau [242-246]. Ainsi, contrairement à DR3 dont la fonction biologique semble beaucoup plus sélective, Fas a un profil d'action diversifié et régule différents aspects biologiques de l'organisme.

On connaît très peu de choses à propos de la fonction biologique des RMCs EDAR et DR6. Aussi bien exprimé chez les rongeurs que chez les êtres humains, il a été démontré chez la souris que le récepteur EDAR est important dans le processus de maturation des dents et possiblement d'autres structures à base de kératines telles que les ongles et les cheveux [247]. La nature des voies de signalisation activées par DR6 et le type de molécules adaptatrices qu'il recrute fait en sorte qu'il ressemble beaucoup plus aux récepteurs TNFR1 et DR3 que la sous-famille Fas, DR4 et DR5. Exprimé abondamment dans différents tissus tels que le cœur, le cerveau, le placenta, le thymus et les ganglions lymphatiques, il active aussi bien l'apoptose que les voies de signalisation parfois associées à un phénotype de prolifération, tel que la voie des JNK et la voie du facteur de transcription NF- $\kappa$ B [237].

Tout comme Fas, les RMC DR4 et DR5 régulent la quantité de cellules effectrices du système immunitaire et grâce à leur profil d'expression varié, leur rôle biologique dans l'organisme est très diversifié. Entre autres fonctions, ils participent au processus de différenciation des tissus osseux et jouent un rôle dans la maturation des précurseurs de cellules hématopoïétiques [248-250].

C'est surtout le rôle des RMCs dans le cancer qui a particulièrement attiré l'attention des chercheurs. Il est certain que depuis la découverte du TNF, tous les RMC ont suscité beaucoup d'intérêt de la part des scientifiques qui espèrent un jour utiliser ces molécules comme agent chimiothérapeutique physiologique. Néanmoins, le récepteur TNFR1 semble

très peu efficace pour induire l'apoptose dans les tissus cancéreux et bien qu'il soit beaucoup plus efficace que le TNFR1, le récepteur Fas génère de sévères effets secondaires en induisant également l'apoptose des tissus sains. D'ailleurs, les souris qui ont été traitées avec du FasL mourraient tous d'hépatite fulgurante dans les 48 heures suivant le traitement et certains modèles d'animaux montraient également des défaillances cardiaques [221]. Malgré ces désappointements majeurs, l'idée d'utiliser ces molécules comme agent chimiothérapeutique persista et c'est avec la découverte de DR4 et DR5, dans le milieu des années 90, qu'on a constaté que contrairement aux récepteurs TNFR1 et Fas, DR4 et DR5 semblaient très efficaces pour induire l'apoptose dans les tissus cancéreux, mais sans générer les effets létaux observés avec Fas. Étonnamment, ces récepteurs ciblent spécifiquement les cellules cancéreuses alors que les tissus sains semblent naturellement protégés. Des études pratiquées chez les chimpanzés et certains primates montrent aucune cytotoxicité particulière suite à des infusions intraveineuses contenant de fortes doses de TRAIL [251]. De plus, différentes lignées cellulaires dérivées à partir de tissus sains, incluant des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, épithéliales ou endothéliales semblent insensibles à l'activité de TRAIL. D'un autre côté, certains scientifiques ont soulevé la possibilité que l'activation de DR4 ou de DR5 pourrait générer des effets cytotoxiques importants dans les tissus cérébraux et dans les hépatocytes [221, 252, 253, 254]. Jusqu'à maintenant, aucune explication satisfaisante n'a permis d'élucider cette relation de sensibilité-résistance observée chez les cellules tumorales et les tissus sains.

Certaines hypothèses suggèrent une corrélation directe entre le niveau d'expression des leurres DcR1 et DcR2 et la sensibilité des cellules à l'action de TRAIL. Bien que les récepteurs leurres soient exprimés dans les tissus normaux, il semble que les cellules tumorales n'expriment pas ces récepteurs antiapoptotiques, leur conférant une sensibilité accrue à l'apoptose induite par le ligand [231, 255, 256]. D'autres ont tenté d'expliquer le phénomène en suggérant que le niveau d'expression de l'inhibiteur antiapoptotique FLIP déterminerait la sensibilité de la cellule à l'apoptose induite par TRAIL [257, 258]. Bien que ces hypothèses soient valables dans bien des cas, il est évident que la présence de FLIP, DcR1 ou DcR2 ne corrèle pas toujours le phénotype de sensibilité. Néanmoins, les observations initiales générèrent un très grand enthousiasme parmi la communauté scientifique, ce qui entraîna la naissance d'une littérature extrêmement abondante au sujet du ligand TRAIL, des récepteurs DR4 et DR5 et leur potentiel comme agent

chimiothérapeutique. De nombreuses études démontrèrent la très grande efficacité de TRAIL à tuer les cellules cancéreuses provenant d'un très large spectre de tumeurs [259, 260]. Son efficacité *in vivo* fut également démontré à partir de modèles de xénogreffes de carcinome de colons, de carcinomes mammaires, de gliomes malins et de myélomes multiples et l'utilisation d'anticorps qui engagent les récepteurs DR4 et DR5 dans les modèles précliniques démontrèrent également l'efficacité de l'activité antitumorale associée à ces récepteurs [261, 262]. Encore plus important, de nombreuses études établirent que TRAIL avait un effet synergique avec les agents chimiothérapeutiques classiques dans le traitement de différents types de cancer [263, 264, 265]. Par contre, des études plus récentes ont démontré que plusieurs tumeurs d'origines diverses sont résistantes à l'apoptose induite par TRAIL [266, 267]. Bien qu'il représente le meilleur espoir thérapeutique parmi les RMC étudiés, le potentiel antitumorale des récepteurs DR4 et DR5 n'est peut-être pas aussi efficace que le suggérait les études initiales. Reste à savoir si les autres RMC tels que DR3 et DR6 se révéleront être des agents anticancéreux aussi prometteurs que DR4 et DR5 ou si au contraire, ils offriront les mêmes désavantages observés avec les récepteurs TNFR1 ou Fas. En fait, à toutes fins pratiques, DR3 et DR6 n'ont pas encore été étudiés dans un contexte de cancérologie ou de chimiothérapie.

#### **1.2.1.4.1 Signalisation associée aux récepteurs de la mort cellulaire**

L'interaction du ligand avec son récepteur respectif entraîne une cascade d'évènements dont la formation de complexes multiprotéiques impliqués dans l'activation de plusieurs voies de signalisation distinctes. Par exemple, l'interaction du TNF avec le récepteur TNFR1 active la voie de signalisation associée au facteur de transcription NF- $\kappa$ B et pour cette seule voie, on dénombre plus de 221 interactions moléculaires distinctes, dont seulement 32 étaient connues jusqu'à aujourd'hui [268]. En gardant à l'esprit que le TNFR1 active simultanément plusieurs voies de signalisation autres que la voie NF- $\kappa$ B, il est aisé de concevoir la complexité de la réponse cellulaire générée.

Généralement, la stimulation d'un RMC nécessite une interaction avec son ligand respectif, produisant une trimérisation du récepteur. Il semble que les RMC peuvent aussi transduire un signal apoptotique, indépendamment du ligand, en s'oligomérisant eux-mêmes. L'agrégation du récepteur à la surface de la cellule mimerait l'interaction ligand-récepteur

et déclencherait les évènements intracellulaires aussi efficacement qu'en présence du ligand [269-272]. Le mécanisme impliqué dans l'oligomérisation des récepteurs est inconnu, mais il pourrait impliquer les radeaux lipidiques et/ou les domaines PLADs du récepteur [273-276]. Une deuxième école de pensée propose qu'au contraire, l'oligomérisation du RMC changerait suffisamment sa conformation pour l'empêcher de lier son ligand, bloquant ainsi la transmission du signal apoptotique [277]. Finalement, une troisième école de pensée qui unit les deux premiers concepts suggère qu'une agrégation ordonnée du récepteur (ex : domaine PLADs) induirait un signal apoptotique en mimant l'effet du ligand et qu'une agrégation désordonnée du récepteur entraînerait une inhibition du signal apoptotique en bloquant la liaison du ligand au récepteur.

Peu importe le mode d'activation, une fois stimulés, les récepteurs procèdent au recrutement des molécules adaptatrices qui interagissent avec les domaines DD du récepteur, tel qu'illustré au schéma 11. Les RMC TNFR1, DR3 et DR6 recrutent la protéine TRADD qui pourra à son tour interagir avec une seconde molécule adaptatrice connue sous le nom de FADD. C'est par l'intermédiaire des interactions homologues entre les domaines DED présents chez FADD et la procaspase-8 que cette protéine arrive à recruter la procaspase-8 au complexe protéique comprenant le récepteur et les molécules adaptatrices appelées le DISC. L'interaction entre FADD et les récepteurs DR4 et DR5 semblent nécessiter avant tout le recrutement de la protéine DAP3 alors que le RMC Fas a la capacité de recruter directement FADD sans avoir recours à TRADD ou DAP3 [278, 279]. L'implication de DAP3 est controversée puisque certains chercheurs ont observé la présence de cette protéine dans la mitochondrie et qu'elle ne participerait en aucune façon à l'apoptose induite par TRAIL, alors que d'autres ont associé la fonction de DAP3 au récepteur des glucocorticoïdes [280, 281]. Les mécanismes de recrutement de FADD par les récepteurs DR4/5 restent donc obscurs, mais comme c'est le cas avec tous les RMC, c'est le recrutement et l'accumulation de la procaspase-8 au DISC qui conduiront à son autoactivation [282]. Une fois activée, la caspase-8 peut soit activer directement la caspase-3 et induire l'apoptose, soit engager la voie intrinsèque en clivant la protéine Bid, ce qui provoquera le déclenchement des évènements mitochondriaux tels que discuté précédemment (section 1.3.1.3), qui résultera sur l'activation de la caspase-9 et subséquemment, de la caspase-3 [211, 283, 284]. Les RMC peuvent également recruter la

procaspase-10 qui possède une fonction biologique similaire à la caspase-8 et peut même la remplacer complètement lorsque la caspase-8 est absente des cellules [285].

Ce schéma d'activation des RMC est reconnu par l'ensemble de la communauté scientifique et est abondamment cité. Pourtant, ce modèle classique a subi une profonde remise en question récemment avec la publication des travaux de Harper qui ont démontré l'incapacité du récepteur TNFR1 à recruter les protéines FADD et procaspase-8 quoique leur présence était essentielle pour induire l'apoptose associée au récepteur. L'incapacité du récepteur Fas à recruter le complexe FADD-procaspase-8 a aussi été décrit [286, 287]. Un autre groupe a confirmé ces observations et a élaboré un nouveau modèle afin d'expliquer ces contradictions expérimentales. Ce modèle suggère que le recrutement des molécules adaptatrices s'effectueraient en deux étapes. Rapidement après la stimulation, FADD et la procaspase-8 seraient recrutés au récepteur et formerait le complexe I. Le complexe I se dissocierait aussitôt du récepteur pour former un second complexe (complexe II) dans le cytoplasme et c'est ce complexe qui serait responsable du recrutement de la machinerie apoptotique [288]. De plus, FADD induirait également la nécrose et agirait comme molécule pivot afin d'orienter la réponse cellulaire vers l'apoptose ou vers la nécrose, compliquant davantage la réponse cellulaire générée par les RMC [289]. À l'heure actuelle, la seule certitude scientifique qu'on peut émettre est que les événements impliqués dans l'activation des récepteurs et dans le processus de recrutement des molécules adaptatrices sont beaucoup plus complexes que le modèle décrit initialement.

Parallèlement à la voie apoptotique médiée par FADD et la caspase-8, les RMC recrutent par l'intermédiaire de TRADD des molécules adaptatrices secondaires telles que TRAF-2 et l'adaptateur-kinase RIP (schéma 11). Ces adaptateurs secondaires forment un complexe trimoléculaire avec TRADD qui résulte sur le recrutement et l'activation des MAPKKK tels que MEKK1 ou ASK1 et qui à leur tour, activeront les MAPK JNK, ERK et p38. Ces adaptateurs secondaires pourront aussi engager une troisième voie conduisant à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B [222, 290-295] et bien que ces voies de signalisations ont souvent été associées à une réponse de prolifération cellulaire, elles peuvent également induire l'apoptose [291, 295-298]. Ces voies de signalisation parallèles peuvent aussi être activées par les RMC qui n'emploient pas TRADD tels que FAS et DR4/5 [299-303].

### **1.2.1.5 Régulation négative de la voie des récepteurs de la mort cellulaire**

La voie extrinsèque de l'apoptose est également régulée par des points de contrôles négatifs, tel qu'illustré au schéma 11. L'inhibiteur FLIP, qui est une protéine homologue de la procaspase-8, a la capacité de bloquer le signal apoptotique généré par les RMC. Celui-ci interfère directement avec l'activation de la procaspase-8 en compétitionnant l'interaction caspase-8-FADD [304, 305]. D'ailleurs, une corrélation directe existe entre le niveau d'expression de FLIP et la résistance des cellules à l'action des ligands FasL ou TRAIL [306, 307]. L'inhibiteur SODD cible spécifiquement les récepteurs TNFR1 et DR3 et empêcherait le déclenchement spontané de l'apoptose dans les cellules aux repos. Étant associé en permanence à la portion intracytoplasmique du récepteur, c'est uniquement en présence du ligand que SODD se détacherait du récepteur afin de permettre le recrutement des différentes molécules de signalisation nécessaires à l'induction de l'apoptose. Le mécanisme d'action de SODD est inconnu mais il semble que la chaperonne HSP70 puisse se lier à SODD et que la conformation de ce complexe et du RMC soient des critères importants pour l'activité de SODD [308, 309]. Pourtant, une étude récente remet en question la fonction biologique de SODD puisqu'il semble que les souris knock-out, pour la protéine SODD, sont aussi sensibles à l'apoptose que les souris normales [310]. Le troisième point de contrôle important de la voie apoptotique est assuré par la famille des IAPs, qui est composée d'inhibiteurs de caspases. Hautement conservés au travers de l'évolution, certains membres tels que cIAP1, cIAP2 et XIAP inhibent spécifiquement les caspase-3, -7 et -9 [311-313]. De plus, les protéines DIABLO/Smac et HTR2A/Omni qui sont relâchées de la mitochondrie lors de l'apoptose inhibe les IAPs, favorisant ainsi l'activation des caspases et l'exécution de l'apoptose [314, 315]. Ces différents points de régulations ont souvent été associés au développement de cancer et constituent des cibles thérapeutiques intéressantes [258, 316-318].

### **1.2.1.6 Le rôle des récepteurs de la mort cellulaire dans la chimiothérapie**

L'effet des agents chimiothérapeutiques sur les RMC a été abondamment étudié par le passé, particulièrement pour les récepteurs Fas, DR4 et DR5, alors que les données expérimentales sont à peu près inexistantes pour DR3 et DR6. L'effet des drogues anticancéreuses sur Fas divise l'opinion des scientifiques et il est très difficile d'émettre une conclusion claire. C'est en 1996 qu'on a soulevé pour la première fois l'idée que les agents anticancéreux activaient le récepteur Fas pour tuer les cellules tumorales par

apoptose et depuis, de nombreuses études abondent dans ce sens [319]. Il a été observé que certains agents chimiothérapeutiques induisent une cytotoxicité dépendante de Fas [320-322] et que pour différents types de tumeurs, l'exposition des cellules tumorales à certains agents anticancéreux augmente l'expression de Fas ou de FasL [323-326]. Cependant, l'inhibition de la voie associée à Fas par l'utilisation d'Ac neutralisant ou de dominant négatif de FADD suggère que les cellules traitées avec ces drogues meurent par un mécanisme indépendant de Fas [214, 327-329]. Les facteurs tels que le type de tumeur, le type de drogue ainsi que les conditions expérimentales sont autant de critères qui influencent les conclusions à propos de l'implication de Fas. Le ligand TRAIL et les récepteurs DR4/5 ont eux aussi bénéficié de recherches intensives mais dans un contexte expérimental différent. On a surtout étudié le potentiel clinique de TRAIL et démontré son effet synergique avec certaines drogues, augmentant l'efficacité antitumorale de ces composés [264, 330, 331]. De plus, plusieurs études ont montré que des tumeurs d'origines diverses, réfractaires à l'action de TRAIL, pouvaient être sensibilisées en subissant un pré-traitement avec les agents chimiothérapeutiques, permettant de réverser le phénotype de résistance à l'apoptose induite par TRAIL [267, 332]. L'ensemble de ces travaux montre que TRAIL pourrait se révéler un atout important dans une perspective thérapeutique, en combinant son action à l'arsenal chimiothérapeutique actuel. D'un autre côté, on ignore si les agents chimiothérapeutiques peuvent activer directement TRAIL et/ou ses récepteurs puisque étonnamment, la littérature à ce sujet est beaucoup moins abondante que dans le cas de Fas et il est trop tôt pour tirer une quelconque conclusion [333, 334]. Par conséquent, mis à part le récepteur Fas, la question reste ouverte pour les autres récepteurs de la famille.

### **1.3 LA SIGNALISATION CELLULAIRE ASSOCIÉE OU NON À LA RÉGULATION DE LA RÉPONSE APOPTOTIQUE**

Les prochaines sections traitent de certaines voies de signalisation qui ont le potentiel d'être activées par les agents chimiothérapeutiques et qui ont été étudiées dans le cadre de cette thèse. Ces voies sont impliquées dans différentes réponses cellulaires et bien qu'elles ne régulent pas directement l'apoptose cellulaire, elles peuvent dans certains cas déclencher le processus.

### 1.3.1 Les mapkinases et leur fonction biologique dans la cellule

Les différents membres de la super famille des mapkinases (MAPK) sont des sérine/thréonine kinases hautement conservées qui répondent à une grande variété de signaux et de stimuli. Par leur capacité à phosphoryler des kinases cibles dans le cytoplasme résultant sur l'activation des facteurs de transcription dans le noyau, elles régulent différents processus biologiques en participant à la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire et dans certains contextes, elles favorisent ou inhibent l'induction de l'apoptose dans la cellule [335-341]. Plusieurs facteurs orientent le type de réponse cellulaire générée par une MAPK. Notamment, l'existence de séquences spécifiques présentes sur les kinases ou leurs substrats, la localisation intracellulaire des MAPK, la régulation spécifique opérée par les protéines échafaudages de même que la nature, la durée et l'intensité du signal [342-344]. On divise les MAPKs en trois grandes classes : la famille Erk, la famille p38 et la famille des JNK et on connaît plusieurs isoformes pour chacune des MAPKs : Erk 1/2, p38/ $\alpha/\beta/\delta/\gamma$  et JNK1/2/3. La famille Erk est activée en réponse à la présence de facteurs de croissance ou différentes cytokines et est généralement associée à une réponse de prolifération cellulaire et antiapoptotique [345]. Néanmoins, certaines études récentes suggèrent que Erk aurait un rôle proapoptotique dans un contexte de dommages cérébraux et certains RMC tels que le récepteur Fas, activerait Erk dans les neurones [294, 346]. Bien qu'elles peuvent répondre à la présence de facteurs de croissance et générer des signaux de prolifération cellulaire, les mapkinases p38 et JNK sont surtout impliquées dans la réponse au stress cellulaire et dans la majorité des cas, elles sont activées simultanément [347]. En réponse à des stress de différentes natures tels que la présence d'agents chimiques, de rayons U.V et autres types de radiations, d'agents oxydants et de stress osmotiques ou thermiques, les mapkinases p38 et JNK ont la capacité d'activer la réponse inflammatoire en induisant la production de cytokines, de médier un arrêt du cycle cellulaire et contrairement à Erk, elles ont souvent été décrites pour favoriser l'apoptose dans la cellule [348, 349]. Puisque nous nous intéressons particulièrement à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques, nous avons concentré nos efforts sur les voies p38 et JNK.

#### 1.3.1.1 Les voies de signalisation associées aux mapkinases

Afin d'être activée, la dizaine de mapkinases identifiées chez les mammifères nécessitent tous une double phosphorylation sur des résidus tyrosine et thréonine présents au sein d'un

motif de séquence spécifique à chacune des familles et s'activent entre elles par vagues de phosphorylation successives, générant une cascade d'activation. Tel qu'illustré au schéma 13, pour chacune des familles, la cascade de phosphorylation implique trois niveaux d'activation : elle débute avec l'activation d'une MAPKKK qui phosphoryle une MAPKK qui, une fois activée, phosphoryle à son tour la MAPK. La MAPK est transloquée au noyau et phosphoryle le ou les facteur(s) de transcription ciblés qui active(nt) la transcription des gènes cibles. Certaines kinases, situées en amont de la cascade telles que Mst1 et MEKK1, qui sont nécessaires pour l'activation des MAPK p38 et JNK, doivent être clivées par les caspases pour être activées [350, 351]. Les molécules GTPases appartenant à la famille Rho telles que Rac/Cdc42 activent également la voie p38 en phosphorylant les PAKs qui activeront par la suite les mapkinases situées en aval de la cascade [352]. Plusieurs MAPKKK ont été identifiées incluant ASK1, TAK1, Tpl, les MLKs et les MEKKs. Bien que leur spécificité de substrat demeure mal définie, elles activent par phosphorylation les MAPKK tels que MKK3 et MKK6 pour la famille de la p38 et les MKK4 et MKK7 pour la famille des JNK. Après avoir été phosphorylée par leurs MAPKK respectives, les mapkinases activent certains facteurs de transcription tels que ATF-2 et MEF2 dans le cas de la p38 alors que les JNK activent les facteurs de transcription Jun, Fos, ATF-2 et Elk1 [353-355]. Les protéines échafaudages telles que les JIPs ou MP1 forment des complexes avec ces kinases et servent à concentrer l'action des enzymes en permettant d'interagir plus efficacement entre elles [356, 357]. Différentes études ont identifié ASK1 comme étant la principale MAPKKK responsable de l'activation de la cascade des mapkinases en réponse au RMC, au peroxyde et à certains agents chimiothérapeutiques [358-360]. L'activation de la p38 ou des JNK peut aussi se produire indépendamment de cette cascade, entre autres par l'interaction de la protéine TAB1. Bien qu'elle ne possède pas d'activité kinase, c'est en liant directement la p38 que TAB1 provoque un changement de conformation et induit l'autophosphorylation de la kinase [361, 362]. Après avoir été activées, les MAPK p38 et JNK possèdent la capacité de réguler l'apoptose. Les JNK ont déjà été associées à la survie cellulaire mais généralement, elles génèrent plutôt un signal proapoptotique dans la cellule [354]. Le rôle de la p38 dans l'apoptose est plus controversé et dépendamment du contexte, cette kinase fonctionne aussi bien comme un effecteur proapoptotique que antiapoptotique. Plusieurs travaux ont démontré le rôle proapoptotique de la p38 en réponse à différents stimuli comme une

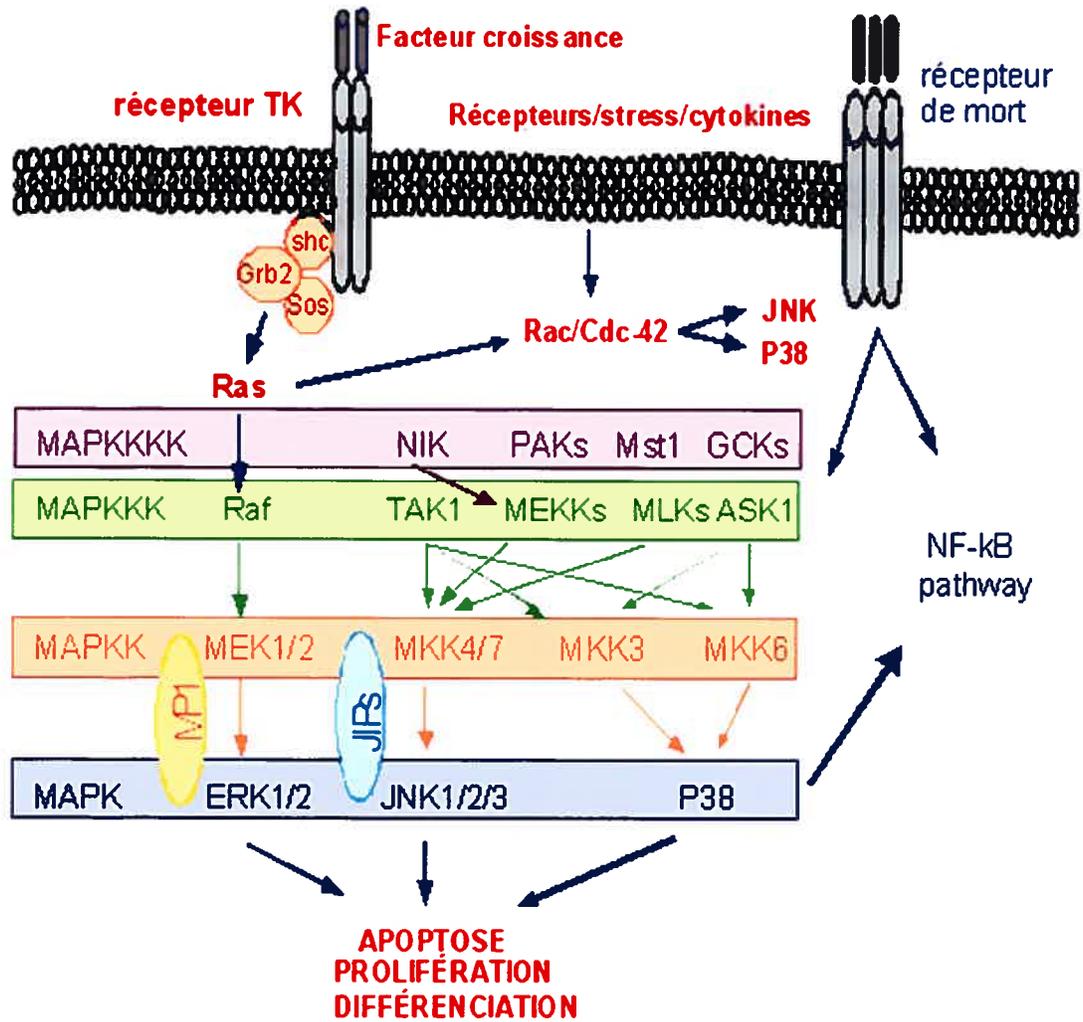


Schéma 13: Voies de signalisation associées aux mapkinases

carence en facteur de croissance, l'activation de certains RMC tels que Fas, la présence de rayons UV, de céramides et d'hyperosmolarité [363-366]. De plus, la p38 régulerait directement l'expression des ligands Fas et TNF [367, 368]. On ignore exactement le mécanisme proapoptotique de la p38. Des études contradictoires montrent que la p38 agit en amont des caspases alors que d'autres études suggèrent que sa fonction biologique se situe en aval des caspases [367, 369]. Paradoxalement, pour plusieurs des stimuli où le rôle proapoptotique de la p38 avait été démontré, on a aussi observé une fonction de protection pour cette kinase. À titre d'exemple, la fonction antiapoptotique de la p38 a été montrée en présence de rayons UV, de ligands TNF et Fas et de différents stress oxydatifs [370-372]. Certains indices sur le mécanisme d'action antiapoptotique de la p38 laissent croire que cette kinase diminuerait l'expression du récepteur Fas chez les cellules irradiées aux UV [371]. Une autre étude avance que la phosphorylation des procaspases-8 et -3 par la p38 conduiraient à leur inactivation et faciliterait l'inhibition de l'apoptose dans la cellule [373].

### **1.3.1.2 Le rôle des mapkinases dans la chimiothérapie**

Dans certains contextes, les agents chimiothérapeutiques induisent l'apoptose en activant les mapkinases p38 et/ou JNK. Dans les cellules leucémiques U937, la camptothécine et l'étoposide activent les JNK qui médient elles-mêmes l'activation des caspases et le déclenchement de l'apoptose [374]. Des inhibiteurs de la topoisomérase II tels que la doxorubicine et l'étoposide activent la p38 [375] et jouent un rôle important dans l'apoptose induite par la doxorubicine [376]. Plusieurs autres composés anticancéreux tels que le cisplatine, le taxol, la vinblastine, la vincristine, le méthotrexate et le mitoxantrone requièrent l'activation de la p38 et/ou des JNK pour induire l'apoptose dans les cellules tumorales [375-386]. Pourtant, des conclusions contradictoires ont été observées avec le taxol et l'araC puisque l'activation des MAPK par ces agents contribue à la protection des cellules et au développement de mécanismes de résistance contre l'action de ces drogues [336, 387, 388]. Certaines études ont aussi démontré que malgré l'activation des MAPK par les agents chimiothérapeutiques, la p38 et les JNK ne semblent jouer aucun rôle spécifique dans l'apoptose générée [389, 390].

### 1.3.2 Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et sa fonction biologique dans la cellule

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B réfère à une famille de petits facteurs de transcription dimériques dont l'activité est requise pour l'induction de plus de 150 gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation, le développement et l'apoptose. Des stimuli de différentes natures tels que la sécrétion de cytokines, de facteurs de croissance, la présence de certains agents chimiothérapeutiques et autres facteurs induisant des dommages à l'ADN ainsi que la présence d'agents pathogènes induisent l'activation de NF- $\kappa$ B [391]. Cette classe de facteurs de transcription se divise en deux groupes. Le premier est constitué de p50 et p52 qui sont initialement synthétisés sous formes de précurseurs inactifs, p105 et p100 respectivement. Ces gros précurseurs agissent comme inhibiteurs et doivent subir une protéolyse afin de produire la forme active p50 et p52 [392, 393]. Le second groupe est constitué de sous-unités c-Rel, p65(RelA) et RelB, et sont synthétisées immédiatement sous leurs formes actives sans nécessiter aucune maturation particulière. L'association de ces différentes sous-unités sous formes de hétérodimères ou homodimères est un pré-requis essentiel pour l'activation de NF- $\kappa$ B. Ces différents complexes sont généralement reconnus comme des activateurs transcriptionnels bien que la combinaison de certaines sous-unités telles que les homodimères p50 ou p52 donne plutôt naissance à des répresseurs inhibant la transcription [394]. Le dimère p50-p65 est la forme la plus commune et la plus abondante de NF- $\kappa$ B et contrôle la transcription de plus de gènes que n'importe quel autre complexe de la famille [395]. Fortement associée au développement de l'oncogénèse, il existe une prépondérance d'études démontrant la fonction antiapoptotique de NF- $\kappa$ B et son implication dans le cancer. Une forte corrélation existe entre la présence de certaines des sous-unités de la famille NF- $\kappa$ B et le développement de leucémies [396-398]. Des réarrangements comme des translocations chromosomiques ou des amplifications géniques impliquant c-Rel et p65 ont aussi été observés dans certaines formes de cancer [399-401]. L'inactivation de l'inhibiteur I $\kappa$ B et la présence d'une forme constitutivement active de NF- $\kappa$ B dans le noyau ont aussi été associées à la formation de tumeurs [402-405]. NF- $\kappa$ B a la capacité de favoriser la prolifération cellulaire et de bloquer l'apoptose en activant la transcription de gènes antiapoptotiques tels que Bcl-X<sub>L</sub>, Bfl1/A1, les IAPs et inhibe aussi l'activation de la procaspase-8 [406-408]. Néanmoins, la fonction proapoptotique de NF- $\kappa$ B a également été démontrée dans différents contextes expérimentaux [62, 409-413]. À l'heure actuelle, le principal mécanisme retenu pour expliquer le potentiel proapoptotique

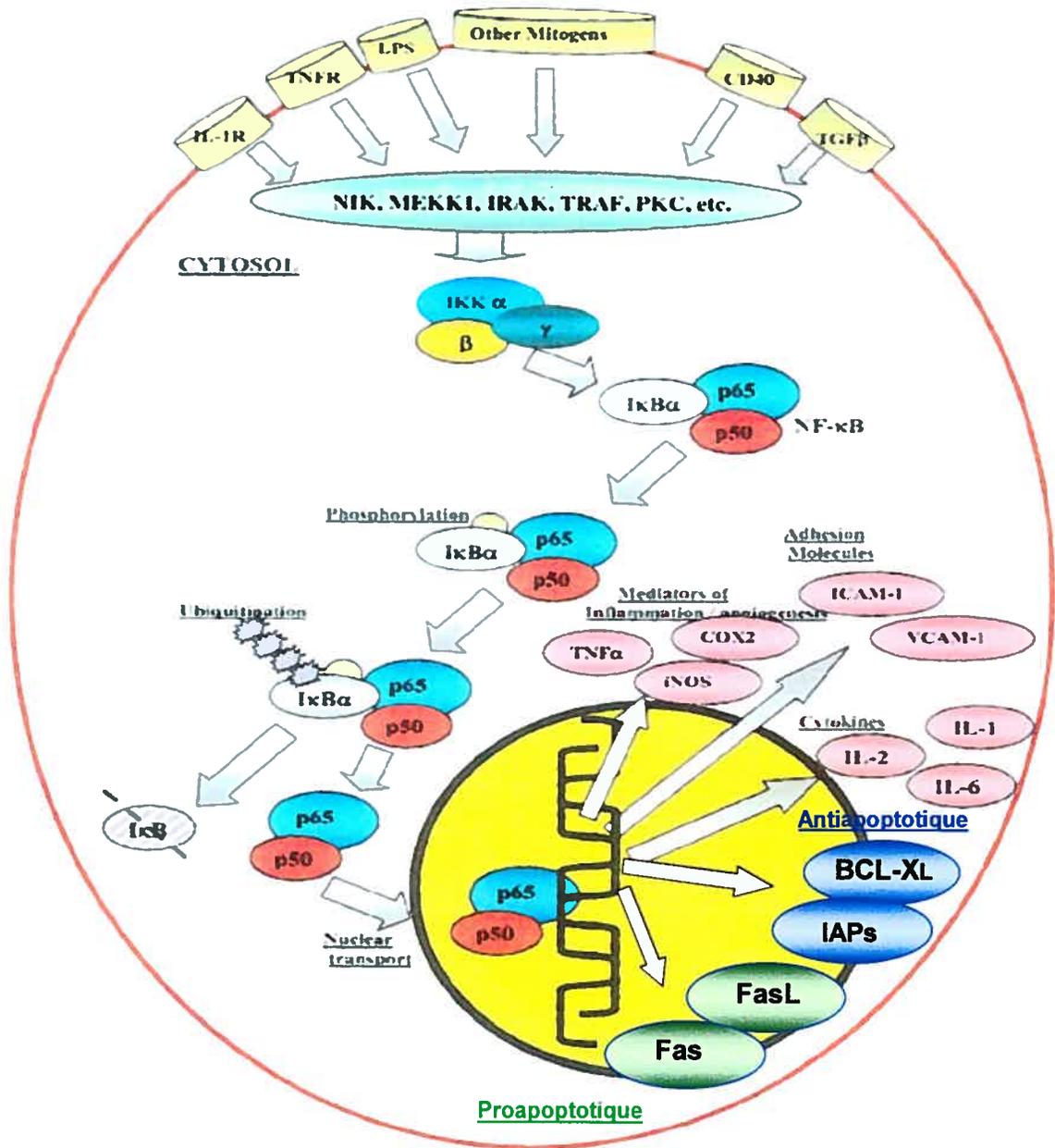
de ce facteur de transcription implique l'activation de certains ligands et RMC. Il semble que NF- $\kappa$ B cible directement le promoteur des gènes codant pour les protéines FasL, Fas et TRAIL, favorisant l'induction de l'apoptose par la voie extrinsèque de la cellule [411, 414, 415]. De plus, des évidences indirectes confirment la fonction proapoptotique de NF- $\kappa$ B puisque certaines lignées cellulaires résistantes à l'apoptose sont aussi déficientes pour le facteur de transcription NF- $\kappa$ B [416].

### 1.3.2.1 La voie de signalisation associée au facteur de transcription NF- $\kappa$ B

Étant lié à l'inhibiteur I $\kappa$ B, le complexe dimérique NF- $\kappa$ B existe sous sa forme inactive dans le cytoplasme des cellules au repos. Chez les vertébrés, on connaît plusieurs molécules de classe I $\kappa$ B: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$  et Bcl3. Chacun de ces inhibiteurs possède des domaines ankyrines qui médient les interactions protéines-protéines, permettant la formation d'un complexe avec NF- $\kappa$ B. C'est en masquant le signal de localisation nucléaire de NF- $\kappa$ B que les inhibiteurs I $\kappa$ B réussissent à séquestrer le facteur de transcription dans le cytoplasme [391]. Après stimulation, la kinase IKK présente dans le cytoplasme est activée. Constitué de deux sous-unités catalytiques ( $\alpha$ , $\beta$ ) et d'une troisième sous-unité agissant comme élément régulateur (NEMO), ce large complexe multiprotéique phosphoryle l'inhibiteur I $\kappa$ B [417-419]. L'état hyperphosphorylé de I $\kappa$ B conduit à l'attachement de plusieurs molécules d'ubiquitines sur la protéine, formant une chaîne de polyubiquitines nécessaire pour induire la dégradation de l'inhibiteur par le protéasome 26S [420]. Suivant la dégradation de I $\kappa$ B, le facteur NF- $\kappa$ B est transloqué au noyau et active la transcription des gènes cibles (schéma 14). La régulation négative de cette voie s'exerce principalement par l'intermédiaire de phosphatases qui déphosphorylent IKK afin de prévenir une activation prolongée de la kinase, ce qui résulte sur l'activation permanente de NF- $\kappa$ B dans le noyau. Cette situation a d'ailleurs été décrite comme étant un mécanisme moléculaire important dans le développement de l'oncogénèse [421, 422].

### 1.3.2.2 Le rôle de NF- $\kappa$ B dans la chimiothérapie

Il est connu que la majorité des agents chimiothérapeutiques qui endommagent l'ADN induisent l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Par contre, la fonction biologique de NF- $\kappa$ B dans un contexte de chimiothérapie est encore mal comprise et les conclusions expérimentales obtenues sont contradictoires. Il semble que NF- $\kappa$ B protégerait les cellules



D'après Panwalkar *et al.* (Cancer 8: p.1578–89.)

Schéma 14: Voies de signalisation associées à NF-κB

cancéreuses de l'apoptose et favoriserait la résistance cellulaire à l'action des agents chimiothérapeutiques comme la camptothécine, l'étoposide, la doxorubicine, le taxol et le cisplatine [62, 423-427]. D'un autre côté, il a été démontré que l'activation de NF- $\kappa$ B est importante pour l'induction de l'apoptose dans les cellules tumorales traitées avec différents agents anticancéreux tels que la vincristine, l'AraC et toutes les drogues citées précédemment [413, 428-432]. De plus, le seul fait d'observer l'activation de NF- $\kappa$ B suite au traitement avec un composé anticancéreux n'implique pas nécessairement une fonction biologique pour celui-ci. À titre d'exemple, bien que le taxol module l'activité de NF- $\kappa$ B dans les cellules leucémiques, celles-ci meurent par apoptose indépendamment de l'activité associée à NF- $\kappa$ B [433]. En conclusion, le rôle de NF- $\kappa$ B dans la réponse cellulaire à la chimiothérapie est complexe et controversée, et semble varier en fonction du contexte cellulaire, du type de drogue étudiée et bien entendu, selon les conditions expérimentales utilisées.

### **1.3.3 Les kinases ATM/ATR et Abl : leurs fonctions biologiques dans la cellule**

Rapidement activées par les dommages à l'ADN suite à la présence de stress génotoxiques, les kinases ATM et ATR appartenant à la famille des PI-3-kinases sont d'énormes protéines qui agissent comme senseurs de lésions. Des mutations dans le gène codant pour ATM entraînent le développement de l'ataxia-telangiectasia, une maladie qui se caractérise par l'apparition progressive d'ataxie cérébrale, une forte sensibilité aux radiations ionisantes, une immunodéficience humorale et cellulaire et une augmentation de la sensibilité aux cancers [434]. Différentes altérations génétiques présentes dans le gène d'ATM ont également été observées chez des patients atteints par différents types de cancers [435-438]. La principale fonction des kinases ATM et ATR est de reconnaître les dommages qui affectent le génome et de transduire les différents signaux appropriés pour le déclenchement de la réponse cellulaire. ATM semble particulièrement sensible à la présence des cassures doubles brins générées par les agents chimiothérapeutiques et les radiations ionisantes, alors que ATR répond également aux lésions induites par les U.V et à un blocage de la fourche de réplication [439-441]. Plusieurs données expérimentales ont démontré la capacité de ces protéines senseurs à lier directement les extrémités de l'ADN endommagé [442-444]. Les kinases ATM et ATR pourraient également interagir indirectement avec les lésions, en se complexant avec les protéines impliquées dans la réparation ou la maintenance du génome telles que BRCA1, HDAC1/2 et Rad17 [445-449].

Elles pourraient donc orienter les complexes de réparation aux sites de lésions et favoriser la réparation de l'ADN endommagé. De plus, ATM et ATR médient différents types de réponses en activant plusieurs protéines cibles impliquées dans les arrêts du cycle cellulaire et l'apoptose.

Un effecteur important de ATM est la tyrosine kinase Abl qui est localisée dans le cytoplasme et le noyau de la cellule. Abl est rapidement activée suite à une exposition à des radiations ionisantes ou à des stress génotoxiques et très souvent, cette activation est médiée par ATM. Malgré cette relation étroite qui unit ATM et Abl, plusieurs études ont montré que l'activation de Abl n'est pas toujours essentielle pour la fonction de ATM et que ces deux kinases peuvent opérer indépendamment l'une de l'autre [450-453]. En plus de ses domaines d'interactions protéiques de types SH<sub>2</sub> et SH<sub>3</sub> et de son domaine kinase, Abl possède plusieurs caractéristiques qui la distinguent des tyrosines kinases classiques. Elle possède entre autres trois signaux de localisation nucléaire ainsi qu'un signal d'exportation nucléaire, lui permettant d'effectuer la navette entre le noyau et le cytoplasme [454, 455]. Avec ses sites de liaisons à l'actine, Abl a la capacité d'interagir directement avec le cytosquelette et ses trois boîtes HLBs lui confèrent la possibilité de lier directement la chromatine, particulièrement les structures de l'ADN présentant une distorsion [456-460]. Abl a été initialement remarquée pour son potentiel oncogénique dans le développement des leucémies issues de la translocation des chromosomes 9 et 22. La protéine de fusion Bcr-Abl, née de cette translocation, est responsable de l'activation des signaux intracellulaires qui sont normalement activés par les récepteurs tyrosines kinases ainsi que la voie associée à Ras. Conséquemment, les cellules ont la capacité de se diviser indépendamment de la présence des signaux mitogéniques comme les facteurs de croissance. Parallèlement à la stimulation de la prolifération cellulaire, Abl a la capacité de bloquer l'apoptose en activant la voie de la PI-3 kinase et de Akt, résultant sur l'inactivation des molécules proapoptotiques Bad, procaspase-9 et le facteur de transcription Foxo3A [461-463]. Le potentiel oncogénique observé pour la protéine de fusion n'est pas simplement dû à la suractivation de Abl par Bcr puisque la surproduction de Abl dans la cellule est insuffisante pour transformer la cellule [464]. Bien que les mécanismes impliqués restent obscurs, il a été démontré que Abl possède aussi une fonction biologique qui conduit à l'apoptose de la cellule ; cette fonction sera discutée plus

en détails à la section suivante. Il est à noter que notre modèle cellulaire (HL-60) est déficient pour la protéine de fusion Bcr-Abl et exprime uniquement la forme normale de Abl [465].

### 1.3.3.1 La voie de signalisation ATM-Abl

Le schéma 15 illustre bien la complexité et la diversité de la réponse intracellulaire générée par ATM. ATM active plusieurs joueurs clés impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN. La protéine p53, qui est connue pour effectuer des arrêts en G1 et en G2/M, pour induire l'apoptose et pour participer à la réparation de l'ADN, est phosphorylée directement par ATM, conduisant à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 [466-470]. ATM favorise également la stabilisation de p53 en inactivant par phosphorylation l'inhibiteur Mdm2 qui induit normalement la dégradation de p53. ATM empêche également la dégradation de p53 par un mécanisme indirect : une fois activée par ATM, la kinase Chk2 phosphoryle à son tour p53 sur certains résidus connus pour interférer avec l'interaction existant entre p53 et Mdm2 [471-473]. ATM médit également des arrêts du cycle cellulaire. En activant la kinase Chk1 qui elle-même phosphoryle et inactive la phosphatase cdc25c, ATM favorise un arrêt en transition G2/M du cycle cellulaire. ATM peut également provoquer un arrêt en phase S en activant la kinase Chk2 qui elle-même phosphoryle et inactive la phosphatase cdc25a. [474, 475]. La protéine BRCA1, qui joue un rôle crucial dans la réparation de l'ADN endommagé, est activée directement par ATM et simultanément, ATM inactive CtIP qui agit comme un régulateur négatif de BRCA1 [476, 477]. La protéine Nbs1, qui fait partie du complexe Mre11-Rad50-Nbs1 impliqué dans la réparation des cassures doubles brins, et l'histone H2AX, dont la fonction est de recruter les protéines impliquées dans les mécanismes de réparation aux sites de lésions, sont aussi des substrats de ATM [478-481]. ATM possède la capacité d'induire l'apoptose dans la cellule par l'intermédiaire de p53, tel que mentionné précédemment, mais aussi en utilisant des mécanismes indépendants de la voie p53. Bien que cette dernière voie reste assez nébuleuse, elle pourrait impliquer le facteur de transcription E2F1 et/ou la kinase Abl. En réponse aux dommages subits par le génome, ATM phosphoryle et stabilise le facteur E2F1 et bien que celui-ci puisse aussi induire l'apoptose via p53 [482], des évidences expérimentales suggèrent que E2F1 active directement la transcription de protéines proapoptotiques comme p73, APAF1, la

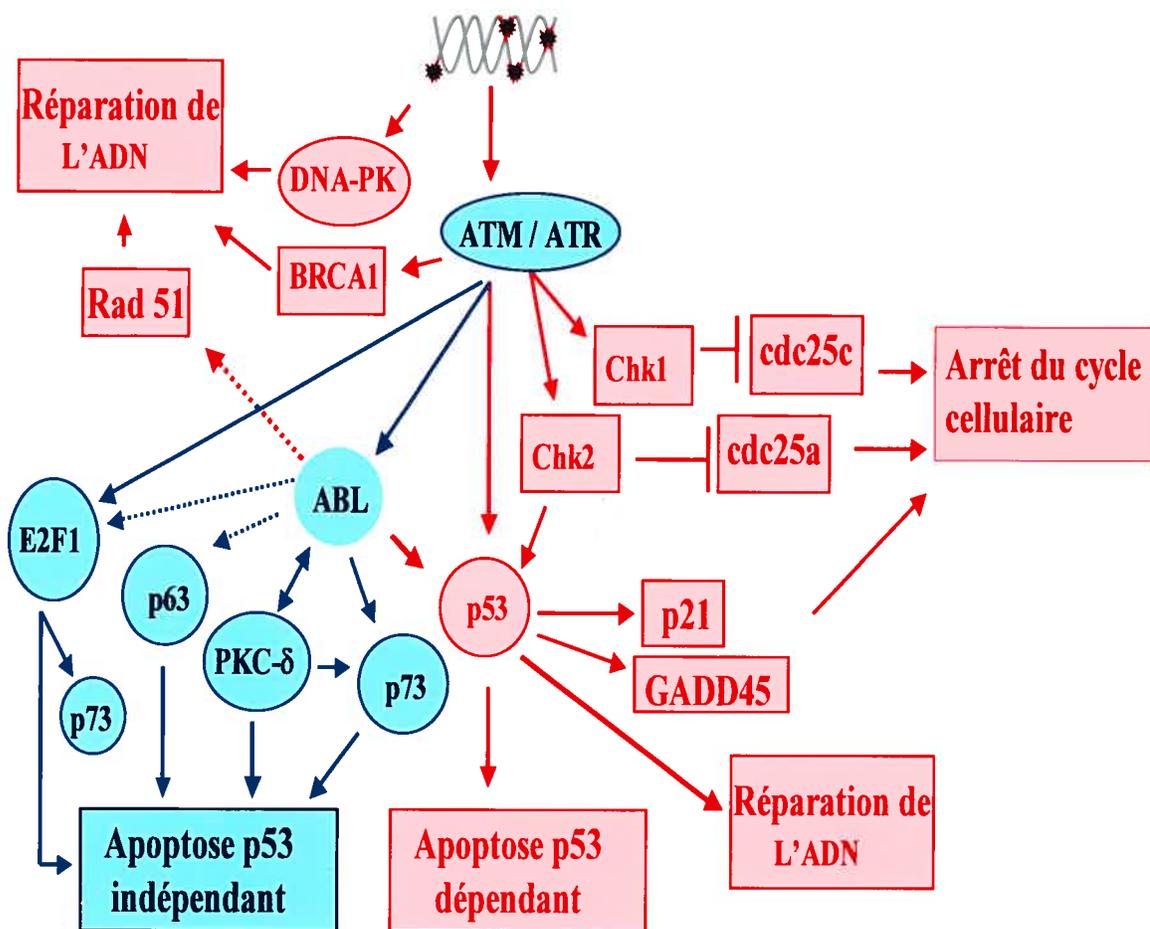


Schéma 15: Voies de signalisation associées à ATM-Abl

procaspase-7 et les protéines BH3-unique telles que Bim, Hrk, Puma/Bbc3 et Noxa [175, 483-491]. Parallèlement à cette voie, ATM phosphoryle Abl qui à son tour pourra induire l'apoptose dans la cellule en activant par phosphorylation p73 et/ou PKC- $\delta$ .

#### **1.3.3.1.1 Les substrats proapoptotiques de Abl : les homologues de p53**

Les protéines p63 et p73 sont considérées comme des homologues de p53 et bien qu'elles possèdent de nombreuses similarités au niveau de leur structure et de leur fonction, elles comportent également de nombreuses différences qui les distinguent de p53. On a identifié trois et six isoformes pour p63 et p73 respectivement, qui sont aussi bien exprimées chez les cellules normales que cancéreuses [492-495]. La structure de ces isoformes comprend généralement différents domaines protéiques tels qu'un domaine de liaison à l'ADN, un domaine d'oligomérisation, un domaine SAM qui médie certaines interactions protéiques et un domaine de transactivation. De plus, les isoformes de p63 et p73 peuvent également être transcrits à partir d'un second promoteur situé en aval, générant une forme tronquée de la protéine pour le domaine N-terminal ( $\Delta Np73\alpha$  ou  $-\beta$ ;  $\Delta Np63\alpha$  ou  $-\beta$ ). Puisque le domaine de transactivation est situé dans le domaine N-terminal de la protéine, les formes  $\Delta Np63\alpha$  ou  $-\beta$  et  $\Delta Np73\alpha$  ou  $-\beta$  agissent comme dominant négatif naturel des isoformes contenant le domaine de transactivation [496]. Tout comme p53, p63 et p73 transactivent les protéines p21 et Bax, médient des arrêts du cycle cellulaire et induisent l'apoptose [496]. Initialement, plusieurs croyaient que le principal rôle de ces homologues était de remplacer p53 lorsque celui-ci était inactivé dans la cellule mais il semble que les trois protéines possèdent des fonctions biologiques bien distinctes. De plus, les trois protéines agissent de concert et coopèrent entre elles puisque la présence de p63 et p73 est requise afin que p53 puisse induire l'apoptose dans la cellule [497]. Ceci dit, d'autres études ont montré que ces homologues peuvent agir indépendamment du statut de p53 dans la cellule [489, 498, 499] Il apparaît que l'importance de p63 et p73 dans l'oncogénèse se distingue également de p53 puisque des mutations dans le gène de p53 ont été observées dans plus de 50 % des tumeurs humaines alors qu'il est complètement inactivé dans 20 % des cas, contrairement à p63 et p73 qui sont rarement mutés dans les tumeurs étudiées [496, 500]. Les mécanismes apoptotiques employés par ces homologues impliquent, dans certains cas, une coopération de p63 et p73 avec p53 afin d'activer la transcription des gènes proapoptotiques ciblés par p53 alors que p73, indépendamment de p53, a la capacité

d'activer directement des gènes proapoptotiques et anti-prolifératifs tels que Bax, Puma, p21, 14-3-3 $\sigma$ , GADD45, BTG2, p53R2, IGF-BP3 et certaines molécules oxydantes proapoptotiques appartenant à la famille des PIGs [174, 501-504]. Des évidences expérimentales ont montré que la kinase Abl induit l'apoptose en activant directement p53 et p73, mais on ignore si l'homologue p63 est également un substrat de cette kinase [505-509].

### 1.3.3.1.2 Les substrats proapoptotiques de Abl : la famille des PKC

La famille des protéines kinases C sont des sérine-thréonine kinases qui participent à différents processus cellulaires tels que la croissance, la différenciation et l'apoptose [510]. On compte plus de 13 isoformes qu'on divise en trois sous-groupes : les PKC classiques ( $\alpha, \beta_1, \beta_2, \gamma$ ) qui sont activées par le DAG et le calcium, les PKC nouvelles ( $\delta_1, \delta_2, \epsilon, \mu, \eta, \theta$ ) qui sont uniquement activées par le DAG et insensibles à l'action du calcium et les PKC atypiques ( $\zeta, \lambda, \iota$ ) qui ne répondent ni au DAG ni au calcium [511]. L'activation des PKC nécessite la phosphorylation de certains résidus présents dans la boucle d'activation par la kinase PDK1 [512]. Comme mécanisme alternatif d'activation, les PKC peuvent aussi être clivées dans leur domaine variable, produisant un fragment actif qui est libéré de l'inhibition médiée par le domaine de régulation de la kinase [513]. L'identification de ces nombreuses isoformes ont poussé les scientifiques à étudier intensivement le rôle de chacune d'elles dans différents systèmes cellulaires. Globalement, les conclusions qu'on peut tirer à partir de ces travaux suggèrent que les isoformes  $\alpha$ ,  $\epsilon$  et  $\iota$  sont associées à la survie cellulaire et à une fonction antiapoptotique [514-516], alors que les isoformes  $\delta_1$ ,  $\theta$  et  $\mu$  ont un rôle proapoptotique dans la majorité des types cellulaires étudiés [517-519]. Malgré quelques études contradictoires qui suggèrent une fonction antiapoptotique pour la PKC- $\delta$  [520, 521], c'est pour cette isoforme que les mécanismes proapoptotiques ont été le mieux caractérisés. Lors de l'apoptose, la caspase-3 active directement la PKC- $\delta$  en effectuant un clivage dans le domaine variable de la kinase [522]. En réponse à des stress oxydatifs ou génotoxiques, la kinase Abl s'associe physiquement avec la PKC- $\delta$  par l'intermédiaire de ses domaines SH<sub>3</sub> et induit l'activation de la PKC. Cette association entre les deux kinases est également importante pour augmenter l'activation de Abl [523, 524]. De plus, la PKC- $\delta$  inhibe la phosphatase SHPTP1, qui régule négativement l'activation de Abl, et favorise donc l'activation de cette kinase par un second mécanisme moléculaire

[525]. Dans certains contextes, la PKC- $\delta$  est transloquée à la mitochondrie et est associée au relâchement du cytochrome c et à l'activation de la procaspase-9 [526, 527]. D'autres évènements apoptotiques ont été reliés à l'activation de la PKC- $\delta$  comme une augmentation de la production des céramides et une augmentation de la fragmentation de l'ADN [527, 528]. La PKC- $\delta$  favorise aussi le désassemblage des structures nucléaires en phosphorylant les lamines et inhiberait l'activité associée aux DNA-PK. Cette interférence dans les mécanismes de réparation de l'ADN favoriserait le déclenchement de l'apoptose [529]. Récemment, certains scientifiques ont remarqué une association physique entre la PKC- $\delta$  et p73 $\beta$ , conduisant à la phosphorylation de p73 $\beta$  dans son domaine de transactivation. De plus, une corrélation existe entre l'activité kinase de PKC- $\delta$  et l'accumulation de p73 $\beta$  dans la cellule [530]. PKC- $\delta$  peut donc représenter dans certains cas un lien intermédiaire important dans la voie de signalisation proapoptotique Abl-p73.

### 1.3.3.2 Le rôle de la voie ATM-Abl dans la chimiothérapie

Depuis longtemps, on considère que la principale fonction biologique de ATM est de protéger la cellule des lésions génotoxiques en favorisant l'activation des mécanismes de réparation et l'induction de l'apoptose, et en s'appuyant sur une abondante littérature, ces principes s'étendent aux cellules cancéreuses traitées avec des agents chimiothérapeutiques. L'étoposide, le méthotrexate et de nombreux agents anticancéreux induisant des dommages à l'ADN induisent une forme d'apoptose dépendante de ATM, contrairement aux drogues qui emploient des mécanismes qui n'affectent pas le génome comme la staurosporine [531, 532]. Néanmoins, la réponse médiée par ATM dans la cellule cancéreuse varie grandement. À titre d'exemple, dans certaines lignées cellulaires, ATM ne participe en aucune façon à l'apoptose p53 dépendante induite par les composés anticancéreux tels que le cisplatine ou le taxol [533]. Au sein d'autres lignées, l'inactivation d'ATM sensibilise les cellules à l'action de drogues comme la camptothécine, le topotecan, l'étoposide, la doxorubicine, l'épirubicine et le méthotrexate mais n'a aucune influence sur l'effet du cisplatine ou le taxol [534]. D'autres études avancent que ATM activerait directement une voie de protection en phosphorylant la kinase MEK et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, ce qui favoriserait la survie des cellules tumorales traitées avec la doxorubicine [535]. La réponse de Abl, suite au traitement avec des agents chimiothérapeutiques, implique une distinction importante entre la forme normale de Abl et la forme Bcr-Abl, qui dans la plus part des cas, est

associée à une réponse antiapoptotique et au développement de la résistance tumorale [536, 537]. D'ailleurs, l'efficacité antitumorale du STI571 (GLEEVEC®), contre certaines formes de leucémies résistantes à l'action de la chimiothérapie classique repose principalement sur sa capacité de cibler et d'inhiber la protéine de fusion Bcr-Abl [538, 539]. Une prépondérance d'études suggèrent que généralement, la forme normale de Abl est impliquée dans l'élimination des cellules cancéreuses traitées avec des agents chimiothérapeutiques. Il a été démontré que Abl était impliqué dans l'apoptose induite par certains composés tels que le cisplatine, la camptothécine, l'étoposide, la mytomycine C et le taxol [540-542].

#### **1.4 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**

Les gens qui ont acquis une grande sagesse vous diront que pour vaincre son ennemi, on doit connaître tout de son adversaire : ses forces comme ses faiblesses. Ce précieux conseil est d'autant plus juste au sujet du cancer. L'amélioration des thérapies actuelles et la découverte de nouveaux médicaments nécessitent une parfaite compréhension de cette maladie et des mécanismes moléculaires impliqués. La découverte de l'apoptose et des mécanismes de régulation qui caractérisent ce processus représente sans contredit une percée scientifique majeure, qui a permis de comprendre de quelle manière les agents anticancéreux arrivent à éliminer les cellules tumorales. Ceci dit, il reste encore de nombreuses questions obscures et les mécanismes moléculaires précis demandent à être élucidés.

Suite à un traitement avec la camptothécine, l'étoposide ou tout autre agent chimiothérapeutique connu pour induire des dommages à l'ADN, la réponse cellulaire qui est générée est extrêmement complexe et diversifiée. La cellule peut effectuer des arrêts de son cycle cellulaire au stade G1, S, G2 ou M, activer les mécanismes de réparation de l'ADN, se réfugier dans un état de sénescence, ou encore induire rapidement des programmes de mort cellulaire, tels que l'apoptose ou la nécrose [618-621]. Le type de réponse cellulaire dépend de plusieurs facteurs, notamment du type d'agent chimiothérapeutique utilisé, son mécanisme d'action primaire, sa concentration, le mode d'administration (ex: traitement basé sur une courte ou longue période d'exposition) et évidemment, du profil génétique de la cellule tumorale ciblée [629]. Suite à un traitement

de courte durée (30 min) avec la camptothécine (1.0  $\mu\text{M}$ ) ou l'Étoposide (50  $\mu\text{M}$ ), les lignées leucémiques HL-60 et U937 ont été décrites pour activer rapidement leur programme de mort cellulaire par apoptose (2-3 h post-traitements), au contraire de d'autres lignées cellulaires dont la première réponse est d'activer un point-contrôle du cycle cellulaire, résultant à un arrêt à une phase spécifique du cycle. Initialement isolées à partir du sang périphérique de patients atteints de leucémie, ces cellules cancéreuses sont connues pour avoir des délétions importantes au niveau des 2 allèles du gène p53 dans le cas des cellules HL-60 et d'une mutation ponctuelle qui inactive le gène dans le cas des cellules U937 [622-626]. Ces lignées cellulaires représentent donc des modèles particulièrement intéressants pour étudier les mécanismes cellulaires activés suite aux dommages à l'ADN médiés par la camptothécine et l'Étoposide lors de l'induction rapide de l'apoptose. Ces caractéristiques ont d'ailleurs été à la base de la sélection de la lignée HL-60, comme un des 60 modèles étalons dans le programme de criblage des nouvelles drogues anticancéreuses développées par l'Institut National du Cancer des États-Unis (NCI-USA) [617]. Dans nos études, des courts traitements de 30 min à des concentrations de 1  $\mu\text{M}$  pour la CPT et de 50  $\mu\text{M}$  pour le VP16 ont donc été choisies sur la base de ces travaux qui avaient démontré qu'à ces conditions, ces concentrations étaient suffisamment élevées pour vaincre les arrêts du cycle cellulaire et induire rapidement l'apoptose dans ces lignées cellulaires, et suffisamment faible pour induire une réponse spécifique au mécanisme d'action de ces drogues [627, 628].

C'est donc à partir de ce contexte scientifique que nous avons tenté de comprendre par quels mécanismes les inhibiteurs de topoisomères I et II, soit la camptothécine et l'Étoposide, peuvent induire la mort par apoptose des cellules leucémiques HL-60. Précédant mes études de doctorat, il avait été démontré que les cellules HL-60 traitées à la camptothécine ou à l'Étoposide activaient certaines caspases (ex. : caspase-3 et -9) ainsi que la voie mitochondriale de l'apoptose [60, 103, 104, 105]. Néanmoins, bien que les progrès réalisés furent capitaux et que nous connaissions maintenant certaines constantes de l'équation, aujourd'hui encore nous ignorons précisément l'identité des effecteurs impliqués dans la transmission du signal à partir du génome endommagé vers la mitochondrie, constituant un chaînon manquant dans la signalisation apoptotique. Évidemment, un grand nombre de scientifiques se sont intéressés à cette question et

pendant les années qui suivirent le début de mes travaux, un certain nombre d'observations scientifiques permirent de répondre partiellement à cette question. Au cours des dernières années, les pistes les plus prometteuses (que nous discuterons plus en détails au chapitre IV) furent le rôle des petites molécules proapoptotiques appartenant à la famille des BH3 unique pouvant agir comme navette entre le noyau et la mitochondrie. Très récemment, Konishi et ses collaborateurs ont proposé que l'histone H1.2 reconnaîtrait la chromatine endommagée et par la suite quitterait le noyau pour atteindre la mitochondrie et induire l'apoptose [543]. Précédant l'avènement de ces découvertes, c'est avec l'intention d'identifier le ou les élément(s) impliqué(s) dans la transmission des signaux nucléaires à la mitochondrie que j'ai amorcé mes travaux de recherche concernant différentes voies de signalisation dans la cellule.

Les objectifs spécifiques de mon projet de recherche se divisent essentiellement en trois parties. Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle biologique des voies de signalisation associées aux récepteurs de la mort cellulaire dans l'apoptose induite par la camptothécine et l'étoposide. La deuxième partie de mon travail concernait l'implication potentielle des voies de signalisation associées aux mapkinases et au facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans l'apoptose induite par ces composés anticancéreux. Nous avons aussi déterminé si le rôle de ces voies de signalisation dans l'apoptose était dépendant ou indépendant des récepteurs de la mort cellulaire. Finalement, nous avons concentré nos efforts sur la voie de signalisation ATM-Abl et avons tenté de définir l'importance de cette voie de signalisation dans l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques

## **Chapitre II**

# **MÉTHODOLOGIE**

## 2.1 RÉACTIFS ET MATÉRIELS

Les précurseurs radioactifs [2-<sup>14</sup>C]-thymidine (59 mCi/mmol) utilisés pour marquer l'ADN proviennent de ICN BioMedicals (Costa Mesa, CA). La protéine recombinante hTRAIL a été obtenue de Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA), alors que les protéines recombinantes hTWEAK et hTL1A proviennent de R&D Systems (Minneapolis, MN). La camptothécine et l'étoposide ont été obtenus de Sigma Chemical CO. (St-Louis, MO), alors que l'anisomycine provient de Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA). Ces drogues ont été solubilisées dans le DMSO avant d'être utilisées pour les expériences. Les peptides fluorescents Ac-DEVD-AMC, z-IETD-AFC et Ac-LEHD-AFC, utilisés comme substrats de caspases, ont été achetés chez Bachem Biosciences Inc. (King of Prussia, PA) et Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA). Les caractéristiques techniques concernant les anticorps utilisés dans cette étude sont présentées au tableau I. Les inhibiteurs chimiques proviennent de différentes sources. Le rottlerin a été acheté chez Biomol Research Laboratories (Plymouth, PA), alors que le SB202190 et le SB203580 ont été obtenus de Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA). Le STI571 provient de Novartis (Dorval, QC). Tous les autres composés chimiques et réactifs ont été fournis par Sigma, ICN et autres sources locales.

## 2.2 CULTURE CELLULAIRE, CLONAGE DE L'ADN, TRANSFECTION, MARQUAGE DE L'ADN ET TRAITEMENT AVEC LES DROGUES

Les lignées cellulaires HL-60 et U937 ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA). Les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humide, à 37°C et avec 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu RPMI 1640 enrichi de 10% de sérum de veau fœtal inactivé, de 100 U/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine constituait le milieu de croissance de base pour ces deux lignées cellulaires. Tous les produits nécessaires à la culture cellulaire proviennent de Life Technologies Inc. (Grand Island, NY) et Wisent (Montréal, QC). Les vecteurs d'expression pCDNA3(neo)ΔNp73α et pCDNA3(neo)ΔNp73β ont été aimablement offerts par Dr W.G Kaelin (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA) [489] alors que les vecteurs pCDNA3.1(hygro)ΔNp63α et pCDNA3.1(hygro)ΔNp63β ont été obtenus de Dr B. Trink (Johns Hopkins Medecine, Baltimore, MD) [544].

ANTICORPS	ANIMAL	TYPE SÉRUM	RÉFÉRENCE	COMPAGNIE
Abl	rabbit	polyclonal	2862	Cell Signaling Technology (Hornby, ON)
caspase-8	rabbit	polyclonal	559932	Pharmingen Inc. (San Diego, CA)
Crk-L	rabbit	polyclonal	C-20	Santa Cruz (Santa Cruz, CA)
DR3	rabbit	polyclonal	06-839	Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)
DR4	rabbit	polyclonal	66891N	Pharmingen Inc. (San Diego, CA)
FADD	mouse	monoclonal	A66-2	Pharmingen Inc. (San Diego, CA)
Fas	rabbit	polyclonal	SC-715	Santa Cruz (Santa Cruz, CA)
FLAG	mouse	monoclonal	M2	Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)
HA	mouse	polyclonal	12CA5	Roche Diagnostics (Laval, QC)
FLIP- $\delta/\gamma$	rabbit	polyclonal	343006	Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA)
JNK	rabbit	polyclonal	9252	Cell Signaling Technology (Hornby, ON)
MKK3	rabbit	polyclonal	9232	Cell Signaling Technology (Hornby, ON)
p38	rabbit	polyclonal	9212	Cell Signaling Technology (Hornby, ON)
p63	mouse	monoclonal	Ab-1	Oncogene Research Products (San Diego, CA)
p73	mouse	monoclonal	Ab-2	Oncogene Research Products (San Diego, CA)
phospho-Abl	rabbit	polyclonal	2861	Cell Signaling Technology (Hornby, ON)
phospho-JNK	rabbit	polyclonal	9251	Cell Signaling Technology (Hornby, ON)
phospho-MKK3/6	rabbit	polyclonal	9231	Cell Signaling Technology (Hornby, ON)
Phospho-MKK4	rabbit	polyclonal	9151	Cell Signaling Technology (Hornby, ON)
phospho-p38	rabbit	polyclonal	9211	Cell Signaling Technology (Hornby, ON)
Phospho-PKC- $\delta$	rabbit	polyclonal	9374	Cell Signaling Technology (Hornby, ON)
PKC- $\delta$	rabbit	polyclonal	06-990	Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)
SODD	rabbit	polyclonal	SC-8980	Santa Cruz (Santa Cruz, CA)
TRADD	mouse	monoclonal	B36-2	Pharmingen Inc. (San Diego, CA)

INHIBITEUR	CIBLE	CONDITION	RÉFÉRENCE	COMPAGNIE
SB202190	p38	5 $\mu$ M	559388	Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA)
SB203580	p38	10 $\mu$ M	559389	Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA)
ROTTLERIN	PKC- $\delta$	10 $\mu$ M	EI-270	Biomol Ressearch Laboratories (Plymouth, CA)
STI571	Abl	10 $\mu$ M	N.D	Novartis (Dorval, Qc)
anisomycine	stimule MAPK	50 $\mu$ g/ml	176880	Calbiochem-Novabiochem Corporation (San Diego, CA)

**Tableau I: Information sur la provenance ainsi que les caractéristiques techniques des anticorps et composés chimiques utilisés dans le cadre de cette étude**

Les vecteurs d'expression pRc(CMV)I $\kappa$ B(SR), pRK-FLAG-SODD et pcDNA3-GFP-FADD (80-208) ont été offerts par le Dr K. H. Vousden (National Cancer Institute, Frederick, MD) [545], le Dr W. Liu (Tularik Inc., San Francisco, CA) [308] et le Dr H. Wajant (Institut fuer Zelbiologie und Immunologie, Stuttgart, Germany) [546], respectivement. À partir du vecteur d'expression pRK-MYC-TRADD obtenu du Dr Goeddel (Tularik Inc., San Francisco, CA) [547], nous avons généré une délétion dans le domaine N-terminal pour les acides aminés 1 à 108 de TRADD (TRADD-DN) [548] en utilisant la technique PCR et des amorces spécifiques contenant la séquence *BamHI*. Le dominant négatif DAP3-DN, produit d'une délétion des acides aminés 231 à 398 [279] situés dans le domaine carboxy-terminal, a été produit à partir de la technique RT-PCR et de l'ARN polyA(+) extrait des cellules HL-60, en utilisant des amorces spécifiques contenant les séquences *NotI*. Les fragments amplifiés ont été clonés dans le vecteur pCR2.1 TOPO vector (TA cloning system; Invitrogen, San Diego, CA) et séquencés. Par la suite, ces fragments d'intérêts ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression eucaryotique pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) aux sites de restriction *BamHI* et *NotI*, respectivement. Ce vecteur a été modifié préalablement pour inclure une séquence correspondant à l'hémagglutinine (HA-Tag) et une séquence consensus KOZAK [549]. Toutes les transfections ont été réalisées à partir de 10  $\mu$ g de chacun des plasmides purifiés et de  $10 \times 10^6$  cellules, par électroporation à 0.27 kV (Gene Pulser, Bio-Bad, Hercules, CA).

Pour les expériences qui nécessitaient un marquage de l'ADN, les cellules ont été cultivées en présence de [2- $^{14}$ C]-thymidine (0.02  $\mu$ Ci/ml) pour une période de 24 heures. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec du milieu frais et resuspendues dans du milieu sans agent radioactif pour la nuit, avant que soient effectués les essais biologiques qui consistaient à procéder aux expériences de transfection ou effectuer un pré-traitement d'une heure avec l'anisomycine (50  $\mu$ g/ml), les inhibiteurs SB202190 (5  $\mu$ M), SB203580 (10  $\mu$ M), rottlerin (10  $\mu$ M) ou STI571 (10  $\mu$ M). Suivant cette étape, ces cellules étaient utilisées pour le traitement avec les agents chimiothérapeutiques, soit la camptothécine (1.0  $\mu$ M) ou l'étoposide (50  $\mu$ M). Après 30 minutes d'exposition à la CPT ou le VP16, les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans du milieu frais, sans agents anticancéreux. Les expériences concernant les ligands TRAIL (250 ng/ml), TWEAK

(500 ng/ml) et TL1A (500 ng/ml) ont été réalisées en ajoutant les ligands pendant et après la période de traitement avec les agents chimiothérapeutiques.

### 2.3 QUANTIFICATION DES ACTIVITÉS DE CASPASE

Les cellules ont été lysées à 4°C pour une période de 30 minutes dans un tampon d'extraction composé de 100 mM Hepes (pH 7.5), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 20% (v/v) glycérol et 0,1% (v/v) NP-40. Les échantillons ont été centrifugés à 10 000 g pour une période de 10 minutes à 4°C et les surnageants ont été récoltés. L'activité caspase a été estimée en mesurant la fluorescence émise par le clivage des substrats peptidiques en utilisant un fluoromètre LS 50B (Perkin-Elmer). L'activité associée au clivage du peptide Ac-DEVD-AMC a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 380 nm et à une longueur d'onde d'émission de 460 nm alors que l'activité associée aux substrats z-IETD-AFC et Ac-LEHD-AFC a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 400 nm et à une longueur d'onde d'émission de 505 nm.

Les réactions ont été effectuées dans une cuvette de spectrophotomètre dont la température a été maintenue à 37°C. En se basant sur les travaux de Nicholson et ses collaborateurs [550], nous avons utilisé des conditions optimales pour mesurer l'activité des différentes caspases. Les activités DEVDase et IETDase ont été mesurées dans un tampon de réaction constitué de 100 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10% (v/v) glycérol, 0,1% (w/v) CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA et 200 µM de substrats peptidiques. L'activité LEHDase a été mesurée dans un tampon de réaction contenant 100 mM MES (pH 6.5), 10% PEG<sub>8000</sub>, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA et 500 µM de Ac-LEHD-AFC. L'activité enzymatique a été déterminée en mesurant la vitesse initiale et est exprimée en intensité relative par minute par mg de protéines. Les résultats sont exprimés en activité relative déterminée en fonction de l'activité mesurée dans les cellules traitées divisé par l'activité mesurée dans les cellules contrôles.

## 2.4 ANALYSE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN

Afin de visualiser la fragmentation de l'ADN sous forme d'échelle, une caractéristique des cellules apoptotiques, l'ADN cellulaire a été extrait par une procédure classique avant d'être chargé sur un gel d'agarose 1,6% (w/v) préalablement saturé au bromure d'éthidium. L'électrophorèse a été effectuée dans un tampon TRIS-acétate (pH 8.0). L'utilisation de la technique d'éluion sur filtre a permis de quantifier la fragmentation de l'ADN associé à l'apoptose. Environ  $5 \times 10^5$  cellules préalablement marquées au  $[2-^{14}\text{C}]$ -thymidine ont été chargées sur un filtre d'acrylique (Metricel membranes,  $0.8 \mu\text{M}$ , 25 mm de diamètre, Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, MI) et ont été lavées dans 5 ml de PBS. Après que la solution de lavage soit passée par gravité au travers du filtre, les cellules présentes sur le filtre ont été lysées en ajoutant 5 ml de solution de lyse (0.2% (w/v) Sarkosyl de sodium, 2 M NaCl, 0.04 M EDTA, pH 10.0). Suivant l'étape de lyse, le filtre a été lavé avec 5 ml de 0,02 M EDTA (pH 10,0). Les filtres ont été déposés dans un vial à scintillation auquel 1 ml de HCl (1.0 N) a été ajouté pour dépuriner l'ADN. Une fois refermés, les vials ont été chauffés à  $60^\circ\text{C}$  pour une période d'une heure suivi par l'ajout de 2,5 ml de NaOH (0,4 N) afin de neutraliser l'acide. Les vials ont subi une période de repos d'une heure à la température de la pièce pour permettre le relâchement de l'ADN du filtre. La radioactivité a été mesurée par un spectromètre à liquide à scintillation pour chacune des fractions (PBS, lyse, EDTA et le filtre). La fragmentation de l'ADN a été déterminée en mesurant la radioactivité présente dans les fractions contenant le PBS + lyse + EDTA par rapport à la quantité totale d'ADN (PBS + lyse + EDTA + filtre). Les résultats sont représentés en fonction du pourcentage de l'ADN fragmenté dans les cellules traitées comparé à l'ADN fragmenté des cellules contrôles. La formule suivante a été utilisée pour calculer les pourcentages de fragmentation de l'ADN :

$$(F - F_0 / 1 - F_0) \times 100$$

où F représente la fragmentation de l'ADN des cellules traitées et  $F_0$ , la fragmentation de l'ADN des cellules contrôles [551].

## 2.5 ANALYSE D'IMMUNOHISTOCHEMIE

Environ  $1 \times 10^5$  de cellules contrôles et traitées avec la camptothécine ou l'étoposide ont été projetées sur une lame de verre par cyto-centrifugation et fixées dans l'éthanol pendant dix minutes, puis séchées à l'air pour une période de dix minutes. Pour l'analyse d'immunofluorescence, les sites non spécifiques ont été bloqués avec 5% (w/v) de BSA en présence d'anticorps non spécifiques (anti-mouse IgG, 15 µg/ml; Vector Laboratories, Birmingham, CA) puis les lames ont été lavées dans le PBS et incubées avec l'anticorps primaire (10 µg/ml) pendant une heure à la température de la pièce. Après plusieurs lavages dans le PBS, les lames ont été sondées avec un anticorps secondaire couplé au FITC (10 µg/ml) (Vector Laboratories) pendant une heure à la température de la pièce.

Pour l'analyse à l'immunoperoxidase, l'activité endogène de la peroxidase a été bloquée avec une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) pendant 15 minutes. Les lames ont été sondées et colorées avec les réactifs provenant du kit commercial Vectastain ABC Elite kit, selon le protocole du manufacturier (Vector Laboratories). Les images ont été produites avec un microscope Nikon Optiphot-2 équipé d'une caméra CCD (Model DC330E, Dage MTI Inc., Michigan, IN) relié à un ordinateur PC. Toutes les images ont été analysées avec le logiciel Clemex Vision (version 3.0.036, Longueuil, QC).

## 2.6 ANALYSE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE PAR DES BUVARDAGES DE TYPE WESTERN ET LA CYTOMÉTRIE DE FLUX

Pour la technique de buvardage de type Western, les cellules ont été prélevées, puis lysées dans un tampon de lyse contenant 5 mM Hepes pH 7.4, 160 mM KCl, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 0,5% (v/v) NP-40, 5mM pyrophosphate, 1 mM PMSF, 1 mM NaVO<sub>4</sub> et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete™, Roche Molecular Biochemicals, Montréal, QC) à 4 °C pour 30 minutes. Après avoir centrifugé les cellules à 10 000 g pendant dix minutes, le surnageant a été récolté comme extrait protéique et conservé à -80°C. Les protéines ont été chargées sur un gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE).

Suite à l'électrophorèse, les protéines ont été électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose et après avoir bloqué les sites non spécifiques avec du lait en poudre 5% (w/v) préparé dans du PBS-T (PBS, 0,1% (v/v) Tween-20), les membranes ont été incubées toute la nuit avec l'anticorps primaire (1.0 µg/ml). Après avoir été lavées quatre fois dans le PBS-T, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire (1.0 µg/ml) correspondant (Amersham Life Science, Piscataway, NS) pendant une heure. Après avoir été lavées plusieurs fois dans le PBS-T, les protéines d'intérêt ont été visualisées par ECL (Amersham Life Science). Pour certaines expériences, les films exposés ont été soumis à des analyses de densitométrie, afin de quantifier l'intensité relative des différentes bandes en utilisant le système Alpha Imager 2000 (Alpha Innotech Corporation, San Jose, CA). Dans le cas où les membranes ont été ré-hybridées, celles-ci ont été incubées pendant 30 minutes avec agitation dans un tampon PBS contenant 7 µl/ml de β-mercaptoethanol et du SDS 2%. (w/v). Ensuite les membranes ont été lavées dans du PBS puis conservées à 4°C pour une utilisation ultérieure.

Pour les analyses de cytométrie de flux, les cellules ont été fixées et perméabilisées dans une solution d'acétone-méthanol (1 :1), puis incubées avec les anticorps primaires (5.0 µg/ml) pour une heure à 4 °C. Après avoir été lavées trois fois dans le PBS, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé au FITC (10 µg/ml) (Vector Laboratories) pour une période d'une heure à 4°C. L'intensité de la fluorescence a été mesurée avec un cytomètre de Flux Coulter Epic XL (Beckman-Coulter Canada Inc., Montréal, QC).

## 2.7 ANALYSES DE CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Les analyses de chromatographie ont été réalisées sur des colonnes Superose 6 HR 16/50 connectées à un système de FPLC (Amersham Life Science). Les tampons d'équilibre, de lyse et d'éluion étaient composés de PBS, NP-40 1% (v/v) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete™, Roche Molecular Biochemicals). Les extraits cellulaires ont été préparés à partir de  $5 \times 10^8$  de cellules contrôles et autant de cellules suite aux traitements à la camptothécine ou à l'étoposide. Les cellules ont par la suite été centrifugées et lysées dans 500 µl de tampon. Après centrifugation (10 000 g X 10 min.), les extraits protéiques

solubles (500  $\mu$ l) ont été injectés dans la colonne. L'étape d'élution de la colonne s'est effectuée à un débit constant de 500  $\mu$ l/min. et des fractions de 2,5 ml ont été récoltées à cinq minutes d'intervalle. Les colonnes ont été calibrées avec les standards suivants : ribonucléase A (13.7 kDa; 16 Å); chymotrypsine (25 kDa; 20,9 Å); ovalbumine (43 kDa; 30,5 Å); albumine (67 kDa; 35,5 Å); aldolase (158 kDa; 48,1 Å); catalase (232 kDa; 52,2 Å); apoferritine (440 kDa; 61 Å); thyroglobuline(669 kDa; 85 Å). Le volume libre (*void*) correspond à l'élution du bleu de Dextran 2000. Suivant la chromatographie, des échantillons de 80  $\mu$ l provenant de chacune des fractions ont été analysés par buvardage de type Western.

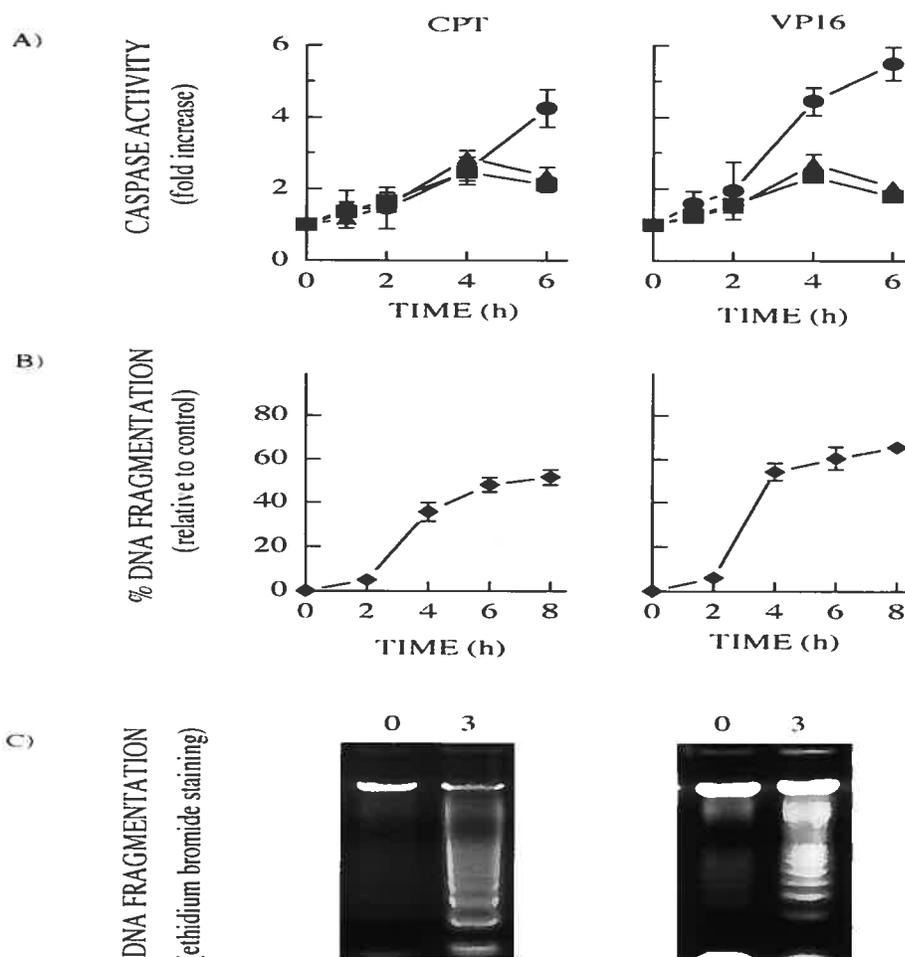
## **Chapitre III**

### **RÉSULTATS**

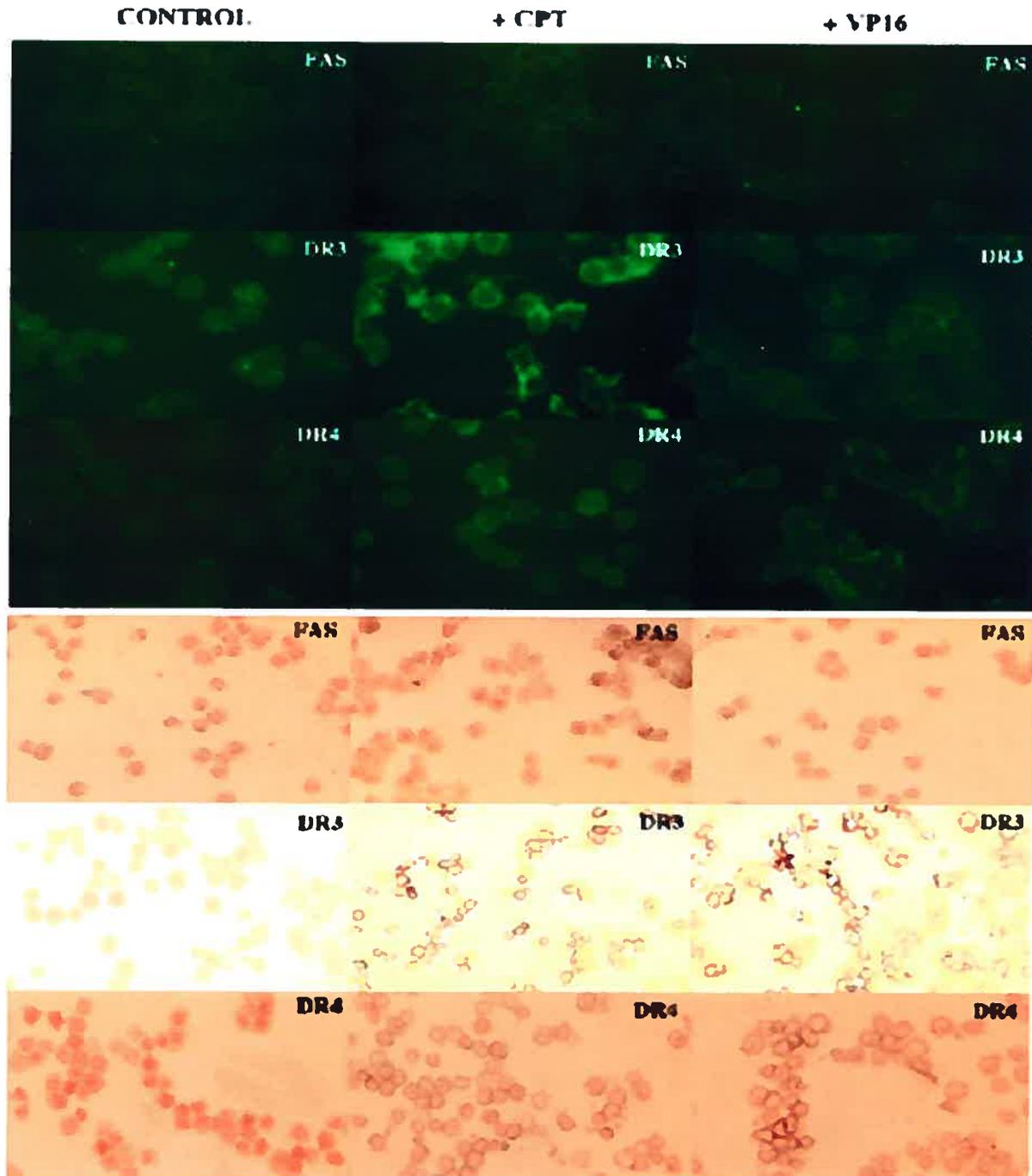
### 3.1 L'AGRÉGATION DES RÉCEPTEURS DE LA MORT CELLULAIRE À LA SURFACE DES CELLULES HL-60 SUITE AU TRAITEMENT AVEC LA CAMPTOTHÉCINE ET L'ÉTOPOSIDE

La capacité de la CPT ou du VP16 à induire l'apoptose dans les cellules HL-60 avait déjà été rapportée par le passé [551-554]. De courts traitements de 30 minutes avec la CPT ou le VP16 induisent une rapide activation des caspases apparentées à la famille des caspases-3 (activité DEVDase), à la famille des caspases-8 (activité IETDase) et à la famille des caspases-9 (activité LEHDase) (Figure 1A), suivi par la fragmentation de l'ADN (Figure 1B-C). La fragmentation de l'ADN a été quantifiée par la technique d'élution sur filtre (Figure 1B) et l'échelle d'ADN, caractéristique typique des cellules apoptotiques, a été visualisée sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium (Figure 1C). L'induction rapide de l'activité IETDase (caspases apparentées à la caspase-8) et LEHDase (caspases apparentées à la caspase-9) pourrait suggérer la participation des voies de signalisation associées aux récepteurs de la mort cellulaire (RMC) et/ou de la voie mitochondriale dans l'apoptose induite par la CPT ou le VP16. Cependant, plusieurs études ont révélé que l'activation de la caspase-8 peut se produire indépendamment des RMC [214, 328, 555-559].

Dans le but d'évaluer plus directement la participation des RMC DR3, DR4 et Fas dans l'apoptose induite par la CPT ou le VP16, nous avons tout d'abord évalué si les RMC avaient la capacité de s'oligomériser à la surface de la cellule en utilisant deux techniques d'immunohistochimie soit l'utilisation d'anticorps liés à la FITC ou d'anticorps couplés à la peroxidase (Figure 2). Normalement, les RMC sont présents sous forme de protéines monomériques dans les cellules au repos, mais suite à leur activation, les RMC s'oligomérisent sous forme de complexes protéiques de haut poids moléculaire qui peuvent être visualisés comme de denses agrégats à la surface de la cellule à l'aide de techniques d'immunohistochimie. L'exposition des cellules HL-60 à la CPT ou au VP16 induit la formation d'agrégats contenant le récepteur DR3. La densité de la fluorescence et de la coloration à la peroxidase émises par ces agrégats sont beaucoup plus importantes que ce qui a été observé dans les cellules contrôles (Figure 2). De façon similaire, le traitement au VP16 induit une importante formation d'agrégats contenant le récepteur DR4, alors que le



**Figure 1: Cinétique de l'activation des caspases et de la fragmentation de l'ADN chez les cellules HL-60 traitées à la camptothécine et à l'étoposide.** Les cellules ont été traitées avec la CPT (1.0  $\mu$ M; panneau de gauche) ou au VP16 (50  $\mu$ M; panneau de droite) pour une période de 30 minutes suivie par l'incubation des cellules dans du milieu frais sans agents chimiothérapeutiques. **A)** Aux temps indiqués suivant le traitement à la CPT ou au VP16, l'activité DEVDase(●), IETDase(■) et LEHDase(▲) a été déterminée en mesurant la vitesse initiale et est exprimés en fonction des résultats obtenus dans les cellules contrôle illustrant de combien de fois l'activité caspase mesurée est supérieure dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles. Chaque points correspond à la moyenne des résultats obtenus à partir de trois expériences différentes  $\pm$  SE. **B)** Les cellules HL-60 qui ont été préalablement marquées avec la ( $^{14}$ C)-thymidine ont été traitées à la CPT ou au VP16 et aux temps indiqués suivant le traitement, la fragmentation de l'ADN a été évaluée par la technique d'éluion sur filtre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fragmentation de l'ADN et chaque points représentent la moyenne des résultats obtenus à partir de trois expériences différentes  $\pm$  SE. **C)** L'ADN total a été extrait à partir des cellules contrôles et des cellules traitées avec la CPT ou au VP16 pour le temps 3 h suivant le traitement. La fragmentation de l'ADN a été visualisée en effectuant un électrophorèse sur gel d'agarose préalablement coloré au bromure d'éthidium.

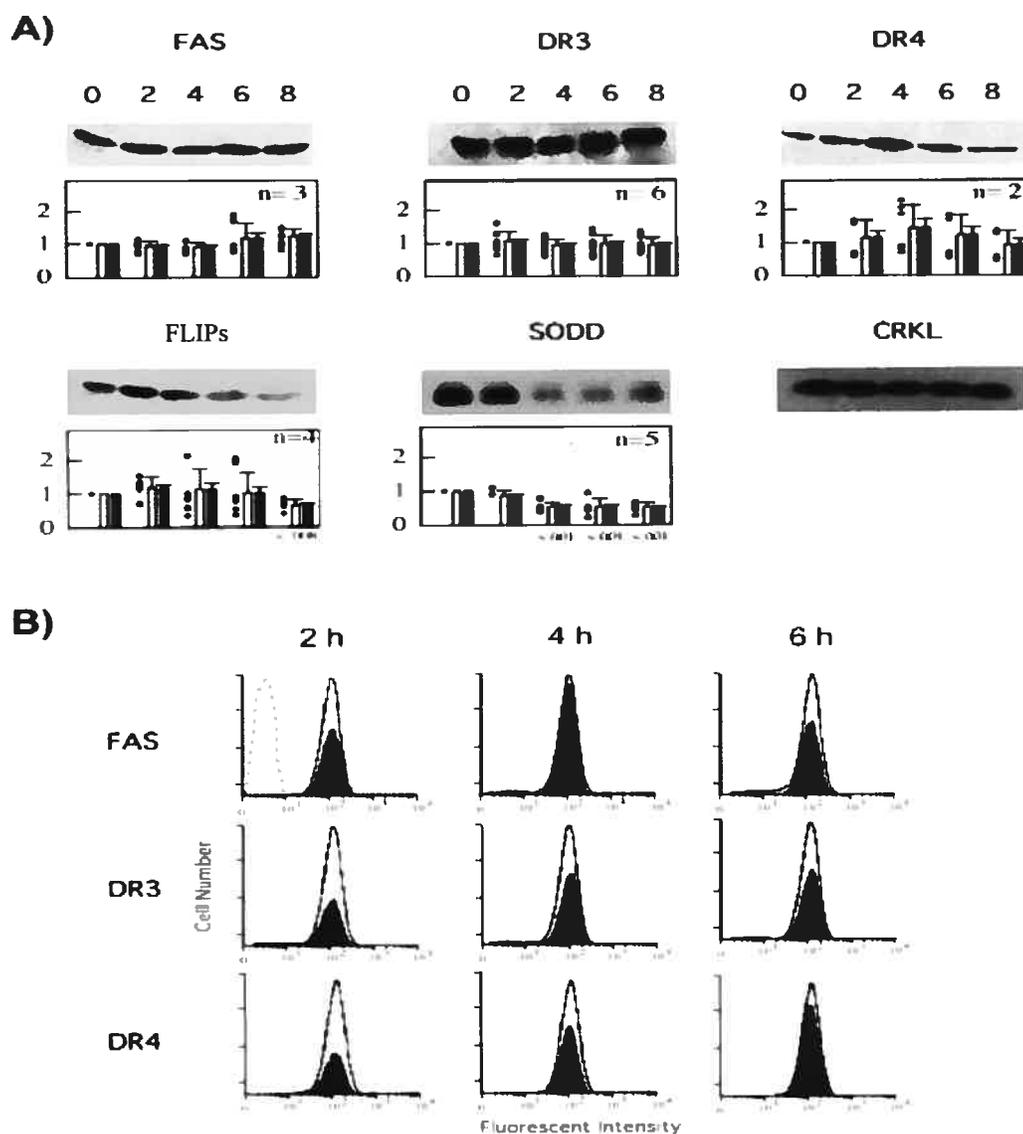


**Figure 2: Effet de la camptothécine et de l'étoposide sur l'agrégation des récepteurs Fas, DR3 et DR4 à la surface des cellules HL-60.** Les cellules ont été soit non-traitées (control; panneau de gauche) soit traitées avec la CPT (1.0  $\mu\text{M}$ ; panneau du milieu) ou le VP16 (50  $\mu\text{M}$ ; panneau de droite) pour une période de 30 minutes suivie par l'incubation des cellules dans du milieu frais sans agents chimiothérapeutiques. Au temps 4 h suivant le traitement, l'agrégation des récepteurs Fas, DR3 et DR4 a été visualisée par l'immunofluorescence générée à partir d'un anticorps secondaire couplé au FITC (les panneaux du haut) et par un essai à l'immunoperoxidase (panneaux du bas). Les images ont été produites à l'aide d'un microscope Nikon Optiphot-2 équipé d'une caméra CCD (modèle DC330E) refroidit par un système thermoélectrique.

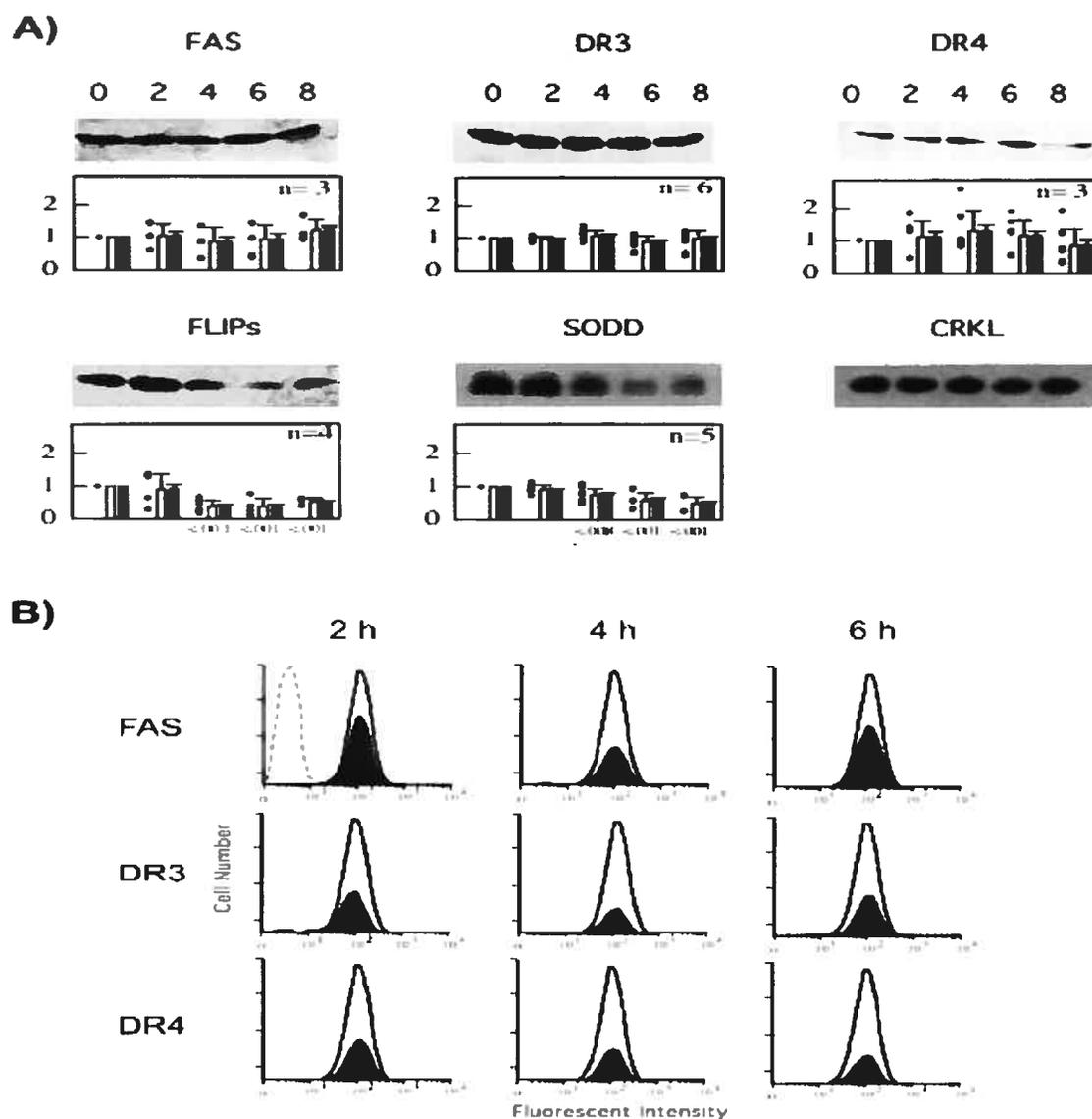
traitement à la CPT induit une réponse plus faible au niveau de ce récepteur (Figure 2). Les analyses d'immunofluorescence ou les essais à l'immunoperoxidase n'ont pas permis la détection d'agrégats de Fas à la surface des cellules traitées avec l'une ou l'autre des drogues, puisque les profils de fluorescence et de coloration émis sont identiques chez les cellules contrôles et les cellules traitées (Figure 2).

Afin de déterminer si l'agrégation des récepteurs DR3 et DR4 résultait d'une augmentation de leur expression suite au traitement avec la CPT ou le VP16, la cinétique d'expression des RMC a été analysée par buvardage de type Western et par des essais d'immunocytofluorométrie. Tel que présenté aux Figures 3A et 4A, le niveau d'expression des récepteurs DR3, DR4 et Fas reste sensiblement le même pour une période de 8 h suivant le traitement des cellules HL-60 avec la CPT ou le VP16. Les variations observées dans certaines expériences ne sont pas significativement différentes selon le test statistique test-t (*student's test* :  $p > 0,05$ ). Au contraire, l'expression de l'inhibiteur FLIPs diminue après les traitements avec la CPT ou le VP16, dont l'effet le plus prononcé a été observé à partir du point 4 h suivant le traitement au VP16 (*student's t-test* :  $p < 0,008$  pour CPT à 8h ;  $p < 0,001$  pour VP16 à 4, 6 et 8h) (Figures 3A-4A). De façon similaire, l'expression de l'inhibiteur SODD diminue également après les traitements à la CPT ou au VP16 (*student's t-test* :  $p < 0,001$  pour CPT à 4, 6 et 8 h ;  $p < 0,008$  pour VP16 à 4 h et  $p > 0,001$  à 6 et 8 h) (Figures 3A-4A).

Afin de confirmer que l'expression de DR3, DR4 et Fas restait inchangé, la quantité totale de protéines a aussi été évaluée par des analyses d'immunocytofluorométrie dans des cellules perméabilisées. L'intensité de la fluorescence observée pour DR3, DR4 et Fas chez les cellules traitées avec l'une ou l'autre des drogues est identique aux cellules contrôles, confirmant que l'expression des RMC n'est pas modulée par ces agents chimiothérapeutiques (Figures 3B-4B). L'ensemble de ces observations indique que l'agrégation des récepteurs DR3 et DR4 à la surface cellulaire ne résulte pas d'une augmentation de leur niveau d'expression puisque des niveaux comparables de protéines ont été détectées dans les cellules contrôles et les cellules traitées avec les agents chimiothérapeutiques étudiés. De plus, la diminution de l'expression des inhibiteurs FLIPs et SODD, suite au traitement à la CPT ou au VP16, pourrait suggérer une participation de ces récepteurs dans l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques étudiés.



**Figure 3: Cinétique d'expression de Fas, DR3, DR4, FLIPs et SODD chez les cellules HL-60 traitées à la camptothécine.** Les cellules ont été traitées avec la CPT ( $1.0 \mu\text{M}$ ) pour une période de 30 minutes suivie par l'incubation des cellules dans du milieu frais sans agent chimiothérapeutique. **A)** Des analyses d'immunobuvardage de type Western ont été effectuées aux temps indiqués. Pour chacune des protéines d'intérêts, un film représentatif des différentes expériences est montré de même qu'un graphique représentant les résultats obtenus suite à la quantification des protéines par densitométrie. Ces analyses ont été effectuées en triplicata pour chacune des expériences. Légende:  $n$  = nombre d'expériences réalisées;  $p$  = valeur attribuée au test statistique *Student's t test*; ● distribution des données; histogramme vide: la moyenne de la quantification  $\pm$  la déviation standard; histogramme coloré: la moyenne de la quantification  $\pm$  l'erreur standard. Les différences avec un  $p < 0.05$  sont considérées comme significatives et sont indiquées sous le graphique. **B)** L'expression des récepteurs Fas, DR3 et DR4 a également été évaluée dans des cellules perméabilisées et marquées avec un anticorps secondaire couplé au FITC. Le profil de distribution de l'immunofluorescence spécifique à chacun des récepteurs a été mesuré par cytométrie de flux aux temps indiqués suivant le traitement à la camptothécine. Légende: courbe vide: cellules non-traitées; courbe colorée: cellules traitées avec la CPT; courbe en pointillé: fluorescence non-spécifique.



**Figure 4: Cinétique d'expression de Fas, DR3, DR4, FLIPs et SODD chez les cellules HL-60 traitées à l'étoposide.** Les cellules ont été traitées avec le VP16 (50  $\mu$ M) pour une période de 30 minutes suivie par l'incubation des cellules dans du milieu frais sans agent chimiothérapeutique. **A)** Des analyses de buvardage de type Western ont été effectuées aux temps indiqués. Pour chacune des protéines d'intérêts, un film représentatif des différentes expériences est montré de même qu'un graphique représentant les résultats obtenus suite à la quantification des protéines par densitométrie. Ces analyses ont été effectuées en triplicata pour chacune des expériences. Légende: n = nombre d'expériences réalisées; p = valeur attribuée au test statistique *Student's t test*; ●: distribution des données; histogramme vide: la moyenne de la quantification  $\pm$  la déviation standard; histogramme coloré: la moyenne de la quantification  $\pm$  l'erreur standard. Les différences avec un  $p < 0.05$  sont considérées comme mathématiquement significatives et sont indiquées sous le graphique. L'expression des récepteurs Fas, DR3 et DR4 a également été évaluée dans des cellules perméabilisées et marquées avec un anticorps secondaire couplé au FITC. Le profil de distribution de l'immunofluorescence spécifique à chacun des récepteurs a été mesuré par cytométrie de flux aux temps indiqués suivant le traitement au VP16. Légende: courbe vide: cellules non-traitées; courbe colorée: cellules traitées avec le VP16; courbe en pointillé: fluorescence non-spécifique.

### **3.2 LA FORMATION DE COMPLEXES DE HAUT POIDS MOLECULAIRE IMPLIQUE LA PRESENCE DES RÉCEPTEURS DR3 ET DR4 APRÈS UN TRAITEMENT À LA CPT ET AU VP16**

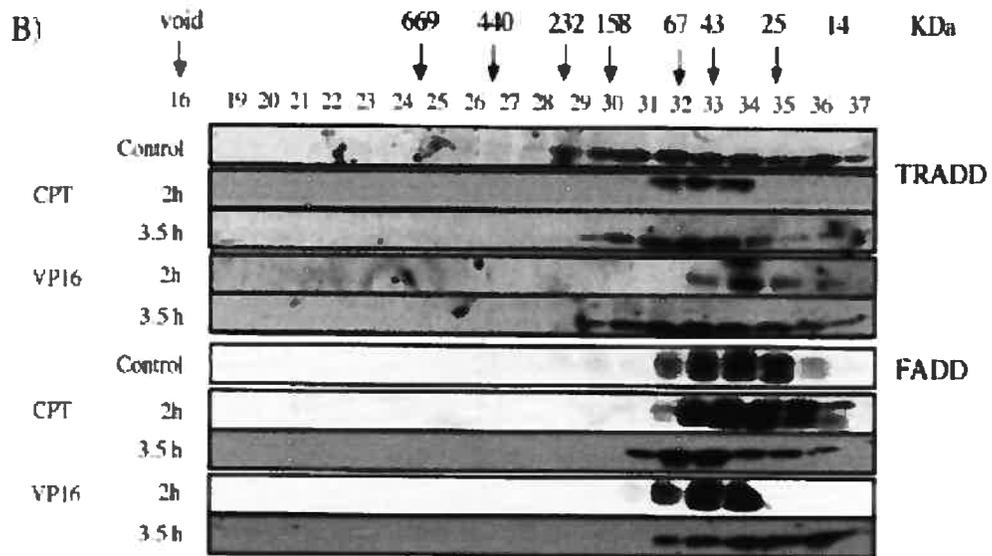
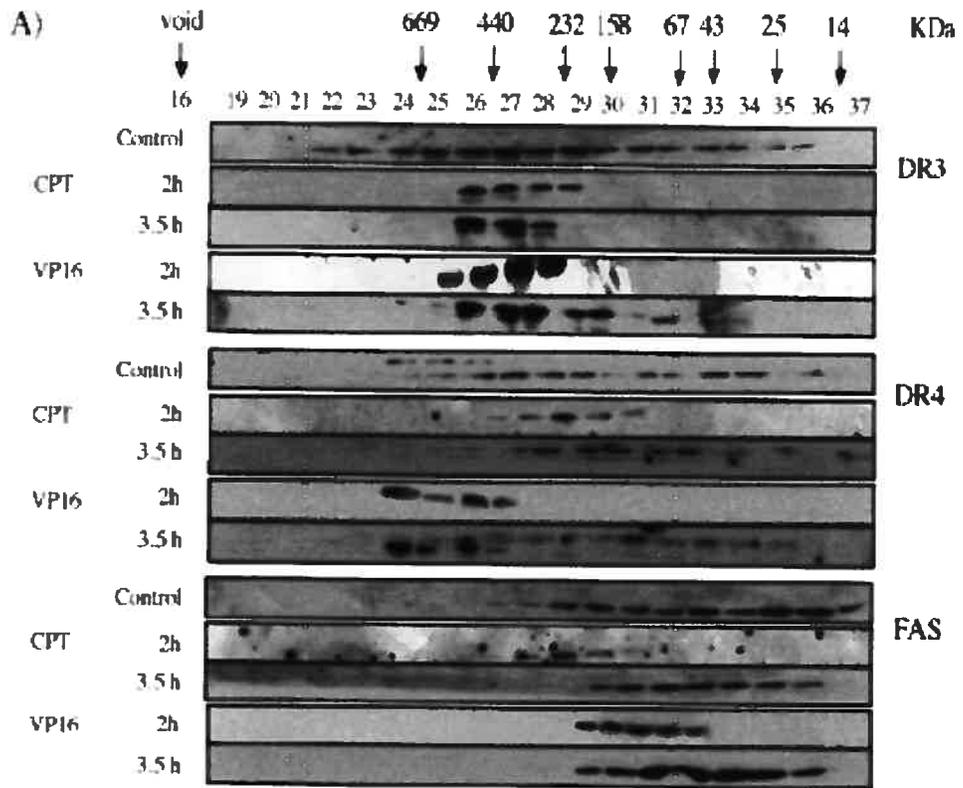
Puisque nos tentatives d'immunoprécipiter le DISC associé aux récepteurs DR3 et DR4 dans les cellules HL-60 traitées avec la CPT ou le VP16 se sont révélées infructueuses, nous avons procédé à une méthode alternative pour étudier la formation de ces complexes. Une technique de chromatographie d'exclusion par tamis moléculaire sur colonne Superose 6 HR 16/50 suivi d'une analyse de buvardage de type Western des différentes fractions collectées a été privilégiée pour séparer et suivre les protéines d'intérêts selon un large éventail de masse moléculaire. Cette technique permettait entre autres de détecter la formation de complexes protéiques de haut poids moléculaire.

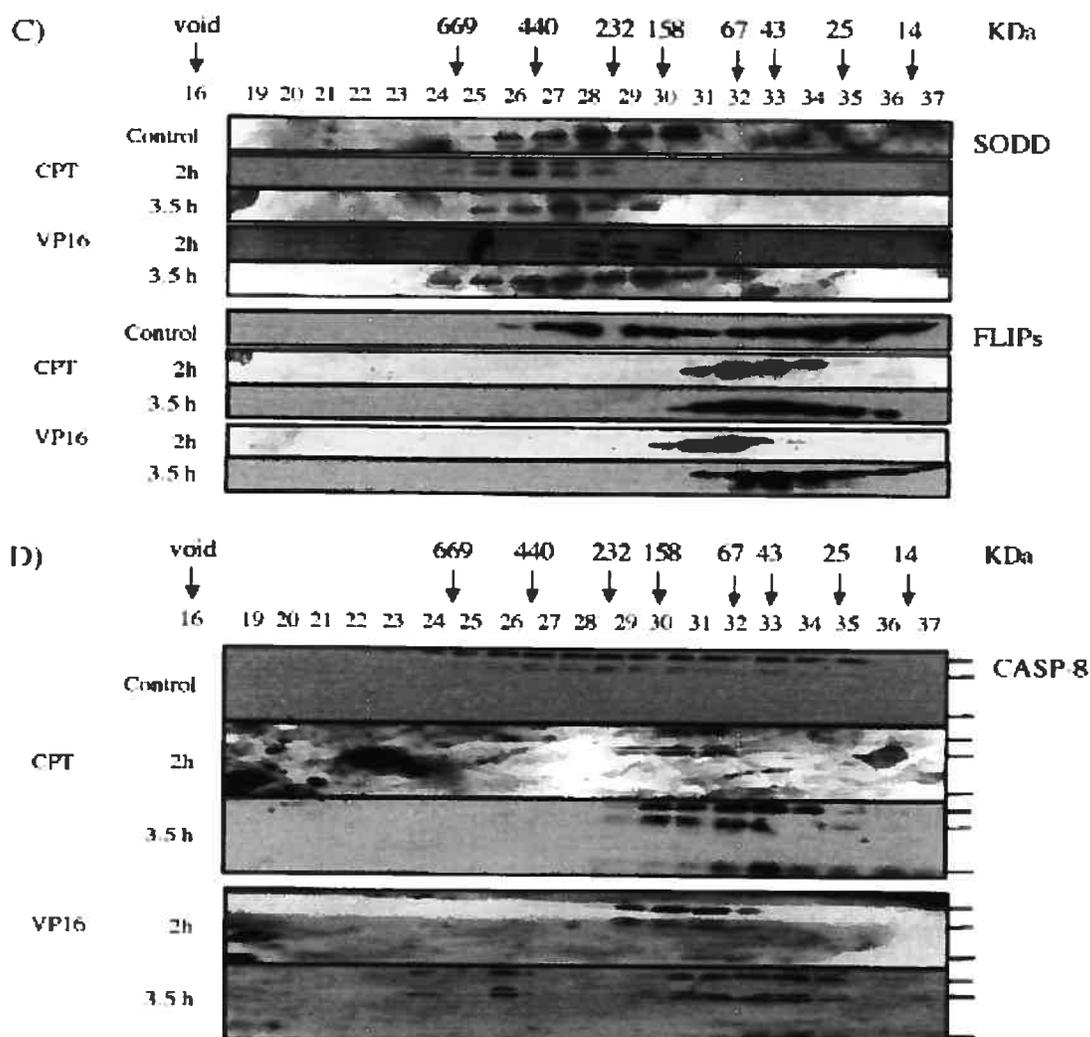
Dans les cellules contrôles, le profil d'élution concernant DR3 et DR4 démontre une large distribution de ces protéines variant de faible à de très haut poids moléculaire, alors que le profil d'expression de Fas semble plus concentré (Figure 5A). À 2h et 3.5h suivant le traitement avec la CPT ou le VP16, le profil d'élution de DR3 se déplace vers les fractions 26 à 28, correspondant à la formation de complexes protéiques d'environ 300 à 500 kDa. Le profil d'élution de DR4 chez les cellules traitées au VP16 montre un comportement similaire puisqu'à 2h et 3.5h suivant le traitement, les bandes correspondant à DR4 se déplacent et se concentrent dans les fractions 24 à 26, correspondant à la formation de complexes de haut poids moléculaire dont le poids varie entre 500 et 700 kDa. Au contraire, le profil d'élution de DR4 suite au traitement à la CPT ne montre pas de différences très marquantes par rapport aux cellules contrôles. Également, le profil d'élution concernant Fas est à peu près identique chez les cellules contrôles et les cellules traitées avec la CPT ou le VP16 (Figure 5A).

Par la suite, nous avons analysé le profil d'élution des protéines adaptatrices TRADD et FADD qui sont associées au DISC des récepteurs DR3 et/ou DR4. Ni TRADD ni FADD ne co-éluent dans les fractions contenant du DR3 (fractions 26-28) ou du DR4 (fractions 24-26) suivant les traitements à la CPT ou au VP16 (Figure 5B). L'analyse du profil d'élution concernant SODD, un inhibiteur spécifique aux récepteurs TNFR1 et DR3 et FLIPs, un

inhibiteur commun à tous les RMC, a également été effectuée. Au contraire de FLIPs, qui ne co-élut pas avec les fractions contenant du DR3 ou du DR4, SODD co-élut avec les fractions contenant du DR3 à 2h et 3.5h suivant le traitement à la CPT, et dans certaines fractions contenant du DR3 suite au traitement au VP16 (Figure 5C). Finalement, le profil d'élution de la procaspase-8 est différent du profil observé pour les récepteurs DR3 et DR4 suite au traitement avec la CPT, alors qu'il semblerait y avoir un peu de procaspase-8 qui co-élurait dans les fractions contenant du DR3 et/ou du DR4 à 3.5h suivant le traitement au VP16. Les fragments clivés de la forme active de la caspase-8 ont également été détectés suite au traitement à la CPT et au VP16 (Figure 5D). Dans l'ensemble, ces observations corrélerent les analyses d'immunohistochimie indiquant que l'agrégation de DR3 et DR4, observée suite au traitement à la CPT et au VP16, correspond également à la formation de complexes protéiques de haut poids moléculaire.

L'effet de la CPT sur le récepteur DR4 reste incertain. Alors que les études d'immunohistochimie révélaient que certaines cellules semblaient favoriser l'agrégation du récepteur, l'analyse de chromatographie a montré l'absence de formation de complexes protéiques de haut poids moléculaire chez ces cellules. Sous les conditions expérimentales utilisées pour cette étude, nous avons été incapable de détecter la présence des protéines adaptatrices TRADD et FADD aux complexès DR3 et DR4, suggérant que les agrégats formés ne correspondent pas à des complexes actifs composés des éléments classiques du DISC. Un peu de procaspase-8 semble co-éluer avec DR3 et/ou DR4 suite au traitement au VP16, ce qui permet de penser qu'il est possible que ces complexes recrutent la procaspase-8. Il a été intéressant d'observer une forte co-élution entre SODD et les complexes DR3, suggérant que le récepteur recrute l'inhibiteur, ce qui pourrait expliquer l'absence des protéines TRADD et FADD aux complexès DR3.





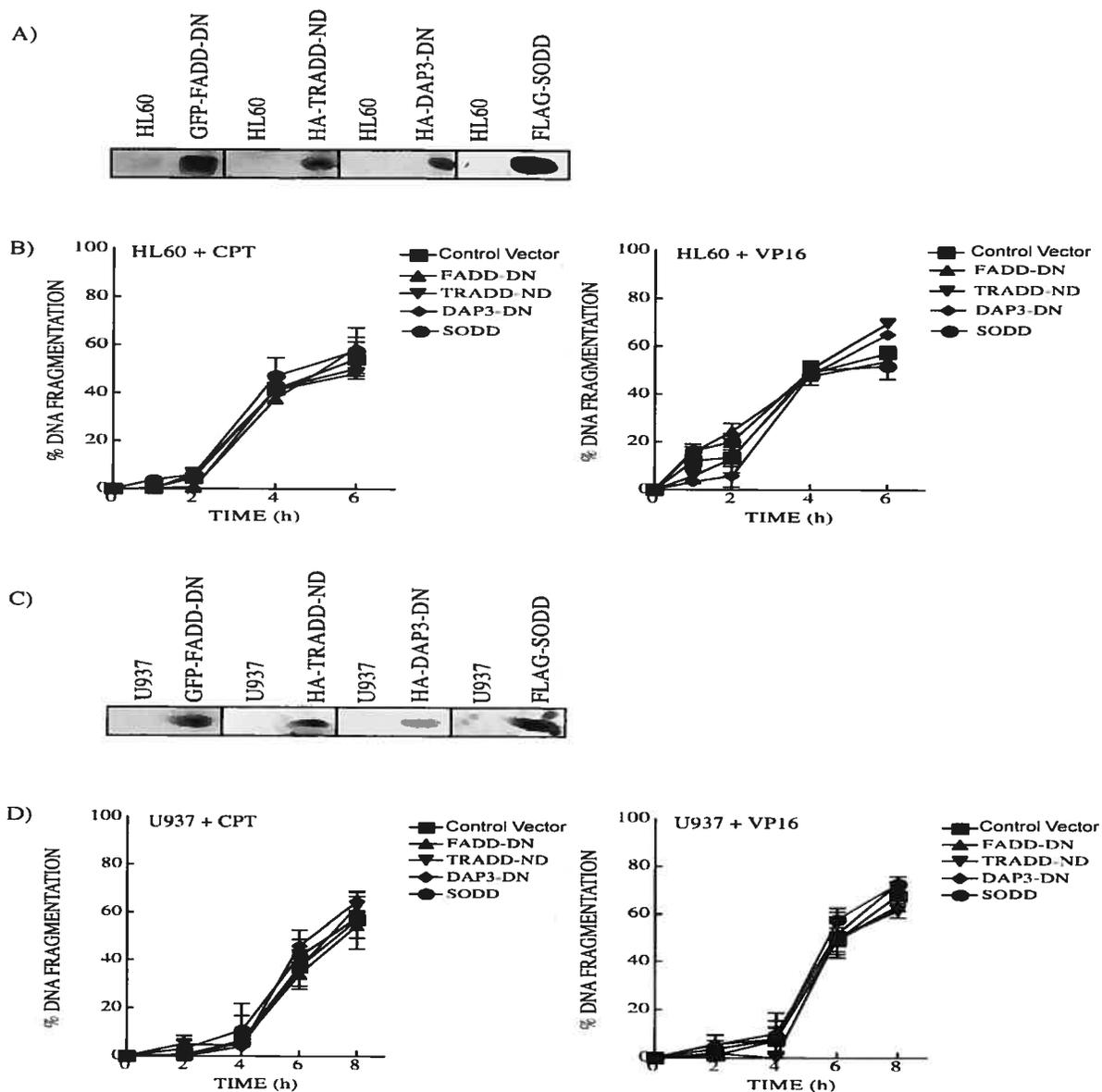
**Figure 5: Le traitement des cellules HL-60 à la camptothécine ou à l'étoposide induit la formation de complexes protéiques de haut poids moléculaire.** Les cellules ont été traitées avec la CPT (1.0  $\mu$ M) ou le VP16 (50  $\mu$ M) pour une période de 30 minutes suivie par l'incubation des cellules dans du milieu frais sans agents chimiothérapeutiques. Les extraits cellulaires ont été préparés à partir des cellules contrôles et des cellules prélevées à 2 h et 3.5 h suivant le traitement avec l'une ou l'autre des drogues. Les extraits ont été soumis à une analyse de chromatographie en utilisant une colonne Superose 6HR 16/50 (débit: 500  $\mu$ l/min). Des fractions de 2.5 ml ont été récoltées et des aliquots de 80  $\mu$ l provenant de chacune des fractions ont été analysés par immunobuvardage de type Western. Le profil d'élution des standards moléculaires utilisés pour calibrer la colonne sont indiqués au dessus de la figure par des flèches. **A)** Profil d'élution pour DR3, DR4 et Fas. **B)** Profil d'élution pour TRADD et FADD. **C)** Profil d'élution pour SODD et FLIPs. **D)** Profil d'élution pour la procaspase-8 et les sous-unités actives de la caspase.

(Publié dans Mol. Cancer. Ther. 3(12): 1-11,2004)

### 3.3 LA FONCTION BIOLOGIQUE DES COMPLEXES DR3 ET DR4 DANS LES CELLULES HL-60 TRAITÉES À LA CAMPTOTHÉCINE ET À L'ÉTOPOSIDE

À partir des expériences précédentes, il était difficile d'établir si DR3 et DR4 possédaient un rôle fonctionnel dans la signalisation apoptotique suite aux traitements à la CPT et au VP16. D'une part, l'agrégation de ces récepteurs et la formation de complexes de haut poids moléculaire médiés par les agents chimiothérapeutiques, de même que le recrutement d'une faible quantité de la procaspase-8 suite au traitement au VP16, représentent des observations cohérentes avec le fait que les récepteurs participeraient activement dans le processus apoptotique déclenché par les agents anticancéreux. D'autre part, les complexes DR3 qui pourraient être inhibés en partie ou en totalité par la présence de SODD, de même que l'absence des principales protéines adaptatrices FADD et TRADD, favorisent l'hypothèse que ces complexes ne sont pas fonctionnels.

Afin de clarifier cette question, nous avons examiné si la sensibilité des cellules HL-60 à l'action des drogues chimiothérapeutiques pouvait être modulée par la surexpression de l'inhibiteur SODD ou la forme dominante négative des adaptateurs FADD (FADD-DN), et DAP3 (DAP3-DN) ainsi que le mutant de délétion TRADD (TRADD-ND). La Figure 6A montre le niveau d'expression de ces protéines dans les cellules HL-60 transfectées en transitoire. Le fort niveau d'expression de SODD, FADD-DN, TRADD-DN et DAP3-DN n'affecte en rien la fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose (Figure 6B) ou la cinétique d'activation des caspases, incluant l'activité DEVDase (apparentée à la caspase-3), IETDase (apparentée à la caspase-8) et LEHDase (apparentée à la caspase-9) suite aux traitements avec la CPT ou le VP16 (résultats non montrés). Des résultats similaires ont été observés dans une seconde lignée leucémique, soit les cellules U937 (Figure 6C-D). L'importance des voies de signalisation associées aux récepteurs de la mort semble donc négligeable dans le processus de mortalité engendré par la CPT ou le VP16, ou à tout le moins, les voies de signalisation associées à SODD, FADD, TRADD et DAP-3 ne participent pas à la cytotoxicité de ces agents chimiothérapeutiques.

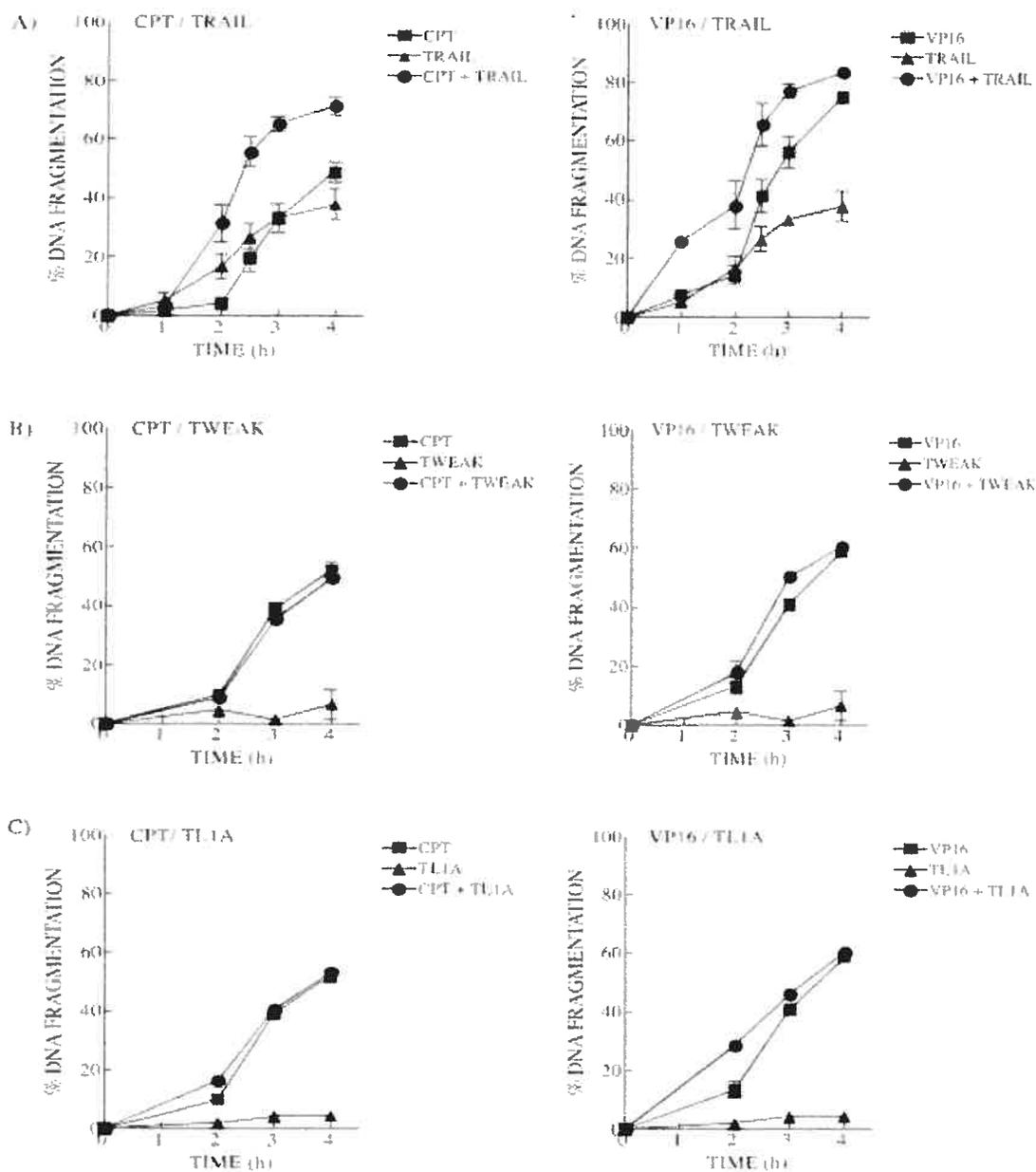


**Figure 6: Effet de la surexpression de l'inhibiteur SODD, de la forme dominante-négative de FADD et DAP3 et du mutant de délétion de TRADD sur l'apoptose induite par la camptothécine et l'étoposide dans les cellules HL-60 et U937.** Les cellules HL-60 (A et B) et U937 (C et D) ont été transfectées par électroporation avec les vecteur control, GFP-FADD-DN, HA-TRADD-ND, DAP3-DN ou FLAG-SODD. L'efficacité de transfection a été déterminé en mesurant la fluorescence émise par GFP (efficacité d'environ 70 %). 24 heures suivant la transfection, les cellules ont été traitées avec la CPT (1.0  $\mu\text{M}$ ) ou le VP16 (50 $\mu\text{M}$ ) pour une période de 30 minutes suivie d'une période d'incubation dans du milieu frais sans agents chimiothérapeutiques. **A et C)** Niveau d'expression de GFP-FADD-DN, HA-TRADD-ND, DAP3-DN ou FLAG-SODD dans les cellules HL-60 (A) ou U937 (C) 24 h après la transfection. **B et D)** Aux temps indiqués suivant le traitement à la CPT ou au VP16, la cinétique de fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose a été mesurée par la technique d'éluion sur filtre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fragmentation de l'ADN et chacun des points représentent la moyenne de 3 expériences différentes  $\pm$  SE (B) et de deux expériences différentes  $\pm$  SE (D). Légende: Vecteur contrôle(■) GFP-FADD-DN (▲); HA-TRADD-ND(▼); DAP3-DN(◆); FLAG-SODD(●).

Plusieurs études ont rapporté que certains agents chimiothérapeutiques augmentent l'apoptose associée à Fas ou TRAIL, avec ou sans une augmentation de l'expression des récepteurs Fas, DR4 ou DR5 [221]. Afin d'investiguer davantage la fonction biologique des complexes DR3 et DR4, nous avons examiné si le traitement combiné des cellules HL-60 avec la CPT ou le VP16 et les ligands de DR4 et DR3, soit TRAIL ou TWEAK et TL1A, qui ont été tous deux décrits pour activer DR3, pouvaient moduler la cinétique apoptotique. La Figure 7A démontre que le traitement des cellules HL-60 à la CPT ou au VP16, combiné à un traitement de TRAIL (250 ng/ml), accélère la cinétique apoptotique par rapport aux cellules traitées seulement avec la CPT, le VP16 ou TRAIL. Au contraire, le co-traitement de la CPT ou du VP16 avec TWEAK (500 ng/ml) ou TL1A (500 ng/ml) ne sensibilise pas les cellules HL-60 à l'apoptose induite par la CPT ou le VP16 (Figure 7B-C). Nous avons aussi observé que les cellules HL-60 étaient résistantes à l'action de TWEAK ou TL1A jusqu'à des concentrations de 10 µg/ml (résultats non montrés).

#### **3.4 L'ACTIVATION DES MAPKINASES DANS LES CELLULES HL-60 TRAITÉES À LA CAMPTOTHÉCINE ET À L'ÉTOPOSIDE**

Afin d'investiguer d'autres voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans l'apoptose induite par la CPT ou le VP16, nous nous sommes penché sur l'implication potentielle des voies de signalisation associées aux mapkinases et au facteur de transcription NF-κB qui, bien qu'elles avaient souvent été décrites comme des éléments antiapoptotiques dans la cellule, elles étaient également connues pour induire l'apoptose sous différents contextes expérimentaux [62, 335-341, 354, 363-367, 369-371, 372, 373, 391, 413, 423-432]. De plus, l'analyse de ces voies nous permettait de faire un lien avec l'étude précédente concernant les RMC, puisqu'il avait été démontré que parallèlement aux voies de signalisation apoptotiques dépendantes de FADD, TRADD, DAP3 et procaspase-8, les RMC ont la capacité de recruter des adaptateurs secondaires via FADD ou TRADD tels que RIP et TRAF-2 conduisant à l'activation des mapkinases et de NF-κB, ce qui dans certains cas favorisent le déclenchement de l'apoptose [222, 290-298] ou dans d'autres cas, l'émergence de signaux de survie.

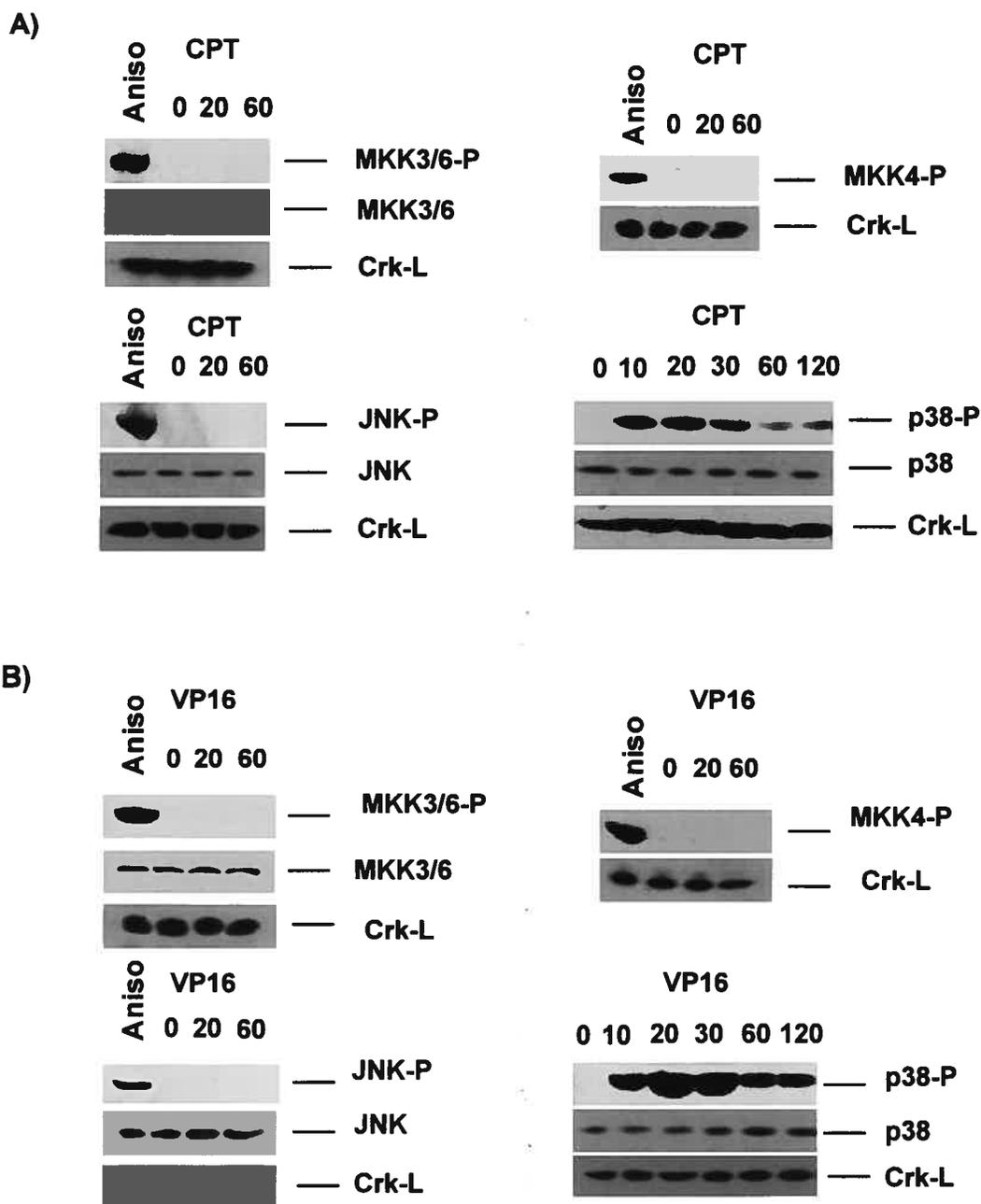


**Figure 7: Traitement combiné de la camptothécine ou de l'étoposide avec les ligands TRAIL, TWEAK ou TL1A dans les cellules HL-60.** Les cellules HL-60 préalablement marquées avec la (2-<sup>14</sup>C)-thymidine ont été traitées avec les ligands **A) TRAIL** (250 ng/ml) **B) TWEAK** (500 ng/ml) et **C) TL1A** (500ng/ml) et ont par la suite été traitées ou non avec les agents chimiothérapeutiques (CPT: 1.0  $\mu$ M; VP16: 50 $\mu$ M). Aux temps indiqués suivant le traitement, la cinétique de fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose a été mesurée par la technique d'éluion sur filtre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fragmentation de l'ADN et chacun des points représentent la moyenne  $\pm$  SE des différentes expériences effectuées (n=4 pour A; n=3 pour B et C). Légende: CPT ou VP16 (■); TRAIL, TWEAK ou TL1A seulement(▲); CPT ou VP16 en combinaison avec TRAIL, TWEAK ou TL1A(●).

Tel qu'illustré à la Figure 8A-B, le traitement des cellules HL-60 à la CPT ou au VP16 n'induit pas la phosphorylation de MKK3 et de MKK4, connue pour activer les mapkinases p38 et JNK, respectivement.

Il est à noter que l'anticorps que nous avons utilisé pour détecter la forme phosphorylée de MKK3 peut aussi interagir avec la forme active de MKK6 qui est lui-même impliqué dans l'activation de la p38, suggérant que les voies classiques conduisant à l'activation de la p38 (MKK3 et MKK6) ne sont pas impliquées dans notre modèle expérimental. La CPT et le VP16 n'induisent pas non plus la phosphorylation des JNK (Figure 8A-B). De plus, les niveaux d'expression des formes non phosphorylées de MKK3 et JNK semblent stables après un traitement à la CPT ou VP16, alors que le niveau d'expression de la forme non phosphorylée de MKK4 n'a pu être analysé à cause de l'inexistence d'un tel anticorps sur le marché au moment de la réalisation de cette étude. Le traitement des cellules HL-60 à l'anisomycine, à une concentration de 50 µg/ml, est suffisant pour induire la phosphorylation des kinases MKK3, MKK4 et JNK, démontrant la fonctionnalité de ces protéines dans la cellule (Figure 8A-B). Afin de s'assurer que la quantité de protéines était similaire pour chacun des puits du gel de polyacrylamide, nous avons ré-hybridé une troisième fois les membranes avec un anticorps dirigé contre la protéine Crk-L (Figure 8A-B).

Contrairement aux JNK, la mapkinase p38 est fortement phosphorylée dans les cellules HL-60, seulement 10 minutes après un traitement à la CPT ou au VP16 (Figure 8A-B). Dans le cas des cellules traitées à la CPT, l'activation de la p38 commence à décroître significativement 30 minutes après le traitement pour atteindre des niveaux d'activation plus faibles aux points 60 et 120 minutes après le traitement (Figure 8A). Le profil d'activation de la p38 chez les cellules traitées au VP16 est relativement similaire quoique l'activation de la p38 est maintenue plus longtemps (Figure 8B). La ré-hybridation de la membrane avec un anticorps reconnaissant la totalité de la p38 (forme non phosphorylée et phosphorylée) démontre que bien qu'ils induisent la phosphorylation et l'activation de la p38, la CPT et le VP16 ne semblent pas affecter l'expression de la protéine dans la cellule (Figure 8A-B). Le niveau d'expression de Crk-L est utilisé comme contrôle.



**Figure 8: Cinétique d'activation des kinases MKK3, MKK4, JNK et p38 chez les cellules HL-60 traitées à la camptothécine ou à l'étoposide.** Les cellules ont été traitées avec la CPT (1.0  $\mu$ M) (A) ou au VP16 (50  $\mu$ M) (B) pour une période de 30 minutes suivie par l'incubation des cellules dans du milieu frais sans agent chimiothérapeutique. Afin de déterminer le niveau d'activation des différentes kinases étudiées, des analyses d'immunobuvardage de type Western ont été effectuées aux temps indiqués en utilisant des anticorps spécifiques reconnaissant la forme phosphorylée de chacune d'entre elles. Mis à part MKK4, toutes les membranes ont été ré-hybridées une seconde fois avec un anticorps reconnaissant toutes les formes de la kinase d'intérêt. Toutes les membranes sans aucune exception ont subi une ré-hybridation avec un anticorps dirigé contre la protéine Crk-L afin de contrôler la qualité expérimentale. Comme contrôle positif, les cellules HL-60 ont été traitées avec l'anisomycine (50  $\mu$ g/ml) pendant une période d'une heure. Les résultats obtenus sont représentatifs de trois expériences distinctes.

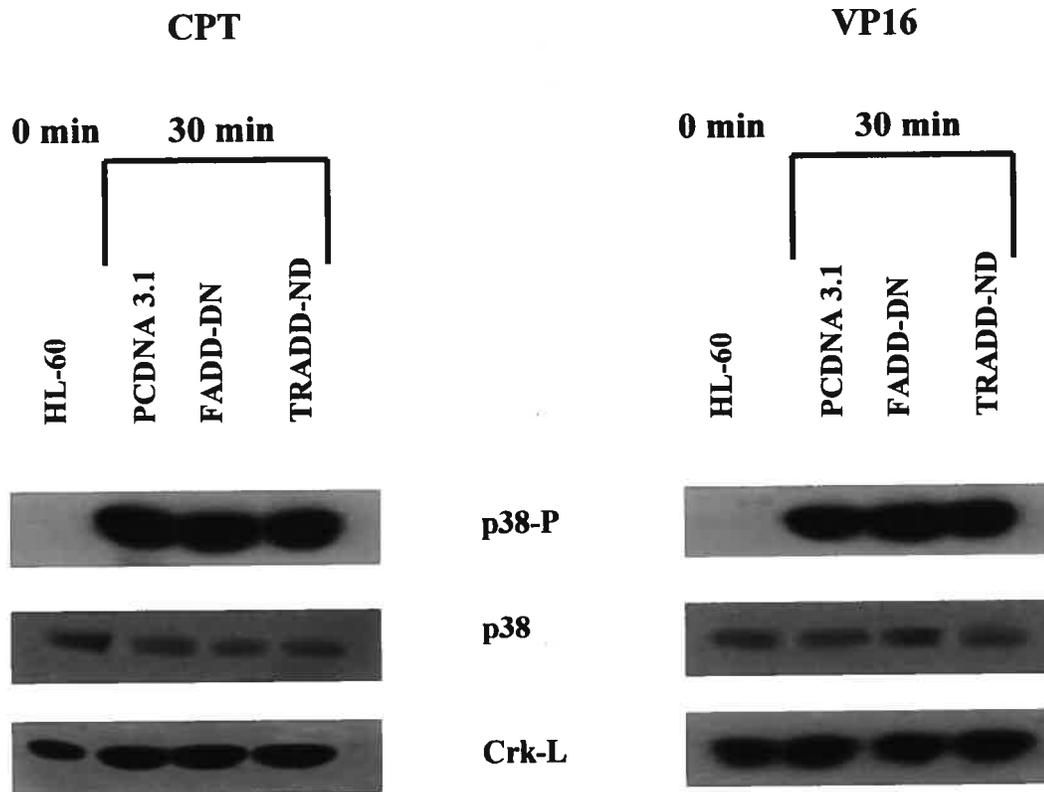
Afin de déterminer si l'agrégation des récepteurs de la mort cellulaire était associée à l'activation de la p38, des transfections transitoires du dominant négatif de FADD et du mutant de délétion en N-terminal de TRADD, ont été effectuées afin d'inhiber le recrutement des protéines associées aux principales voies de signalisation des RMC. Tel que présenté à la Figure 9, la mapkinase p38 n'est pas activée dans les cellules contrôles non traitées avec les agents chimiothérapeutiques et non transfectées. Au contraire, les cellules transfectées avec le vecteur contrôle pCDNA3.1, et qui ont traitées avec l'une ou l'autre des drogues pour une période de 30 minutes, démontrent un fort niveau d'activation de la p38 (Figure 9). La surexpression de FADD-DN et TRADD-ND, chez les cellules traitées à CPT ou au VP16, n'affectent pas le niveau d'activation de la p38 qui demeure très similaire à ce qui est observé dans le cas des cellules qui ont traitées avec les agents chimiothérapeutiques et qui ont été transfectées avec le vecteur contrôle (Figure 9). Ces observations démontrent que l'activation de la p38 se produit indépendamment des voies de signalisation associées à FADD et TRADD, et suggèrent fortement que les RMC ne sont pas associés à son activation. L'expression de la p38 non phosphorylée et phosphorylée dans la cellule est stable et n'est pas modulée par le traitement avec les drogues ou par la transfection (Figure 9)

### **3.5 LE RÔLE BIOLOGIQUE DE LA P38 DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LA CAMPTOTHÉCINE ET L'ÉTOPOSIDE**

À cette étape de l'étude, il semblait impératif de déterminer le rôle biologique de l'activité associée à la p38 dans l'apoptose induite par la CPT et le VP16. L'approche que nous avons privilégiée pour résoudre cette question a été d'effectuer un pré-traitement des cellules avec les inhibiteurs SB202190 ou SB203580, afin d'inhiber l'activité de la p38. Le SB203580 a été originalement développé comme un inhibiteur dirigé contre certaines cytokines inflammatoires. Ce n'est que plus tard que ses capacités inhibitrices contre la kinase p38 ont été démontrées. Ce composé inhibe l'activité catalytique de la p38 en liant, par compétition, le site de liaison à l'ATP [614]. L'inhibiteur SB202190 opère selon un mécanisme similaire et cible aussi bien la forme active que la forme inactive de l'enzyme [615]. Il a été démontré que pendant un traitement conjoint, le SB203580 et le SB202190 se compétitionnent entre eux lors du processus d'inhibition de la p38 [615].

Après avoir procédé au traitement des cellules avec les agents chimiothérapeutiques, il suffisait de déterminer s'il existait une différence de sensibilité à l'apoptose entre les cellules dont la p38 avait été inhibée et les cellules noninhibées.

Dans les cellules traitées à la CPT, l'inhibition de la p38 par l'un ou l'autre des inhibiteurs chimiques n'induit aucune différence significative dans la cinétique d'activation des caspases apparentées à la caspase-9 (activité LEHDase) (Figure 10A).



**Figure 9: Effet du dominant négatif de FADD et du mutant de délétion de TRADD sur l'activation de la p38 chez les cellules HL-60 traitées à la camptothécine ou à l'étoposide.** Les cellules HL-60 ont été transfectées par électroporation avec les vecteurs pCDNA3.1, GFP-FADD-DN, et HA-TRADD-ND. 24 heures suivant la transfection, les cellules ont été traitées avec la CPT (1.0  $\mu$ M) (panneau de gauche) ou le VP16 (50 $\mu$ M) (panneau de droite) pour une période de 30 minutes. Les extraits cellulaires ont été préparés 30 minutes après les traitements, et les protéines ont été chargées sur un électrophorèse SDS-PAGE puis ont été soumises à une analyse d'immunobuvardage de type Western à l'aide d'un anticorps reconnaissant la forme active (phosphorylée) de la p38. Les membranes ont été ré-hybridées une seconde fois avec un anticorps reconnaissant toute les formes de la p38. Afin de contrôler la qualité expérimentale, les membranes ont été ré-hybridées une troisième fois avec un anticorps dirigé contre la protéine Crk-L. La première piste correspond à des cellules qui n'ont pas été transfectées et qui n'ont pas subi de traitement avec les agents chimiothérapeutiques. Les trois pistes suivantes correspondent à des cellules qui ont été transfectées avec les différents vecteurs et qui ont été traitées avec la CPT ou le VP16. Les résultats obtenus sont représentatifs de trois expériences différentes.

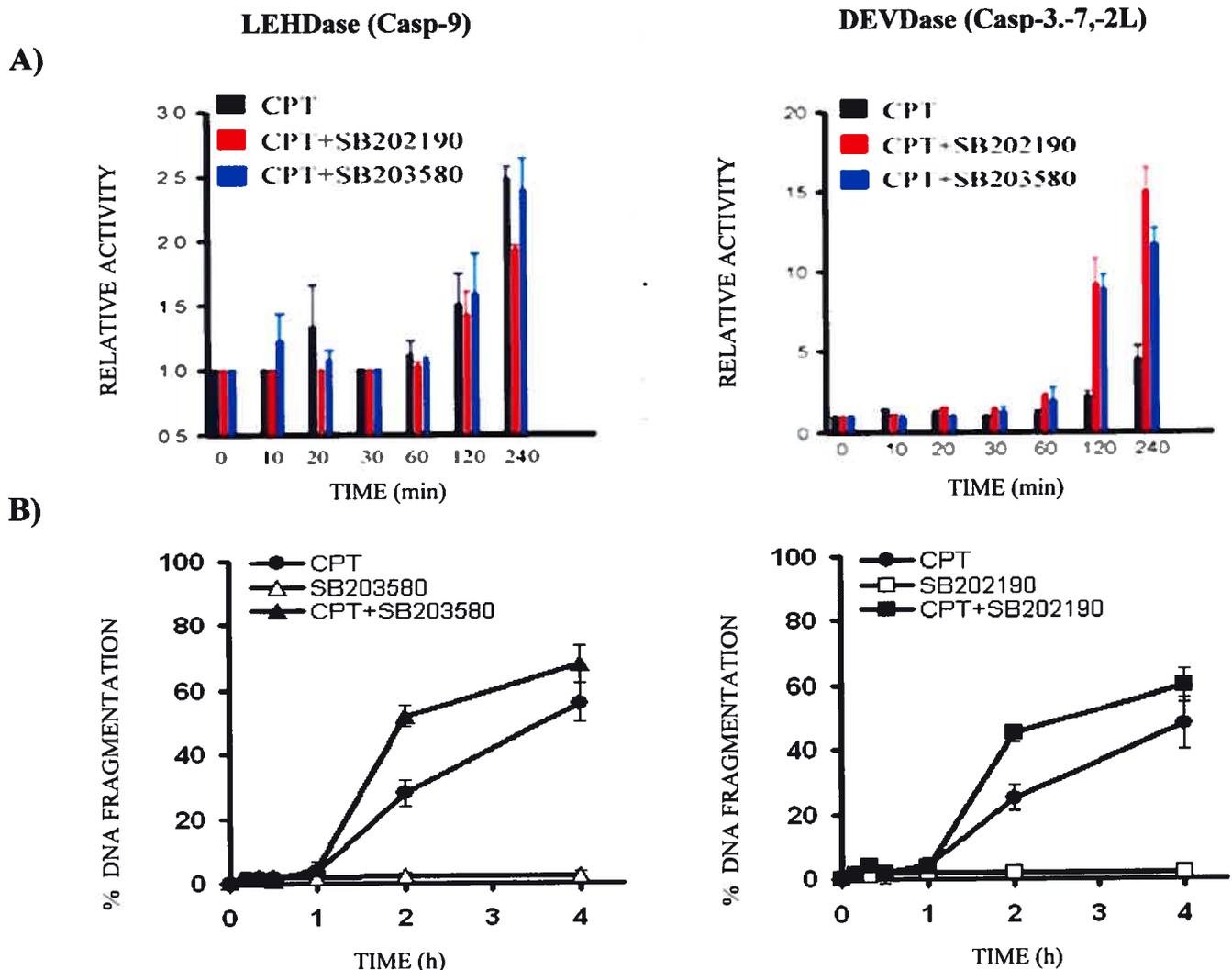
Par contre, l'inhibition de la p38 génère une augmentation de 4 à 5 fois de l'activité DEVDase à 2h et 4h suivant le traitement à la CPT et l'effet observé est similaire pour les deux inhibiteurs de la p38 (Figure 10A). De plus, 2h après le traitement à la CPT, l'inhibition de la p38 par le SB202190 et le SB203580 augmente d'environ 20 à 25 % la fragmentation de l'ADN associé à l'apoptose (Figure 10B). Par contre, 4h après le traitement à la CPT, aucune différence significative n'est observée dans le taux de fragmentation de l'apoptose. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la p38 accélère à des temps précoces, la cinétique de fragmentation de l'ADN (Figure 10B).

Au contraire, l'inhibition de la p38 par les deux inhibiteurs chimiques ne modifie pas la cinétique d'activation des caspases apparentées aux caspases-3 et -9 et le niveau de fragmentation de l'ADN chez les cellules traitées au VP16 (Figure 11A-B). Les cellules qui ont été uniquement traitées avec les inhibiteurs SB202190 et SB203580 ne présentent pas de fragmentation de l'ADN, démontrant qu'aux concentrations et aux temps utilisées, ces composés ne sont pas cytotoxiques pour les cellules HL-60 (Figure 10B-11B). L'ensemble de ces résultats suggère que la mapkinase p38 est associée à une voie de signalisation, retardant à des temps précoces la cinétique de l'apoptose induite par la CPT en retardant partiellement l'activité des caspases apparentées à la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN. Au contraire, malgré le fait que le VP16 active la p38, son rôle dans la cytotoxicité générée par cette drogue anticancéreuse reste incertain.

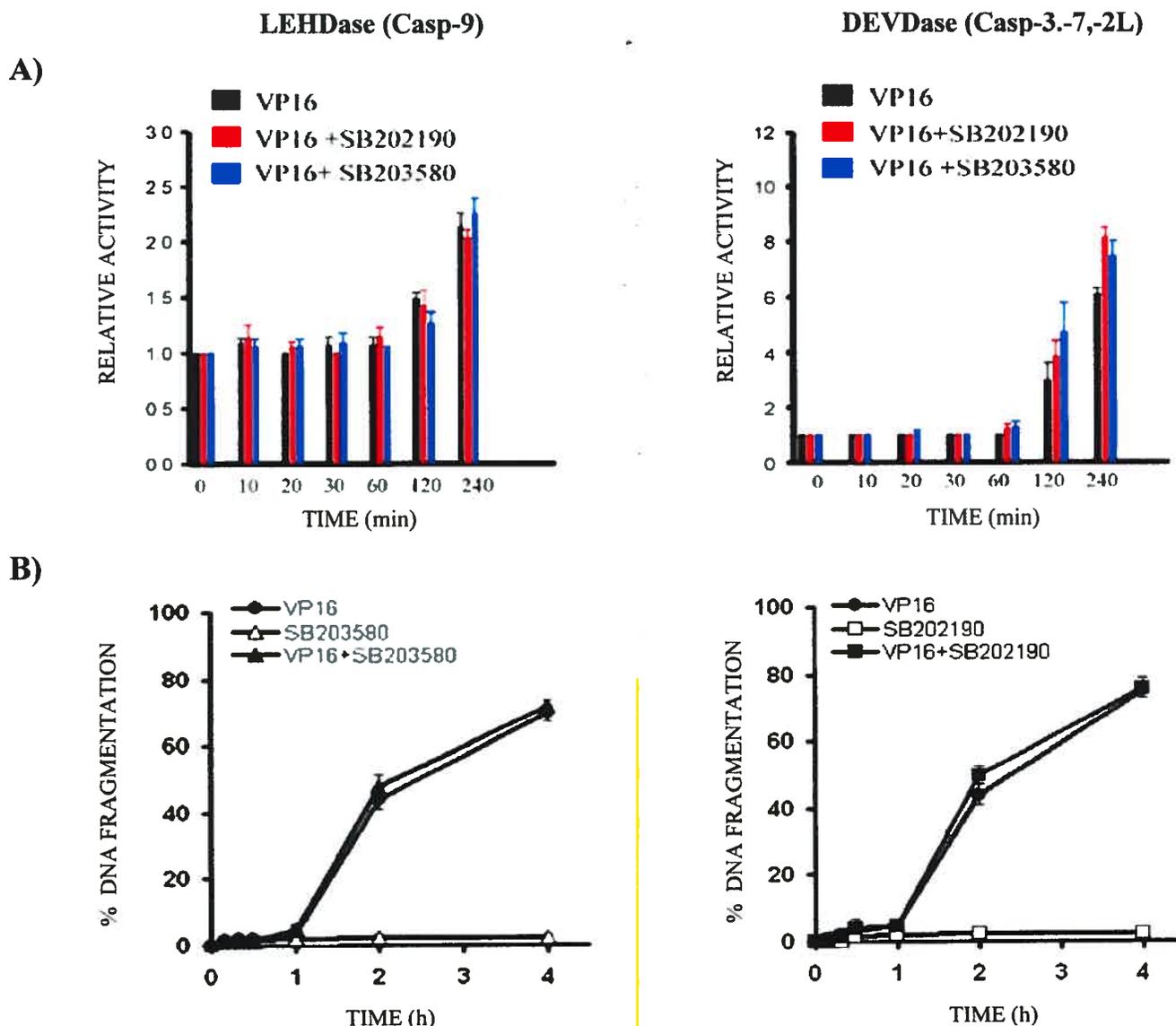
### **3.6 LE RÔLE BIOLOGIQUE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF- $\kappa$ B DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LA CAMPTOTHÉCINE ET L'ÉTOPOSIDE**

Dans le but d'évaluer l'importance du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans la cytotoxicité induite par la CPT ou le VP16, nous avons utilisé le répresseur I $\kappa$ B(SR), décrit pour inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B [560, 561].

L'expression du répresseur I $\kappa$ B(SR) ralentit sensiblement la cinétique de fragmentation de l'ADN 2h après le traitement à la CPT. Par contre, cet effet n'est plus observé 4h après le traitement à la CPT. Aucun effet sur la cinétique de la fragmentation de l'ADN n'a été



**Figure 10: Effet de l'inhibition de la p38 sur l'apoptose induite par la camptothécine dans les cellules HL-60.** Les cellules HL-60 ont subi ou non, un pré-traitement d'une heure avec les inhibiteurs SB202190 (5  $\mu$ M) ou SB203580 (10  $\mu$ M) suivi, ou non, par un traitement à la CPT (1.0  $\mu$ M) pour une période de 30 minutes. **A)** Aux temps indiqués suivant le traitement à la CPT, l'activité LEHDase (panneau de gauche) et DEVDase (panneau de droite) a été déterminée en mesurant la vitesse initiale et les résultats sont exprimés en activité relative en fonction des cellules contrôles. Chaque point correspond à la moyenne de trois expériences différentes  $\pm$  SE. Légende: noir: CPT; rouge: SB202190 et CPT; bleu: SB203580 et CPT. **B)** Les cellules HL-60 ont été préalablement marquées avec la ( $^{14}$ C)-thymidine. Certaines des cellules marquées ont été traitées avec les inhibiteurs SB202190 (panneau de droite) ou SB203580 (panneau de gauche). La totalité des cellules marquées (avec ou sans inhibiteur) ont par la suite été traitées ou non, à la CPT. Aux temps indiqués suivant le traitement à la CPT, la fragmentation de l'ADN a été évaluée par la technique d'éluion sur filtre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fragmentation de l'ADN et chaque point représente la moyenne de trois expériences différentes  $\pm$  SE. Légende: ●:CPT; △:SB203580; ▲:SB203580 et CPT; □:SB202190; ■:SB202190 et CPT

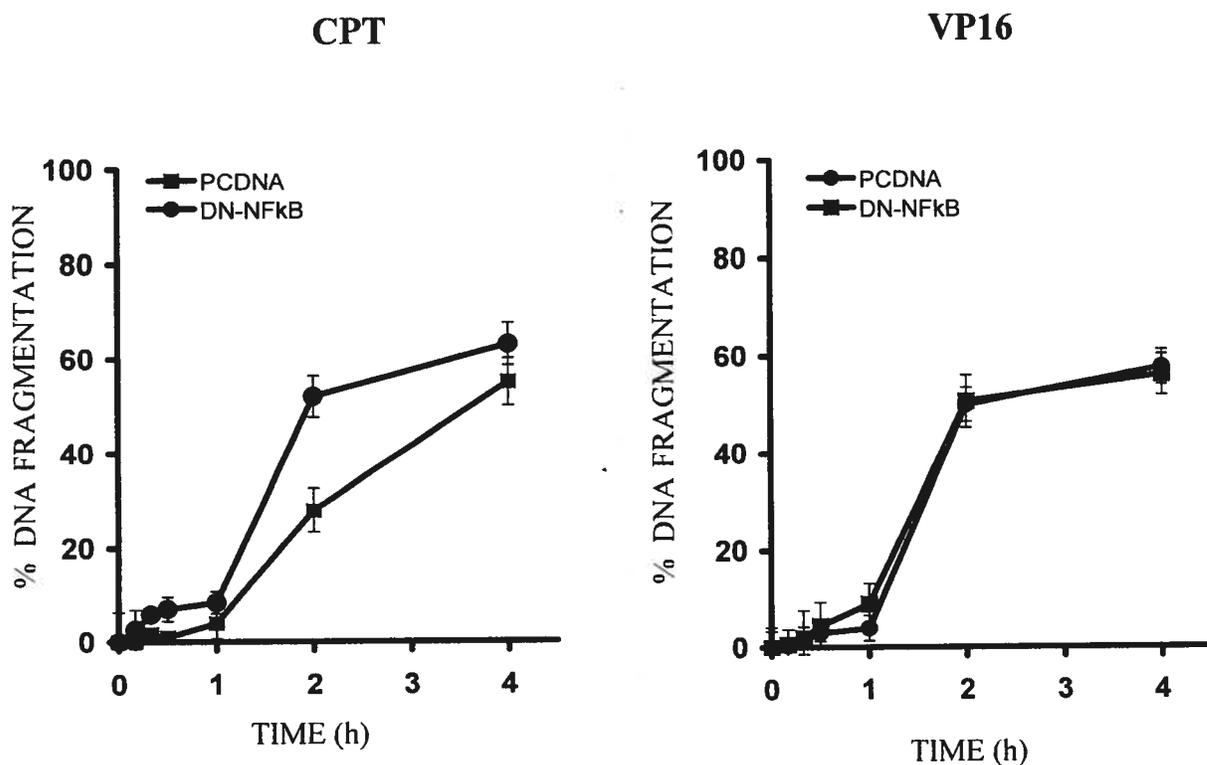


**Figure 11: Effet de l'inhibition de la p38 sur l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules HL-60.** Les cellules HL-60 ont subi ou non, un pré-traitement d'une heure avec les inhibiteurs SB202190 (5  $\mu$ M) ou SB203580 (10  $\mu$ M) suivi, ou non, par un traitement à la VP16 (50  $\mu$ M) pour une période de 30 minutes. **A)** Aux temps indiqués suivant le traitement au VP16, l'activité LEHDase (panneau de gauche) et DEVDase (panneau de droite) a été déterminée en mesurant la vitesse initiale et les résultats sont exprimés en activité relative en fonction des cellules contrôles. Chaque point correspond à la moyenne de trois expériences différentes  $\pm$  SE. Légende: noir: VP16; rouge: SB202190 et VP16; bleu: SB203580 et VP16. **B)** Les cellules HL-60 ont été préalablement marquées avec la ( $^{14}$ C) thymidine. Certaines des cellules marquées ont été traitées avec les inhibiteurs SB202190 (panneau de droite) ou SB203580 (panneau de gauche). La totalité des cellules marquées (avec ou sans inhibiteur) ont par la suite été traitées ou non, au VP16. Aux temps indiqués suivant le traitement au VP16, la fragmentation de l'ADN a été évaluée par la technique d'éluion sur filtre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fragmentation de l'ADN et chaque point représente la moyenne de trois expériences différentes  $\pm$  SE. Légende: ●:VP16; △:SB203580; ▲:SB203580 et VP16; □:SB202190; ■:SB202190 et VP16

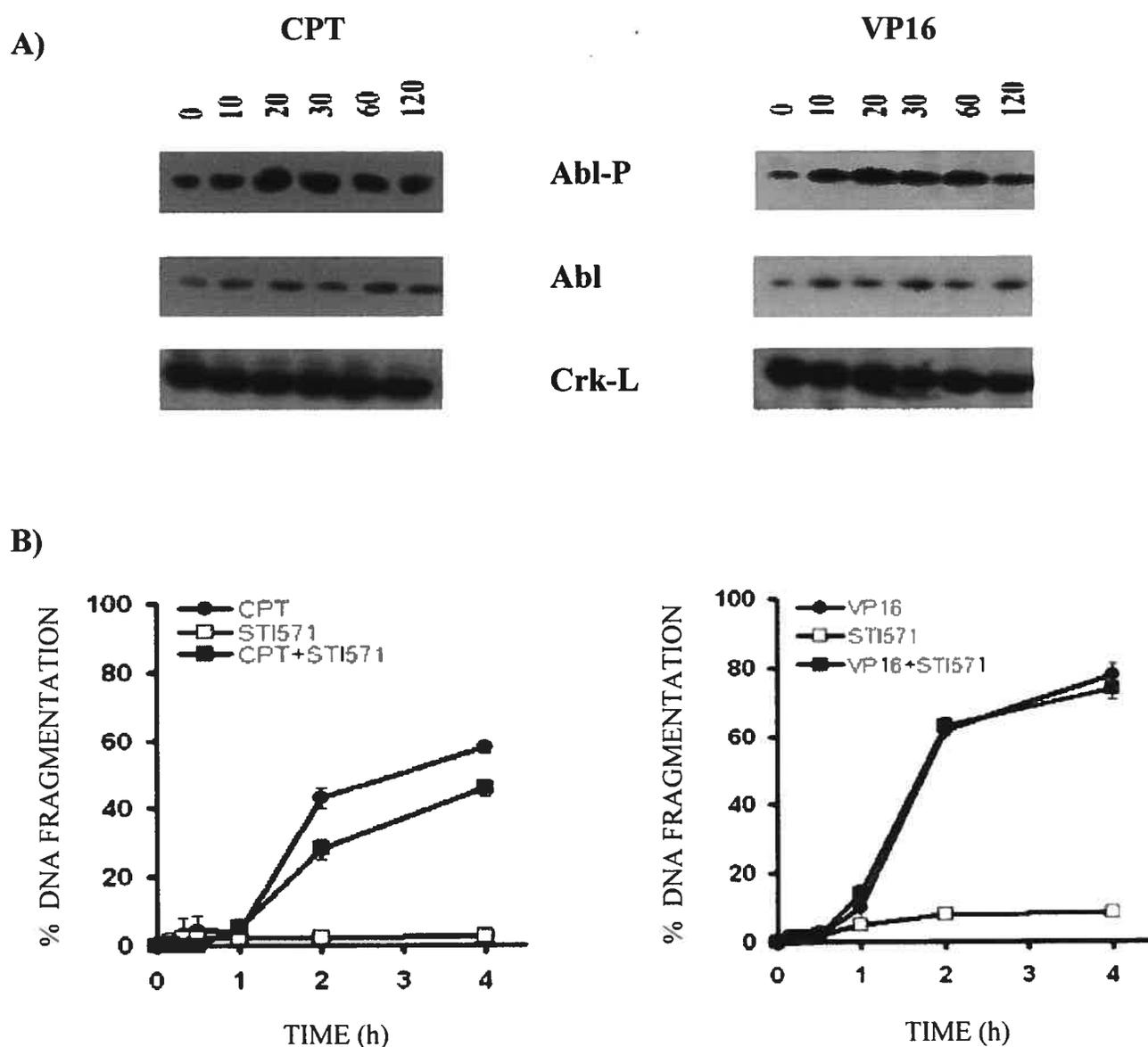
observé chez les cellules traitées au VP16 (Figure 12). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de NF- $\kappa$ B accélère également à des temps précoces la cinétique de fragmentation de l'ADN associé à l'apoptose après CPT. L'intensité et la spécificité de la réponse à I $\kappa$ B(SR) sont très similaires à celles observées avec les inhibiteurs de p38, ouvrant la possibilité que ces deux éléments fonctionnent de concert au sein de la même voie de signalisation après un traitement à la CPT.

### **3.7 LE RÔLE BIOLOGIQUE DE LA KINASE ABL DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LA CAMPTOTHÉCINE ET L'ÉTOPOSIDE**

La voie ATM/Abl est connue pour jouer un rôle clé dans la signalisation activée suite à la présence de dommages à l'ADN. La kinase Abl est un effecteur direct de ATM, qui a souvent été décrite pour jouer un rôle important dans la réponse cellulaire à des stress génotoxiques ou oxydatifs [505-509, 523, 524]. Dans un premier temps, nous avons déterminé si les agents chimiothérapeutiques étudiés induisaient l'activation de Abl. L'utilisation d'un anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de Abl montre que la kinase est déjà active dans les cellules qui n'ont pas été traitées avec les agents chimiothérapeutiques, mais son niveau de phosphorylation augmente suite au traitement avec la CPT ou le VP16 (Figure 13A). Seulement 10 minutes après le traitement à la CPT, une légère augmentation de la phosphorylation de Abl est observée, et augmente de façon beaucoup plus importante à partir de 20 minutes (Figure 13A). Le niveau de phosphorylation de Abl se maintient ainsi jusqu'à 30 minutes avant de décroître sensiblement 60 et 120 minutes après le traitement (Figure 13A). Globalement, la cinétique d'activation de Abl dans les cellules traitées au VP16 est relativement similaire à ce qui a été observé dans le cas du traitement à la CPT, bien que le niveau de phosphorylation de Abl se maintient pendant au moins 60 minutes pour décroître sensiblement 2 h suivant le traitement (Figure 13A). La ré-hybridation de la membrane avec un anticorps reconnaissant la forme non phosphorylée et phosphorylée de Abl a démontré que le traitement avec les agents chimiothérapeutiques ne module pas l'expression globale de la protéine dans les cellules HL-60 (Figure 13A). L'inhibiteur STI571, aussi connu sous le nom commercial GLEEVEC®, est un agent chimiothérapeutique utilisé contre la leucémie et qui est connu



**Figure 12: Effet du répresseur I $\kappa$ B-(SR) sur la fragmentation de l'ADN induite par la camptothécine ou l'étoposide dans les cellules HL-60.** Les cellules HL-60 ont été préalablement marquées avec la (2-<sup>14</sup>C)-thymidine et ont été transfectées par électroporation avec les vecteurs pCDNA3.1 et pCDNA3.1 I $\kappa$ B-(SR). 24 heures suivant la transfection, les cellules ont été traitées avec la CPT (1.0  $\mu$ M) (panneau de gauche) ou le VP16 (50 $\mu$ M) (panneau de droite) pour une période de 30 minutes suivie d'une période d'incubation dans du milieu frais sans agents chimiothérapeutiques. Aux temps indiqués suivant le traitement à la CPT ou au VP16, la cinétique de fragmentation de l'ADN a été mesurée par la technique d'éluion sur filtre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fragmentation de l'ADN et chacun des points représentent la moyenne de 3 expériences différentes  $\pm$  SE. Légende: ■: vecteur contrôle pCDNA3.1; ●: I $\kappa$ B-(SR).



**Figure 13: Cinétique d'activation de la kinase Abl et son rôle sur la fragmentation de l'ADN suite à un traitement à la camptothécine ou à l'étoposide.** Les cellules ont été traitées avec la CPT (1.0  $\mu\text{M}$ ) (panneaux de gauche) ou au VP16 (50  $\mu\text{M}$ ) (panneaux de droite) pour une période de 30 minutes suivie par l'incubation des cellules dans du milieu frais sans agent chimiothérapeutique. **A)** Aux temps indiqués suivant le traitement avec la CPT ou le VP16, des analyses de buvardage de type Western ont été effectuées en utilisant un anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de Abl. Les membranes ont été ré-hybridées une seconde fois avec un anticorps reconnaissant toute les formes de Abl. Les membranes ont été également ré-hybridées une troisième fois avec un anticorps reconnaissant la protéine Crk-L afin d'évaluer la qualité expérimentale. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences différentes. **B)** Les cellules HL-60 qui ont été préalablement marquées avec la (2- $^{14}\text{C}$ )-thymidine, ont subi ou non un prétraitement avec l'inhibiteur STI571 pendant une période de une heure. Par la suite, les cellules ont été traitées à la CPT ou au VP16 et aux temps indiqués suivant le traitement, la fragmentation de l'ADN a été évaluée par la technique d'éluion sur filtre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fragmentation de l'ADN et chaque points représentent la moyenne des résultats obtenus à partir de trois expériences différentes  $\pm$  SE. Légende: ●: CPT ou VP16 □: STI571 ■: STI571 combiné avec la cpt ou le vp16.

pour inhiber efficacement la protéine de fusion BCR-Abl et avec un peu moins d'efficacité, la kinase Abl [562, 563]. L'inhibiteur STI571 est une petite molécule qui traverse la membrane cytoplasmique et cible le domaine de liaison à l'ATP dans le domaine kinase de Abl, lorsque celle-ci adopte une conformation fermée et inactive [613]. C'est en empêchant la liaison de l'ATP à la kinase que le composé STI571 inhibe Abl.

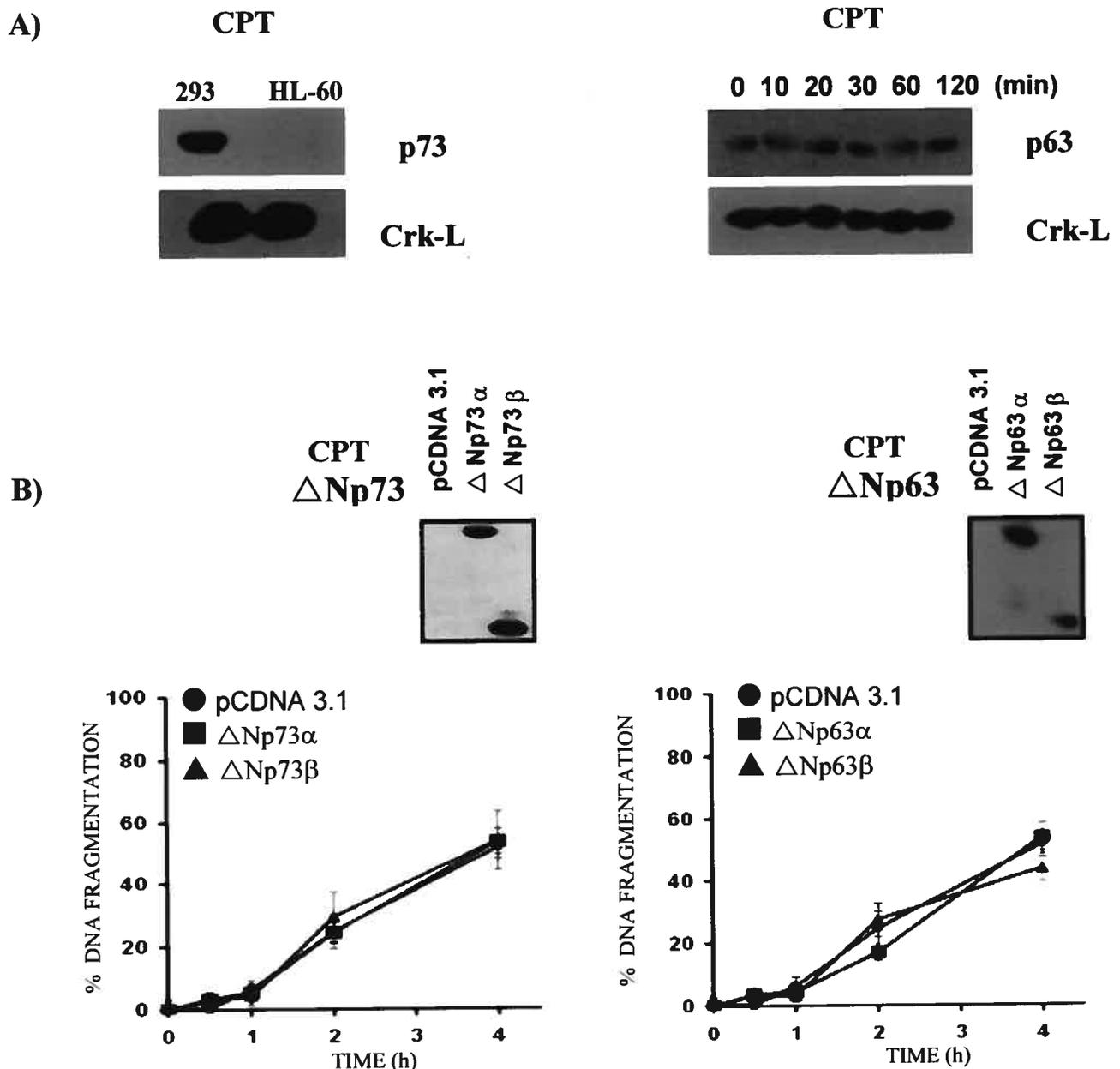
Pour évaluer l'importance de l'activation de Abl dans la cytotoxicité générée par la CPT et le VP16, l'activité de Abl a été inhibée par le STI571 et les cinétiques de fragmentation de l'ADN ont été mesurées.

Deux heures suivant le traitement à la CPT, les cellules traitées au STI571 présentent une diminution d'environ 20% de la fragmentation de l'ADN par rapport aux cellules contrôles et cette diminution se maintient 4 h après traitement (Figure 13B). Contrairement à ces observations, le traitement des cellules au STI571 n'affecte aucunement la sensibilité des cellules HL-60 à l'apoptose induite par le VP16 (Figure 13B). Les cellules HL-60 qui ont été traitées au STI571 seul ne présentent aucune fragmentation de leur ADN, démontrant qu'à la concentration de STI571 et qu'aux intervalles de temps étudiés dans les expériences, le STI571 n'est pas toxique dans les HL-60 (Figure 13B). Ces résultats suggèrent que l'activation de la kinase Abl participe aux voies de signalisation associées à l'apoptose induite par la CPT. Bien que celle-ci soit également activée par la présence de VP16, son rôle dans la cytotoxicité de cet agent anticancéreux demeure énigmatique.

### **3.8 LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA FONCTION PROAPOPTOTIQUE DE ABL DANS LES CELLULES TRAITÉES À LA CAMPTOTHÉCINE**

Pour évaluer la voie de signalisation en aval de l'activation de Abl dans les cellules HL-60 traitées à la CPT, dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse que la protéine p73, et peut-être même p63, étaient possiblement des effecteurs de Abl capables d'induire le déclenchement du programme apoptotique dans la cellule HL-60. Tout d'abord, des analyses de buvardage de type Western ont montré que les cellules HL-60 n'exprimaient pas les principaux isoformes de p73, soit la forme  $\alpha$  et  $\beta$ , alors que p73 fut détecté dans un

contrôle positif, soit des extraits protéiques provenant de la lignée cellulaire 293, prouvant ainsi l'efficacité du transfert et la qualité de l'anticorps utilisé pour cette expérience (Figure 14A). Cette observation avait d'ailleurs été faite par une autre équipe de recherche [564, 565]. Contrairement à p73, la protéine p63 est bien exprimée dans les cellules HL-60 (Figure 14A).



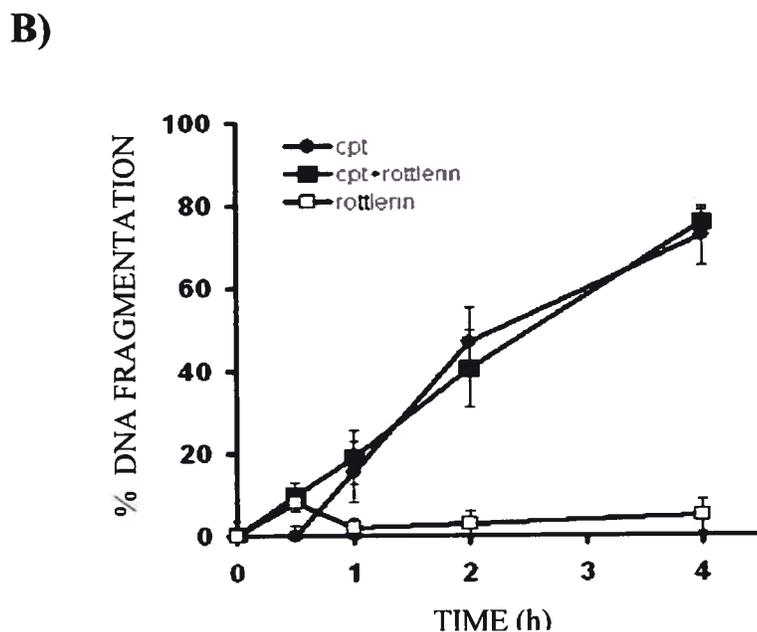
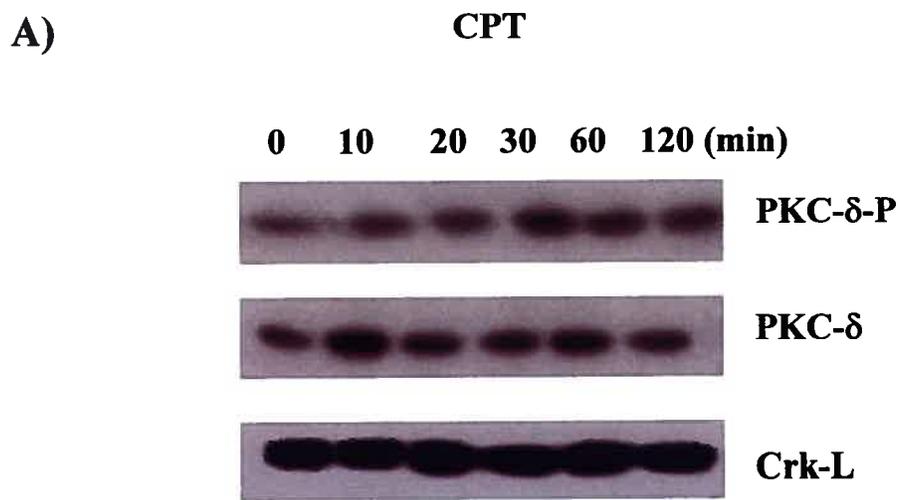
**Figure 14: Cinétique d'expression des protéines p63 et p73 et effet de la surexpression des isoformes dominantes-négatives  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\beta$ ,  $\Delta$ Np73 $\alpha$  et  $\Delta$ Np73 $\beta$  sur la fragmentation de l'ADN induite par la camptothécine dans les cellules HL-60.** **A)** Les cellules HL-60 ont été traitées à la CPT (1  $\mu$ M) et aux temps indiqués suivant le traitement, des analyses d'immunobuvardage de type Western ont été effectuées afin de détecter la forme endogène de p73 (panneau de gauche) et p63 (panneau de droit). Des extraits protéiques provenant des cellules 293 ont été utilisés comme contrôl positif pour la protéine p73. Les membranes ont été hybridées une seconde fois avec un anticorps reconnaissant la protéine Crk-L afin d'évaluer la qualité expérimentale. Les résultats obtenus sont représentatifs de trois expériences distinctes. **B)** Les cellules HL-60 ont été transfectées par électroporation avec les vecteurs pCDNA3.1,  $\Delta$ Np73 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np73 $\beta$  (panneau de gauche) et  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\beta$  (panneau de droite). 24 heures suivant la transfection, les cellules ont été traitées avec la CPT (1.0  $\mu$ M) pour une période de 30 minutes suivie d'une période d'incubation dans du milieu frais sans agents chimiothérapeutiques. Aux temps indiqués suivant le traitement à la CPT, la cinétique de fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose a été mesurée par la technique d'éluion sur filtre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fragmentation de l'ADN et chacun des points représentent la moyenne de 3 expériences différentes  $\pm$ SE. Légende: pCDNA3.1 (■):  $\Delta$ Np63 $\alpha$  ou  $\Delta$ Np73 $\alpha$  (▲):  $\Delta$ Np63 $\beta$  ou  $\Delta$ Np73 $\beta$ .

Comme il n'existe pas d'anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de p63, il a été impossible de déterminer si le traitement avec les agents chimiothérapeutiques conduisait à l'activation de p63.

Néanmoins, nous avons procédé à des analyses fonctionnelles de ces protéines en utilisant les isoformes naturels  $\Delta Np73\alpha$ ,  $\Delta Np73\beta$ ,  $\Delta Np63\alpha$  et  $\Delta Np63\beta$  qui agissent comme des dominants négatifs des protéines p73 $\alpha$ , p73 $\beta$ , p63 $\alpha$  et p63 $\beta$  respectivement. Comme en témoigne les analyses présentées à la Figure 14B, la surexpression de ces isoformes dominants négatifs ne modifie pas les cinétiques de fragmentation de l'ADN dans les cellules traitées à la CPT, comparé aux cellules transfectées avec un vecteur contrôle (Figure 14B). Il semble donc que l'apoptose dépendante de Abl induite par la CPT implique des voies de signalisation indépendantes à p63 et p73.

Dans le but d'identifier un effecteur en aval de Abl, nous avons étudié la PKC- $\delta$ , qui a aussi été décrite pour interagir directement avec Abl, et favoriser le déclenchement de l'apoptose suite à certains stimuli [523, 524, 527, 528]. Le traitement des cellules HL-60 à la CPT n'induit qu'une très modeste activation de la PKC- $\delta$  dont le niveau de phosphorylation dans les 20 premières minutes suivant le traitement est très similaire au niveau d'activité basale observé dans les cellules contrôles. Ce n'est qu'à partir de 30 minutes après traitement qu'une légère mais significative augmentation de l'activation de PKC- $\delta$  est observée. Ce niveau de phosphorylation se maintient jusqu'à 2 h après traitement (Figure 15A). La membrane a été ré-hybridée une seconde fois avec un anticorps qui reconnaît la forme non phosphorylée et phosphorylée de PKC- $\delta$ , ce qui a permis de conclure que la CPT n'affectait pas de façon significative l'expression de la protéine (Figure 15A). Le niveau d'expression de Crk-L est montré comme contrôle (Figure 15A). Par la suite, le rottlerin, un inhibiteur spécifique de la PKC- $\delta$ , a été utilisé pour évaluer l'importance de cette kinase dans la signalisation de l'apoptose induite par la CPT dans les cellules HL-60. Initialement isolé à partir de la plante *Mallotus philippinensis*, le rottlerin est un inhibiteur spécifique à la PKC- $\delta$  lorsqu'il est utilisé à de faibles concentrations. À des concentrations plus élevées, le rottlerin inhibe les autres isoformes de la famille des PKC [616]. Il semble que l'inhibition de la PKC- $\delta$  par le rottlerin implique un mécanisme de compétition avec l'ATP et empêche sa liaison à la PKC- $\delta$  [616].

Les cinétiques de fragmentation de l'ADN induite par un traitement à la CPT sont très similaires chez les cellules traitées ou non traitées au rottlerin (Figure 15B). Ces résultats démontrent que la PKC- $\delta$  ne participe pas de façon significative à l'apoptose induite par la CPT, malgré le fait que cet agent anticancéreux entraîne une légère activation de la PKC- $\delta$ . En résumé, nos résultats indiquent que l'activation de Abl semble favoriser le déclenchement de l'apoptose induite par la CPT, mais cette voie de signalisation semble indépendante de l'activation de p73, p63 ou de la PKC- $\delta$ .



**Figure 15: Cinétique d'activation de la PKC- $\delta$  et son rôle dans la fragmentation de l'ADN induite par un traitement à la camptothécine dans les cellules HL-60.** Les cellules ont été traitées avec la CPT (1.0  $\mu$ M) pour une période de 30 minutes suivie par l'incubation des cellules dans du milieu frais sans agent chimiothérapeutique. **A)** Aux temps indiqués suivant le traitement avec la CPT, des analyses d'immunobuvardage de type Western ont été effectuées en utilisant un anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de la PKC- $\delta$ . Les membranes ont été ré-hybridées une seconde fois avec un anticorps reconnaissant toutes les formes de la PKC- $\delta$ . Les membranes ont été également ré-hybridées une troisième fois avec un anticorps reconnaissant la protéine Crk-L afin d'évaluer la qualité expérimentale. Les résultats obtenus sont représentatifs de trois expériences différentes. **B)** Les cellules HL-60 qui ont été préalablement marquées avec la (2- $^{14}$ C)-thymidine, ont été traitées à la CPT et aux temps indiqués suivant le traitement, la fragmentation de l'ADN a été évaluée par la technique d'éluion sur filtre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fragmentation de l'ADN et chaque point représente la moyenne des résultats obtenus à partir de trois expériences différentes  $\pm$  SE. Légende: ● CPT □ rottlerin ■ rottlerin + CPT

## **Chapitre IV**

### **DISCUSSION**

Depuis une trentaine d'années, de nombreux scientifiques investissent de considérables ressources afin de comprendre par quels modes d'action les agents chimiothérapeutiques éliminent les cellules tumorales. Dans un contexte plus spécifique, nous avons tenté de comprendre par quels mécanismes cellulaires la camptothécine et l'étoposide peuvent induire l'apoptose dans une lignée leucémique déficiente pour p53. Le choix d'une lignée cellulaire n'exprimant pas p53 nous semblait particulièrement judicieux puisque, contrairement aux voies apoptotiques p53 dépendantes qui sont assez bien caractérisées dans un contexte de dommage à l'ADN, on connaît beaucoup moins bien les voies de signalisation apoptotiques indépendantes de p53. De plus, des mutations dans le gène de p53 et l'inactivation de la protéine sont fréquemment observées dans les tumeurs d'origine humaine [496, 500]. Cette observation constitue un paramètre biologique important à considérer lors de la réponse tumorale à la chimiothérapie, et l'utilisation d'un modèle cellulaire déficient pour p53 nous permet de mimer la situation en laboratoire. L'intérêt que nous avons initialement arboré pour les récepteurs de la mort cellulaire (RMC) découle directement de notre curiosité à comprendre de quelle façon la cellule transmet un signal du noyau, suivant l'induction des dommages à l'ADN, vers la mitochondrie, pour engager le programme de l'apoptose. Évidemment, les RMC constituaient une excellente cible puisqu'il avait été démontré que certains récepteurs et ligands tels que Fas, FasL et DR5 pouvaient être transactivés suite à un dommage à l'ADN, et que par l'intermédiaire de l'activation de la caspase-8 et subséquemment du clivage de Bid, ceux-ci déclenchaient les événements mitochondriaux. Conséquemment, les RMC constituaient peut-être le chaînon manquant qui permettait de relier les événements nucléaires aux événements mitochondriaux. Lorsque j'ai amorcé mes travaux de recherche au sujet des RMC, très peu de données scientifiques existaient à propos des mécanismes reliant la voie mitochondriale à la signalisation nucléaire et au cours des dernières années, parallèlement à mes travaux, plusieurs observations scientifiques permirent une meilleure compréhension de la nature de ces événements. Une piste prometteuse, que nous discuterons plus en détails à la section 4.4, implique l'histone H1.2 qui, après avoir reconnu les lésions subies par la chromatine, quitterait le noyau pour atteindre la mitochondrie et enclencher le processus apoptotique. Également, certains des membres, appartenant à la famille des Bcl-2 proapoptotiques possédant un domaine BH3 unique, seraient activés suite aux dommages à l'ADN et subiraient eux aussi une translocation vers la mitochondrie afin d'induire l'apoptose.

#### **4.1 LE RÔLE DES RÉCEPTEURS DE LA MORT CELLULAIRE DANS L' APOPTOSE INDUITE PAR LA CHIMIOTHÉRAPIE**

Plusieurs études ont proposé que les RMC incluant Fas, DR4 ou DR5 en présence ou en absence de leurs ligands participaient à l'apoptose induite par la chimiothérapie et la radiothérapie [271, 272, 300, 319, 323, 326, 333, 566-581]. Au contraire, d'autres groupes ont rapporté que l'apoptose induite par les stress génotoxiques est indépendante des voies de signalisation associées aux récepteurs de la mort cellulaire [269, 329, 575, 582-587]. Les études d'immunohistochimie impliquant l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé au FITC et la confirmation de ces premières observations par un second essai à l'immunoperoxidase (Figure 2) ont révélé que les récepteurs DR3 et DR4 s'oligomérisaient à la membrane cellulaire chez les cellules HL-60 traitées avec la camptothécine (CPT) ou à l'étoposide (VP16). L'augmentation du signal fluorescent à la surface cellulaire peut, dans certains cas, être corrélée à une activation transcriptionnelle du récepteur mais comme nous l'avons démontré par des études de buvardage de type Western et de cytofluométrie de flux présentées aux Figures 3 et 4, l'expression des récepteurs est stable suite aux traitements avec la CPT ou le VP16, signifiant que l'augmentation du signal fluorescent est plutôt la conséquence de la propriété des RMC à s'oligomériser entre eux. Il faut aussi garder à l'esprit que l'implication des RMC dans le processus de mortalité peut s'effectuer indépendamment de la variation de son expression. D'ailleurs, certaines études ont démontré que malgré une augmentation de l'expression de FasL, celui-ci ne participait pas à l'apoptose induite par la chimiothérapie[582]. En fait, puisque les RMC sont déjà présents à la surface de la cellule avant de subir le traitement avec les drogues, il est tout à fait concevable que leur activation ne nécessite pas obligatoirement la synthèse de nouveaux récepteurs. En fait, d'autres mécanismes comme l'oligomérisation du récepteur et l'augmentation de la synthèse des ligands et/ou la sécrétion de ligand à l'extérieur de la cellule sont des mécanismes qui peuvent conduire à l'activation des RMC sans pour autant nécessiter une augmentation de leur expression. Toute cette perception au niveau de la relation existant entre l'expression d'un récepteur et de son activation et par le fait même, de son implication dans le processus apoptotique, remonte aux premières études effectuées il y a environ une dizaine d'années au sujet de l'implication de Fas dans la chimiothérapie. À la lumière de nos observations et des connaissances scientifiques actuelles, il est évident qu'il n'existe pas toujours une corrélation directe entre l'activation et le niveau

d'expression d'un RMC, d'où l'importance de procéder à des analyses fonctionnelles avant de conclure sur leur fonction biologique dans un contexte de chimiothérapie.

Le modèle classique d'activation des RMC nécessite une interaction physique entre le récepteur et son ligand respectif. Pourtant, au fil des années, des modèles d'activation des RMC se produisant indépendamment de la présence du ligand ont aussi été établis. Il semble que les RMC peuvent, dans certains cas, transduire un signal apoptotique en s'oligomérisant eux-même. En fait, c'est l'agrégation du récepteur à la surface de la cellule qui mimerait l'interaction ligand-récepteur et permettrait le déclenchement des événements intracellulaires aussi efficacement qu'en présence du ligand [269-272]. Le mécanisme impliqué dans l'oligomérisation des récepteurs est inconnu, mais il pourrait impliquer les radeaux lipidiques et/ou les domaines PLADs du récepteur [273-276]. Au contraire, d'autres scientifiques croient que l'oligomérisation du RMC changerait suffisamment sa conformation et inhiberait la transmission du signal apoptotique [277, 309]. Il est également possible que l'agrégation ordonnée du récepteur (ex. : domaine PLADs) induirait un signal apoptotique en mimant l'effet du ligand et qu'une agrégation désordonnée du récepteur entraînerait une inhibition du signal apoptotique en bloquant la liaison du ligand au récepteur. Évidemment, le premier modèle nous intéressait particulièrement et par le fait même, il était crucial de déterminer si l'oligomérisation des récepteurs DR3 et DR4, observé suite au traitement avec la CPT ou le VP16, était suffisante pour transduire un signal apoptotique dans la cellule. L'activation des récepteurs, suite à leur oligomérisation, implique normalement le recrutement de molécules adaptatrices et de la procaspase-8 ou 10, formant des complexes de haut poids moléculaire (HPM). Étant incapable de détecter la présence de ces complexes et de leurs composantes par immunoprécipitation, nous avons opté pour une approche alternative, en procédant aux analyses chromatographiques. Le traitement avec la CPT ou le VP16 induit la formation de complexes HPM et il est très intéressant de constater la présence des récepteurs DR3 et DR4 au sein de deux complexes HPM distincts formés après le traitement avec les différentes drogues, corrélant le phénomène d'agrégation des RMC observé initialement par les études d'immunohistochimie (Figure 5A). Ceci suggère que l'oligomérisation de ces récepteurs à la surface de la cellule conduit à la formation de complexes protéiques en recrutant différentes molécules intracellulaires. Ce processus semble hautement spécifique puisqu'il est dépendant du type de lésions induit dans la cellule. La CPT et le VP16, qui inhibent

respectivement les topoisomérases I et II, induisent des lésions similaires mais par des mécanismes moléculaires différents. Le VP16 induit immédiatement des cassures DSB alors que la CPT induit plutôt des cassures SSB, et pour transformer ces cassures en lésions DSB, la fourche de réplication lors de la synthèse de l'ADN doit entrer en collision avec le complexe CPT-topoisomérase I [50, 51, 70]. Cette subtilité moléculaire est pourtant suffisante pour induire la formation de complexes différents : DR3 avec la camptothécine et l'étoposide, DR4 surtout avec l'étoposide. De plus, aucun complexe HPM avec le récepteur Fas n'a été détecté chez les cellules traitées avec l'une ou l'autre de ces drogues. Des études d'immunohistochimie ont aussi montré que le traitement des cellules avec le cisplatine, qui provoque des lésions à la chromatine par des mécanismes moléculaires très différents des inhibiteurs de topoisomérases, est incapable d'induire l'agrégation des récepteurs Fas, DR3 et DR4 (résultats non montrés). Il semble donc que le type de dommages induit à l'ADN et l'activation des voies de signalisation subséquentes jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'oligomérisation des récepteurs DR3 et DR4 et la formation de complexes HPM distincts dans la cellule.

Il a été étonnant de constater que ce processus biologique, régulé avec autant de précision, ne semblait pas recruter les principales molécules adaptatrices telles que FADD et TRADD (Figure 5B). La protéine TRADD qui est impliquée avec de nombreux récepteurs (TNFR1, DR3 et DR6) et FADD qui est l'adaptateur central commun à tous les récepteurs sont essentielles pour transmettre les signaux intracellulaires et provoquer le déclenchement de l'apoptose. Ces observations pouvaient suggérer entre autres que les complexes observés n'étaient pas fonctionnels. D'ailleurs la présence de l'inhibiteur SODD aux complexes DR3 renforçait cette idée (Figure 5C). Étant associé en permanence à la portion intracytoplasmique des récepteurs TNFR1 ou DR3, c'est uniquement en présence du ligand que SODD se dissocie du récepteur, afin de permettre le recrutement des différentes molécules adaptatrices nécessaires à l'induction de l'apoptose, ce qui expliquerait notre incapacité à détecter FADD ou TRADD pour les complexes DR3 [308]. Ceci dit, il est également possible que la présence de SODD aux complexes n'ait aucune incidence sur le processus apoptotique puisque les cellules dérivées à partir de souris knockout pour SODD ont montré une sensibilité identique à l'apoptose, par comparaison aux cellules exprimant l'inhibiteur, suggérant que SODD ne régule peut-être pas l'apoptose tel que décrit initialement [310]. Il est certain qu'on ne peut pas rejeter complètement l'idée que les

conditions expérimentales utilisées, qui ont été uniformisées pour l'ensemble de l'analyse de chromatographie, ne soient pas optimisées pour certaines des protéines étudiées. Il est possible que ces conditions favorisent le détachement de certaines protéines du complexe, dont FADD. De plus, un concept très récent propose que certains des RMC sont incapables de recruter FADD et la procaspase-8 au complexe du DISC, malgré le fait que ces protéines soient impliquées dans l'apoptose associée aux récepteurs. Certains croient que FADD est recruté par le récepteur mais se dissocie tellement rapidement de celui-ci qu'on ne détecte sa présence uniquement dans le cytoplasme, sous forme de complexes avec la procaspase-8, ce qui permettrait l'activation des autres protéines effectrices de l'apoptose [286-288]. En se basant sur ce modèle, il est vrai que notre incapacité à détecter l'adaptateur FADD aux complexes HPM n'implique pas nécessairement que cette protéine ne participe pas à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques. C'est particulièrement vrai pour le complexe DR4 détecté chez les cellules HL-60 traitées avec le VP16, puisque contrairement au complexe DR3, il n'y a aucun inhibiteur (FLIP et SODD) présent au complexe, offrant la possibilité que le complexe DR4 soit fonctionnel. Évidemment, il est possible que ce complexe ait pu recruter d'autres inhibiteurs que nous n'avons pas testés tels que les autres isoformes de l'inhibiteur FLIP, les molécules inhibitrices appartenant à la famille PED/PEA-15 ou encore l'isoforme L de la procaspase-8 qui inhibe l'interaction FADD-procaspase-8 [588-590].

En résumé, les paradoxes des différents concepts scientifiques et la grande variabilité des données qui existent actuellement dans la littérature compliquent beaucoup l'interprétation de nos observations. Néanmoins, la surexpression en transitoire de l'inhibiteur SODD et de la forme dominante négative de tous les adaptateurs connus des RMC (FADD, DAP3 et le mutant de délétion en N-terminal de TRADD) dans deux lignées cellulaires distinctes traitées avec la CPT ou le VP16 nous permettent d'affirmer que les RMC, et plus précisément les complexes DR3 et DR4, ne sont pas impliqués de façon très importante dans l'apoptose induite par ces agents chimiothérapeutiques ou à tout le moins, ils agissent indépendamment des voies associées à FADD, TRADD, DAP3 et SODD (Figure 6). En mesurant la fluorescence de la protéine GFP présente dans la construction pcDNA3-GFP-FADD(80-208), nous avons pu établir que l'efficacité des transfections se situe autour de 70 % et pour chacune des expériences, nous avons détecté l'expression des dominants négatifs dans la cellule, démontrant le succès de la technique. Bien que l'efficacité des

dominants négatifs que nous avons utilisés soit reconnue par l'ensemble de la communauté scientifique oeuvrant dans le domaine, on ne peut pas complètement rejeter l'hypothèse qu'ils ne sont peut-être pas fonctionnels dans la cellule. Néanmoins, les vecteurs d'expression pRK-FLAG-SODD et pcDNA3-GFP-FADD (80-208), exprimant l'inhibiteur SODD, et le dominant négatif de FADD, que nous avons reçu gracieusement du Dr W. Liu et du Dr H. Wajant, ont déjà fait leur preuve [308, 546]. Ce dominant négatif de FADD, qui a été abondamment utilisé par le passé et dont la capacité à inhiber la signalisation associée aux récepteurs de la mort cellulaire a été démontré dans une grande variété de systèmes cellulaires telles que les cellules HL-60 et U937 [546, 591, 592]. Puisque nous avons utilisé exactement la même construction que le Dr Wajant dans des systèmes cellulaires identiques, il est peu probable que le dominant négatif de FADD ne soit pas fonctionnel. À partir du vecteur d'expression pRK-MYC-TRADD obtenu du Dr Goeddel, le mutant de délétion de TRADD a été produit en générant une délétion dans le domaine N-terminal pour les acides aminés 1 à 108 de TRADD (TRADD-ND). L'absence de cette portion de la protéine avait été associée à la capacité du mutant à inhiber la signalisation apoptotique associée aux récepteurs connus pour recruter TRADD [547, 548].

Cependant, l'utilisation du dominant négatif de DAP3 a moins bien été caractérisée et sa fonction biologique est controversée. En effet, le rôle d'adaptateur de DAP3 pour les récepteurs DR4 et DR5 repose principalement sur les observations de Reed et de Kimchi alors qu'au contraire, d'autres études montrent que DAP3 n'est pas recruté par les RMC et en aucun cas, ne semblait participer à l'apoptose induite par le ligand TRAIL. Pour certains, DAP3 possède une fonction mitochondriale alors que pour d'autres, cette protéine interagit directement avec les récepteurs aux glucocorticoïdes [279, 280, 281, 593]. Il n'est donc pas si surprenant que la surexpression du dominant négatif de DAP3 ne module pas la sensibilité des cellules à l'apoptose, tout simplement parce que DAP3 n'est peut-être pas recruté par les récepteurs de la mort cellulaire. À cause de la controverse sur sa fonction biologique et le peu de données sur l'efficacité de son dominant négatif, il aurait été intéressant de vérifier la capacité inhibitrice de la protéine. Cependant, il faut garder à l'esprit que selon les modèles actuels, la protéine FADD est un adaptateur commun à tous les récepteurs et l'apoptose dépendante de DAP3 nécessite obligatoirement la présence de FADD. Par conséquent, la transfection avec le dominant négatif de FADD permettait de contrôler indirectement l'implication des récepteurs DR4 et DR5 que nous ciblions avec

DAP3. Donc, si le complexe DR4 était impliqué et que le dominant négatif de DAP3 n'était pas fonctionnel, on aurait observé un effet avec le dominant négatif de FADD. Comme nous n'avons détecté aucun effet avec les deux constructions, nous concluons que le complexe DR4 ne participe pas de façon importante dans l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques. Il est également possible que les complexes DR3 et DR4 induisent l'apoptose en recrutant une nouvelle molécule adaptatrice dont on ignore actuellement l'identité. Afin d'éliminer cette possibilité, nous avons tenté de bloquer l'expression des récepteurs en utilisant la technique des RNAi, permettant ainsi l'élimination de toute la signalisation en aval des récepteurs, nous amenant à conclure hors de tout doute possible que les récepteurs ne participent pas à l'apoptose induite par la CPT ou le VP16. Malheureusement, malgré l'utilisation de plusieurs ensembles d'oligonucléotides ARN double brins (siARN) distinctes pour chacun des récepteurs étudiés, nos tentatives se sont révélées infructueuses, jusqu'à ce jour. Puisque nous avons bloqué toutes les voies de signalisation connues associées au RMC, nous pouvons simplement affirmer que dans l'état actuel des connaissances scientifiques, tous les récepteurs de la mort cellulaire employant les voies associées à FADD, TRADD, DAP3 et SODD n'ont pas de rôle clé dans la cytotoxicité engendrée par la CPT ou le VP16.

Comme le montre la Figure 1A, nous avons détecté une rapide et modeste activation de la caspase-8 et puisque celle-ci est normalement associée aux récepteurs de la mort cellulaire, certains pourraient objecter que les RMC doivent nécessairement être impliqués dans le processus apoptotique induit par les agents chimiothérapeutiques. En fait, initialement, les études mesuraient l'implication des RMC en se basant sur l'activation de la procaspase-8. Depuis les dernières années, il est apparu que la procaspase-8 peut être activée indépendamment des récepteurs par des boucles de rétroaction impliquant les caspases effectrices comme les caspases-3 et -6, ce qui pourrait bien être le cas dans notre modèle [209, 214, 215]. En revanche, l'activation de la procaspase-9 suggère l'implication de la voie mitochondriale dans l'apoptose induite par la camptothécine ou l'étoposide, confirmant les études précédentes qui avaient été réalisées dans les cellules HL-60 traitées avec l'une ou l'autre de ces drogues [60, 103, 104, 105].

Tel que mentionné précédemment, comme les voies classiques associées aux RMC ne sont pas impliquées dans le processus de mortalité engendré par les agents chimiothérapeutiques

étudiés, il semble donc que la fonction biologique des complexes DR3 et DR4 soit négligeable dans ce contexte apoptotique. Pourtant, en se basant sur les différentes évidences expérimentales que nous avons obtenues, nous croyons que ces récepteurs pourraient tout de même posséder une fonction biologique dans le processus de cytotoxicité, bien qu'elle serait beaucoup plus nuancée que notre hypothèse initiale. Nous avons entre autres observé une diminution importante de l'expression des inhibiteurs SODD et FLIP 4 h après le traitement avec les agents chimiothérapeutiques, suggérant une activation potentielle des RMC à partir de ce moment (Figure 3-4). On pourrait également croire que l'effet inhibiteur qu'exerce SODD sur le complexe DR3 serait tout simplement éliminé à partir de ce moment et que le potentiel proapoptotique de DR3 serait restauré. Néanmoins, l'activation des récepteurs se produirait très tardivement dans notre système. En effet, l'activation des caspases 1 h seulement après le traitement conduit au déclenchement rapide de l'apoptose et une très grande proportion de la population cellulaire est décimée à 4 h post-traitement (Figure 1). Conséquemment, l'activation des RMC se produit trop tardivement pour que ceux-ci puissent agir comme principal instigateur de l'apoptose, tel que nous le supposions au début de l'étude. Cependant, cette activation tardive des RMC signifierait que ceux-ci agiraient possiblement comme boucle d'amplification dans le processus de cytotoxicité engendré par les agents chimiothérapeutiques. Notre modèle cellulaire est très sensible à l'action des agents anticancéreux, mourant rapidement par apoptose et dans un tel contexte, le rôle d'amplificateur médié par les RMC est négligeable et difficilement discernable. Par contre, dans une situation où les cellules seraient lentes à mourir ou offriraient une résistance à l'action des drogues chimiothérapeutiques, la fonction d'amplificateur des RMC pourrait prendre toute son importance. En accord avec ce concept, il a été montré que certaines cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose possédaient un facteur cytoplasmique capable de neutraliser la voie mitochondriale de l'apoptose. Il semble que la seule présence du ligand TRAIL est suffisante pour contourner le blocage de la voie mitochondriale et renverser le phénotype de résistance chez ces cellules [594, 595]. Par conséquent, aussi modeste et tardive soit-elle, l'activation des RMC permettrait de rétablir le processus de mortalité dans les cellules résistantes, suggérant que cette voie alternative de l'apoptose fonctionnerait comme mécanisme de rechange dans le cas d'une défaillance des voies apoptotiques principales.

Une seconde évidence expérimentale, qui pourrait suggérer indirectement un rôle pour les RMC dans la chimiothérapie, est la présence de SODD au complexe DR3 chez les cellules traitées avec la CPT ou le VP16. La présence de SODD explique en partie l'absence des adaptateurs FADD ou TRADD au DISC et évidemment, en absence de cet inhibiteur, on pourrait s'attendre à un recrutement des molécules adaptatrices au complexe et à une activation de la voie de signalisation associée à DR3. La CPT et le VP16 induisent l'oligomérisation de DR3 mais malheureusement, la forte expression de SODD dans les cellules HL-60 court-circuitent le processus apoptotique relié à DR3. Mais dans un autre type de cellules cancéreuses, qui n'exprimerait pas ou que très faiblement cet inhibiteur, il serait tout à fait plausible de croire que l'oligomérisation du récepteur DR3 induite par la CPT et le VP16 permettrait le recrutement des molécules adaptatrices et participerait à l'apoptose induite par ces drogues, ce qui impliquerait une fonction importante pour ce récepteur dans la chimiothérapie. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait inactiver l'expression de la protéine SODD par des techniques de ARNi ou d'ARNm antisens, afin de déterminer si on restaure le potentiel proapoptotique du complexe DR3 dans les cellules HL-60. De plus, on pourrait reprendre cette étude dans une lignée tumorale déficiente pour SODD et analyser si les agents anticancéreux induisent la formation de complexes DR3 fonctionnels. Ces expériences seraient d'autant plus intéressantes puisque le récepteur DR3 a été que très peu caractérisé par le passé et on ignore tout de sa fonction dans un contexte de chimiothérapie.

Finalement, nous avons obtenu une évidence expérimentale qui suggère encore plus directement un rôle des RMC dans l'apoptose induite par la CPT ou le VP16 en combinaison avec certains ligands de ces récepteurs. Plusieurs études ont démontré que la combinaison des ligands avec les agents chimiothérapeutiques produisait un effet cytotoxique coopératif dans une grande variété de cellules cancéreuses, suggérant qu'un traitement combiné pourrait se révéler très utile dans le traitement des tumeurs humaines et bien que cela ne soit pas toujours le cas, ces effets sont parfois corrélés à une augmentation de l'expression des récepteurs [221]. Certaines études ont aussi observé cet effet coopératif dans les cellules CEM et HL-60 traitées simultanément avec les ligands FasL ou TRAIL et des inhibiteurs de topoisomérase I ou II, et ont associé ce phénomène à une augmentation de l'expression du ligand et du récepteur étudiés [333, 585]. Ces auteurs expliquent que l'activité apoptotique accrue des récepteurs de la mort cellulaire est la conséquence directe

de l'augmentation de l'expression des ligands ou des récepteurs médiés par les drogues anticancéreuses et serait responsable de l'effet coopératif observé. Des observations similaires ont été faites dans notre étude. En dépit du fait que l'expression des récepteurs reste stable, un traitement combinant le ligand TRAIL et la présence de la CPT ou du VP16 accélère la cinétique de l'apoptose dans les cellules HL-60, par comparaison aux cellules qui ont été traitées uniquement avec la CPT, le VP16 ou TRAIL (Figure 7A). Cette observation implique qu'il existe un mécanisme de coopération entre le mode d'action de TRAIL et le mode d'action des drogues chimiothérapeutiques étudiées et que contrairement aux études citées précédemment, on ne peut expliquer ce phénomène par une augmentation de l'activité transcriptionnelle reliée aux récepteurs. En se basant sur nos propres observations, nous croyons plutôt que l'oligomérisation des récepteurs induite par la CPT ou le VP16 favoriserait l'interaction physique entre le ligand et le récepteur agrégé, ce qui conduirait à une accélération du niveau de l'apoptose dans la population cellulaire. La formation du complexe DR4 se produit principalement dans les cellules traitées avec le VP16, alors que l'accélération de l'apoptose dans les traitements combinant TRAIL et les drogues anticancéreuses a été observée aussi bien chez les cellules traitées à la CPT que celles qui ont été traitées au VP16. Il serait intéressant de déterminer si le récepteur DR5 possède également la capacité de s'agréger et de former un complexe HPM, tel qu'observé avec le récepteur DR4, quoiqu'il faut garder à l'esprit que les analyses d'immunohistochimie suggéraient un peu d'oligomérisation pour le récepteur DR4 dans le cas des cellules traitées à la CPT. Si ces drogues, et particulièrement dans le cas de la CPT, induisent la formation d'un complexe DR5 fonctionnel, cela permettrait de réconcilier le fait que malgré une faible oligomérisation du complexe DR4 chez les cellules traitées à la CPT, l'accélération de la cinétique d'apoptose entre cette drogue et le ligand TRAIL s'expliquerait par l'activation du complexe DR5. Au contraire de TRAIL, la présence des ligands potentiels de DR3, TWEAK et TL1A ne sensibilisent pas les cellules à l'apoptose induite par la CPT ou le VP16. Nos résultats confirment les études précédentes qui remettent en question l'identité de ces protéines comme ligands de DR3. Initialement, TWEAK avait été identifié comme le ligand de DR3 [223]. Cependant, des études de liaisons ligand-récepteur effectuées par plusieurs groupes n'ont pas permis de confirmer l'interaction TWEAK-DR3 [224, 225, 226]. De plus, il semble que TWEAK peut se lier à la surface de cellules qui n'expriment pas DR3, suggérant l'existence d'un second récepteur pour TWEAK [227, 228]. Récemment, il a été proposé que TL1A serait le véritable ligand

de DR3, bien que tout comme TWEAK, cette conclusion ne fait pas l'unanimité parmi la communauté scientifique [229]. Par conséquent, si nos cellules semblent résistantes à l'action de TWEAK ou TL1A alors que nous détectons la présence du récepteur DR3 sous forme de complexe, cela nous indique qu'ils ne sont probablement pas les ligands de DR3 ou à tout le moins, ils sont de très faibles activateurs du récepteur.

Ceci dit, il est évident que pour les cellules HL-60 qui sont des cellules extrêmement sensibles à l'apoptose, le rôle des récepteurs de la mort cellulaire dans cette lignée apparaît plutôt limité et d'autres voies plus importantes doivent participer au processus afin d'expliquer la forte cytotoxicité engendrée par la CPT ou par le VP16. Mais puisque que nous avons mis en évidence la présence de ces mécanismes moléculaires dans les cellules HL-60, il n'est pas exclu que ces mêmes mécanismes peuvent revêtir une plus grande importance dans des tumeurs humaines offrant des contextes cellulaires et environnementaux différents.

Il serait donc possible que parmi les réponses cellulaires médiées par la CPT et le VP16, l'oligomérisation de certains récepteurs de la mort cellulaire puisse sensibiliser les cellules à l'action des ligands de ces récepteurs. De plus, la régulation négative exercée par les inhibiteurs SODD et FLIP décroît de façon importante après traitement, suggérant que les complexes DR3 et DR4 pourraient aussi agir comme une voie alternative et d'amplification dans le processus apoptotique lors des traitements combinant ligands et drogues anticancéreuses.

Ces dernières années, les chercheurs ont essayé de trouver une application thérapeutique aux récepteurs de la mort cellulaire dans le traitement du cancer, avec plus ou moins de succès. Comme le suggère nos résultats et plusieurs autres études récentes, le potentiel apoptotique des RMC dans les cellules cancéreuses dépend avant tout des points de régulation négatifs comme FLIP [266, 307, 596] ou SODD (nos travaux; [309, 316, 597]) et dans certains cas, détermine la résistance de la cellule à l'action des RMC. Bien que les traitements combinés entre TRAIL et les drogues anticancéreuses semblent prometteurs et offrent une amélioration de l'efficacité des agents chimiothérapeutiques classiques (nos travaux; [263, 266, 267, 598], la présence de FLIP ou SODD représente tout de même des constantes cruciales dans l'équation thérapeutique des RMC. L'utilisation des RMC comme

cible thérapeutique nécessite peut-être la présence d'inhibiteurs spécifiques dirigé contre SODD ou FLIP qui, conjointement à la présence du ligand recombinant dans un cocktail thérapeutique, permettrait d'atteindre une efficacité clinique intéressante.

#### **4.2 L'ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LA PROTECTION DE LA CELLULE CONTRE LES AGENTS CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES**

De toute évidence, la camptothécine et l'étoposide activent des voies de signalisation autres que celles associées aux RMC pour induire rapidement l'apoptose dans les cellules HL-60. Afin d'identifier de nouvelles voies qui pourraient expliquer la cytotoxicité observée, on s'est intéressé au rôle potentiel des mapkinases et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui, malgré le fait qu'ils ont souvent été associés à des signaux de survie, ils avaient aussi été décrits pour être associés à une signalisation favorisant l'apoptose dans différents contextes cellulaires. L'intérêt que nous portions pour ces voies de signalisation reposait également sur le fait qu'elles permettraient peut-être de faire un lien avec notre première étude. En effet, il est bien connu que parallèlement à la voie apoptotique principale médiée par FADD, TRADD, DAP3 et la procaspase-8, la protéine adaptatrice TRADD permet également aux RMC de recruter des molécules adaptatrices secondaires telles que TRAF-2 et l'adaptateur-kinase RIP. L'interaction moléculaire entre ces trois protéines conduit à l'activation des mapkinases et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui sont aussi bien impliqués dans une signalisation associée à la survie ou dans l'induction de l'apoptose [222, 290-298]. Néanmoins, tel qu'illustré à la Figure 5B, non seulement la protéine TRADD ne semble pas être recrutée par les complexes DR3 ou DR4, mais en plus, la transfection du mutant de délétion de la protéine suggère qu'elle ne participe pas à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques étudiés. En se basant sur les connaissances scientifiques actuelles et malgré le fait qu'il existe toujours la possibilité que l'activation de NF- $\kappa$ B et des voies mapkinases par les RMC se produisent par une voie qui nous est inconnue jusqu'à ce jour, il serait peu probable que RIP et TRAF2 soient recrutés aux complexes DR3 ou DR4 en absence de TRADD et par conséquent, l'activation de ces voies de signalisation devraient se produire indépendamment des RMC.

En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que l'activation de la mapkinase p38 par la CPT ou le VP16 n'était pas affectée par la présence des dominants négatifs de FADD et du mutant de délétion en N-terminal de TRADD dans la cellule, indiquant que l'activation de cette voie semble se produire indépendamment des RMC (Figure 9). La mapkinase JNK est connue pour être activée en condition de stress dans une grande variété de lignées cellulaires et étonnamment, contrairement à la p38, la mapkinase JNK n'était pas activée par la présence de la CPT ou du VP16. En fait, les travaux exhaustifs de Cripes et de ses collaborateurs qui ont étudié le statut de JNK dans plus de 67 lignées leucémiques distinctes supportent notre observation en concluant que les JNK ne sont pas activées dans les cellules HL-60 traitées aux inhibiteurs de topoisomérases de la classe des anthracyclines. Seules les cellules HL-60/ADR, qui avaient développées une forte résistance à l'action des agents anticancéreux, semblaient posséder une forme active des JNK. Il avance que la sensibilité des 67 lignées cellulaires à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques dépend de l'activation des JNK [599]. Nous avons également observé que l'activation de la p38 se produisait indépendamment des kinases MKK4, MKK3 et probablement aussi de la MKK6, puisque l'anticorps que nous avons utilisé reconnaît aussi bien la forme phosphorylée de MKK3 que celle de MKK6. Mais contrairement au contrôle positif, nous ne détectons aucune bande, suggérant fortement que l'activation de la p38 se produit indépendamment de la classique cascade d'activation des mapkinases (Figure 8). Dans certains contextes, il a été montré que l'activation de la p38 se produit indépendamment de cette cascade, en interagissant directement avec la protéine TAB1. Bien qu'elle ne possède pas d'activité kinase, l'interaction de TAB1 avec la MAPK p38 provoque un changement de conformation de la kinase et conduit à son autophosphorylation [361, 362]. Afin de comprendre de quelle façon la p38 est activée par la CPT ou le VP16, il serait intéressant de déterminer si TAB1 est impliqué dans notre modèle.

L'utilisation de deux inhibiteurs chimiques distincts couramment utilisés pour inhiber spécifiquement la p38 ont montré une augmentation de la fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose chez les cellules traitées avec la CPT, suggérant une fonction antiapoptotique pour la kinase. La p38 inhiberait l'apoptose en diminuant l'activation de la procaspase-3 mais n'interférerait pas avec l'activation de la procaspase-9 (Figure 10). Contrairement à la CPT, la fonction biologique de la p38 chez les cellules traitées au VP16 reste indéterminée

(Figure 11). À première vue, il peut paraître étonnant que la fonction biologique de la p38 diffère pour la CPT et le VP16 puisque ces inhibiteurs de topoisomérases activent la p38 selon une cinétique quasi identique (Figure 8). Pourtant, il a été observé que le traitement d'une lignée de cellules tumorales avec l'étoposide, la doxorubicine et la vinblastine qui ciblent soit la topoisomérase II ou la tubuline, suscite une fonction biologique totalement différente pour les mapkinases ERK, JNK et la protéine p53 [381]. Cela illustre la complexité de la réponse cellulaire et explique la grande variabilité des résultats obtenus dans une même lignée cellulaire selon la drogue utilisée. Par conséquent, il est plus que plausible que dans notre modèle, la CPT et le VP16 qui inhibent deux cibles distinctes, soit la topoisomérase I et II, induisent dans les cellules HL-60 une fonction biologique différente pour la mapkinase p38.

De façon intéressante, l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par la transfection en transitoire d'un répresseur a procuré des résultats similaires à ce qui avait été observé avec la p38 (Figure 12). Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B posséderait une fonction antiapoptotique uniquement chez les cellules traitées à la CPT et comme l'intensité de la réponse associée à NF- $\kappa$ B est du même ordre que la réponse générée par la p38, cela soulève l'hypothèse que NF- $\kappa$ B et la p38 pourraient faire partie de la même voie de signalisation. En admettant que cette hypothèse soit juste et comme il est connu que NF- $\kappa$ B active la transcription des inhibiteurs de caspases appartenant à la famille des IAPs [408, 600-603], il serait tentant d'établir le modèle suivant : la p38 serait liée à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, qui à son tour activerait la transcription des IAPs, entraînant ainsi l'inhibition de la caspase-3, tel qu'observé avec les expériences présentées à la Figure 10. Évidemment, afin de confirmer ce modèle, il est crucial de déterminer s'il existe une association fonctionnelle entre la p38 et NF- $\kappa$ B. En procédant à des analyses d'EMSA ou à l'aide de constructions avec un gène rapporteur, il serait possible d'établir si l'inhibition de la p38 affecterait également l'activation de NF- $\kappa$ B et dans un tel cas, on pourrait également analyser si l'expression des IAPs est affectée. Aussi attrayant ce modèle soit-il, on ne peut pas complètement réfuter l'idée que la similarité entre la réponse induite par NF- $\kappa$ B et la p38 ne soit qu'une pure coïncidence expérimentale et bien que les deux protéines coopèrent afin de protéger la cellule de l'apoptose, elles peuvent aussi bien opérer au sein de deux voies de signalisation parallèle sans aucun lien direct entre elles. Cette

situation impliquerait que NF- $\kappa$ B serait activé par une voie de signalisation indépendante à la p38. Parmi les nombreux candidats décrits, la procaspase-8 représente une piste potentiellement plausible à l'égard de notre modèle expérimental. Étant décrit comme un effecteur proapoptotique important dans la cellule, il semble que cette caspase joue sur les deux tableaux et pourrait aussi inhiber le processus apoptotique. Grâce à son prodomaine situé à l'extrémité N-terminale, la procaspase-8 interagit directement avec les effecteurs en amont de NF- $\kappa$ B tels que la protéine adaptatrice RIP et les kinases NIK, IKK1 et IKK2, ce qui facilite l'activation du facteur de transcription, entraînant ainsi une réponse de protection contre l'apoptose [604]. Puisque nous avons remarqué que le traitement des cellules HL-60 à la CPT et au VP16 conduisait à l'activation rapide de la procaspase-8 (Figure 1) et que les récepteurs ne sont possiblement pas ou que très tardivement impliqués dans l'apoptose induite par les composés anticancéreux, il est plausible que dans notre modèle la procaspase-8 engage une réponse de protection en activant NF- $\kappa$ B. Afin de confirmer cette hypothèse, nous pourrions procéder à l'inhibition de la procaspase-8 et analyser si cela affecte l'activation de NF- $\kappa$ B.

Qu'il existe ou non une relation directe entre NF- $\kappa$ B et la p38, il semble que le mécanisme antiapoptotique de la p38 dans notre modèle implique une inhibition de l'activité associée à la caspase-3, et il n'en reste pas moins qu'elle représente une tentative de protection de la part de la cellule pour se protéger de l'effet cytotoxique de la CPT. Une étude publiée très récemment soutient nos observations en montrant que la p38 inhiberait l'apoptose en phosphorylant directement la procaspase-8 et la procaspase-3, ce qui accélérerait leur dégradation par le système d'ubiquitine [373]. La découverte que la cellule tente de se protéger contre l'action d'un agent chimiothérapeutique en activant une ou plusieurs voie(s) de signalisation est très certainement un fait intéressant mais il faut tout de même garder à l'esprit que cette tentative de protection est insuffisante pour permettre aux cellules HL-60 de survivre, puisque la quasi totalité de celles-ci meurent très rapidement par apoptose suite aux traitements. Cela implique également que ces cellules activent d'autres voies de signalisation qui la conduiront à sa propre destruction.

### 4.3 LA KINASE ABL ET SON RÔLE DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR LA CHIMIOTHÉRAPIE

Afin d'identifier une voie de signalisation qui serait impliquée dans l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques, nous nous sommes intéressé également aux voies très en amont dans la signalisation cellulaire suite à l'induction de lésions à l'ADN. La voie ATM/ATR est connue pour jouer un rôle clé dans la signalisation qui est activée suite à la présence de dommages à l'ADN. La kinase Abl qui est un effecteur direct de ATM/ATR, nous semblait une candidate particulièrement intéressante entre autres parce que Abl a été nouvellement associé à un rôle favorisant le déclenchement de l'apoptose en réponse à des stress génotoxiques ou oxydatifs [505-509, 523, 524]. De plus, de par sa capacité à lier directement la chromatine endommagée et à se déplacer du noyau au cytoplasme par l'intermédiaire de ses signaux d'exportation et de localisation nucléaire [454-460], Abl agirait peut-être comme messenger entre l'ADN endommagé et la mitochondrie, afin de transmettre un signal de mortalité et activer le programme d'apoptose. De toute évidence, nos résultats indiquaient que les RMC, les mapkinases et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B ne pouvaient pas constituer le chaînon manquant qui permettait d'expliquer comment la cellule arrivait à transmettre rapidement un signal proapoptotique du noyau vers la mitochondrie, et la kinase Abl représentait une candidate potentiellement intéressante.

Dans notre modèle, la kinase Abl est rapidement activée par les agents chimiothérapeutiques étudiés (Figure 13A), mais on a pu établir un rôle fonctionnel uniquement dans le cas des cellules HL-60 traitées avec la CPT et on ignore toujours sa fonction pour les cellules traitées au VP16. Tel qu'illustré à la figure 13A, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de Abl, le STI571, entraîne une diminution de la fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose induite par la CPT, suggérant qu'Abl est associé à une voie de signalisation favorisant le déclenchement de l'apoptose. Nous avons donc cherché à déterminer de quelle façon Abl pouvait activer l'apoptose dans ces cellules leucémiques. Une littérature relativement importante démontre un rôle favorisant l'apoptose pour p73 et propose que dans certains contextes expérimentaux, Abl induit l'apoptose en activant la protéine p73, ce qui en faisait une candidate de choix dans notre modèle cellulaire [464, 508, 509, 605-609]. Des buvardages de type Western ont révélé que les principaux isoformes de p73 ( $\alpha$  et  $\beta$ ) n'étaient pas détectés chez les cellules HL-60 (Figure 14A). Cette

observation a d'ailleurs été confirmée par d'autres laboratoires [564, 565]. Cependant, contrairement au gène codant pour la protéine p53 qui est totalement absent du génome des cellules HL-60, le gène de p73 semblait fonctionnel pour cette lignée cellulaire, puisqu'une étude avait montré la présence d'une très faible quantité d'ARNm dans les cellules et qu'il était possible, sous le traitement de certains agents, d'activer la transcription de p73 [564, 565]. Nous avons donc procédé à une analyse fonctionnelle pour élucider un rôle hypothétique des isoformes p73 $\alpha$  et  $\beta$  dans les cellules HL-60 en transfectant en transitoire les isoformes naturels  $\Delta$ Np73 $\alpha$  et  $\Delta$ Np73 $\beta$  qui agissent comme des dominants négatifs de p73 $\alpha$  et de p73 $\beta$ . La surexpression de ces dominants négatifs naturels des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de p73 n'affecte aucunement la sensibilité des cellules HL-60 à l'apoptose induite par la CPT (Figure 14B). À l'heure actuelle, on ne connaît que deux homologues à p53, soit p63 et p73, et des évidences expérimentales ont montré que la kinase Abl induit l'apoptose en activant directement p53 et/ou p73, mais on ignore si l'homologue p63 est également un substrat de la kinase [505-509]. Cependant, comme nous savions que deux des trois membres de cette famille (p53 et p73) n'étaient pas impliqués dans le processus apoptotique déclenché par un traitement des cellules HL-60 à la CPT, la protéine p63 devenait indirectement une candidate intéressante et pouvait constituer un effecteur potentiel de Abl. Cette fois, nous avons observé que la protéine était bien exprimée chez les cellules HL-60 mais comme à l'époque il n'existait pas d'anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de p63, nous ne pouvions déterminer si le traitement avec les agents chimiothérapeutiques conduisait à l'activation de la protéine (Figure 14A). Comme en témoigne les analyses présentées à la Figure 14B, la surexpression des isoformes naturels  $\Delta$ Np63 $\alpha$  et  $\Delta$ Np63 $\beta$  qui agissent comme dominants négatifs des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de la protéine p63 ne module en rien la sensibilité des cellules HL-60 à l'apoptose induite par la CPT. Il semble donc que l'apoptose induite par la CPT implique des mécanismes d'action qui sont p53, p63 et p73 indépendants dans les cellules HL-60. Cependant, il ne faut pas oublier que de nombreux isoformes ont été identifiés pour les protéines p63 et p73 [492-495] et qu'il est tout à fait possible que des isoformes autres que la forme  $\alpha$  et  $\beta$  des protéines p63 et p73 puissent participer à l'apoptose induite par Abl suite au traitement avec la CPT.

Finalement, nous avons étudié la kinase PKC- $\delta$  qui avait aussi été décrit pour interagir directement avec Abl et favoriser le déclenchement de l'apoptose dans certains contextes [523, 524, 527, 528]. Le traitement des cellules HL-60 à la CPT n'induit qu'une très modeste phosphorylation de la PKC- $\delta$  et l'utilisation du rottlerin, un inhibiteur de PKC- $\delta$  ne module pas les cinétiques de fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose induite par la CPT (Figure 15). Ces résultats suggèrent que la PKC- $\delta$  ne participe pas de façon significative dans le processus de cytotoxicité engendré par la CPT. Cependant, plus de 13 isoformes ont été identifiées dans la famille des PKC dont certains semblent associés à la survie cellulaire et à une fonction antiapoptotique ( $\alpha$ ,  $\epsilon$  et  $\iota$ ) [514-516] alors que d'autres semblent favoriser le déclenchement de l'apoptose ( $\delta$ ,  $\theta$  et  $\mu$ ) [517-519]. Il serait donc intéressant de poursuivre cette analyse en étudiant les autres isoformes de la famille des PKC dans le but d'identifier une forme qui participerait à l'apoptose induite par la CPT et qui serait relié également à Abl.

Dans notre modèle, nous avons éliminé les voies de signalisation associées à p73 et à la PKC- $\delta$  et en se basant sur les connaissances actuelles, deux autres candidats pourraient constituer un effecteur immédiat de Abl, soit les voies de signalisation associées à E2F1 et Rad51. En réponse aux dommages subis par le génome, ATM phosphoryle et stabilise le facteur E2F1 et bien que celui-ci puisse aussi induire l'apoptose via p53 [482], des évidences expérimentales suggèrent que E2F1 active directement la transcription de protéines proapoptotiques comme p73, APAF1, la caspase-7 et les protéines BH3-unique telles que Bim, Hrk, Puma/Bbc3 et Noxa [175, 483-491]. Il est aisé de concevoir que l'activation du facteur de transcription E2F1 par ATM pourrait impliquer un ou plusieurs intermédiaires. Étant un effecteur immédiat de ATM, la kinase Abl pourrait constituer cet intermédiaire qui, après avoir été phosphorylée par ATM, activerait par la suite le facteur E2F1 pour induire l'apoptose (Schéma 15). Malgré cette relation étroite qui unit ATM et Abl, plusieurs études ont montré que l'activation de Abl n'est pas toujours essentielle pour la fonction de ATM et que ces deux kinases peuvent opérer indépendamment l'une de l'autre [450-453]. Avant de vérifier l'implication de E2F1 comme substrat potentiel de Abl, il serait important avant tout de déterminer si ATM est activé suite à un traitement à la camptothécine et par la suite établir si Abl est activé directement par ATM. Les connaissances scientifiques actuelles sur les substrats de Abl dans un contexte

proapoptotique sont plutôt limitées et puisque nous avons exploré plusieurs d'entre elles, l'implication potentielle de E2F1 comme substrat de Abl constitue une autre piste à analyser. Il est également connu qu' Abl cible Rad51. La phosphorylation de Rad51 pourrait hypothétiquement moduler les systèmes de réparation de l'ADN endommagé d'une façon telle qui favoriserait le déclenchement de l'apoptose par un mécanisme inconnu. Finalement, il pourrait être éventuellement nécessaire et intéressant de procéder à des méthodes de criblage à grande échelle, afin d'isoler de nouveaux partenaires cellulaires associé aux voies de signalisation en aval de Abl.

Il pourrait être intéressant également de considérer le rôle de Abl sous une nouvelle perspective. Il est possible que la contribution de Abl à la cytotoxicité induite par la CPT ne résulte pas de l'activation d'un effecteur proapoptotique, mais au contraire, de la neutralisation d'un effecteur antiapoptotique. Une étude avait déjà proposé l'idée que le potentiel apoptotique de Abl impliquait une inhibition de l'activité associée au facteur de transcription NF- $\kappa$ B, auquel les auteurs imputaient une fonction antiapoptotique [610]. Il est intéressant de constater que cette hypothèse s'applique peut-être à notre modèle expérimental. En effet, la fonction antiapoptotique que nous attribuons à NF- $\kappa$ B et p38 repose sur l'observation que les cellules exprimant le répresseur de NF- $\kappa$ B ou en présence des inhibiteurs de la p38, montraient une augmentation d'environ 20% au niveau de la fragmentation de l'ADN par rapport aux cellules contrôles 2 h post-traitement (Figure 12). L'effet attribué à Abl est du même ordre (Figure 13B). Il est donc conceptuellement possible qu'en neutralisant la réponse antiapoptotique induite par NF- $\kappa$ B et p38, Abl sensibilise indirectement la cellule à l'apoptose. Afin de confirmer ou d'infirmer ce modèle, il faudrait procéder à des analyses de EMSA chez les cellules traitées avec le STI571 pour déterminer si l'inhibition de Abl augmente l'activation du facteur NF- $\kappa$ B, et à des études de phosphorylation de p38 également en présence du STI571.

On peut également imaginer d'autres hypothèses afin d'expliquer le potentiel proapoptotique de la kinase Abl. Grâce à un signal d'exportation nucléaire ainsi que trois signaux de localisation nucléaire, Abl a la capacité d'effectuer régulièrement la navette entre le noyau et le cytoplasme [454, 455]. Il est donc plausible que suite aux dommages à l'ADN induit par la CPT, Abl cible directement la mitochondrie et perturbe la régulation de

l'organelle pour faciliter l'activation de cette voie. Il y a quelques années, Ito et ses collaborateurs avaient eux aussi proposé que Abl pouvait agir sur la mitochondrie mais dans un contexte expérimental très différent. En fait, ils avaient remarqué la présence de Abl au réticulum endoplasmique dans les cellules aux repos et suite à la présence d'un stress affectant spécifiquement le réticulum endoplasmique, Abl se relocalisait à la mitochondrie, facilitant ainsi le relâchement du cytochrome c et l'induction de l'apoptose [611]. Conséquemment, si Abl possède la capacité de transmettre un signal du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie afin de provoquer le déclenchement des événements mitochondriaux conduisant à l'apoptose, il est très plausible de croire que la proportion de Abl qui est localisée au noyau et qui, de plus, a la capacité de lier directement la chromatine endommagée [458, 459], puisse dans un contexte de chimiothérapie reconnaître la lésion induit à l'ADN, quitter le noyau pour atteindre la mitochondrie et faciliter le déclenchement des événements mitochondriaux et l'induction de l'apoptose. On peut concevoir un mécanisme direct qui impliquerait, suite à sa translocation dans le cytoplasme, une interaction entre Abl et un élément de la mitochondrie comme les protéines constituant les pores mitochondriaux, par exemple. Mais Abl pourrait aussi induire la phosphorylation et l'activation d'une protéine intermédiaire présente dans le cytoplasme, qui à son tour agirait directement sur la mitochondrie. Les protéines BH3-unique, dont plusieurs membres ont été décrits pour effectuer la navette entre différents compartiments cellulaires et la mitochondrie afin d'induire le déclenchement de l'apoptose, constituent un groupe cible idéal comme intermédiaire potentiel entre Abl et la mitochondrie. Dans le but de valider la justesse de cette hypothèse, il serait important d'établir si ces protéines sont phosphorylées par Abl et le cas échéant, de déterminer si la phosphorylation de celles-ci entraîne leur translocation à la mitochondrie et le déclenchement des événements apoptotiques. Il faudrait aussi procéder à des études d'immunohistochimie afin de déterminer si le traitement à la CPT induit une relocalisation de Abl à la mitochondrie, procurant ainsi une évidence expérimentale qui serait en faveur de l'hypothèse que Abl puisse réguler directement les événements mitochondriaux. À la différence des autres modèles, ce qui est particulièrement intéressant avec cette dernière hypothèse, c'est qu'elle permettrait de résoudre une question qui est demeurée sans réponse satisfaisante depuis bon nombre d'années, à savoir comment la cellule transmet un signal de mortalité à partir du noyau contenant l'ADN endommagé vers la mitochondrie afin d'induire l'apoptose.

#### **4.4 LA SIGNALISATION CELLULAIRE IMPLIQUÉE DANS LA RÉPONSE À LA CHIMIOTHÉRAPIE : UNE VISION D'ENSEMBLE**

Des études très récentes ont ouvert de nouvelles possibilités suggérant de nouvelles pistes à suivre pour comprendre davantage les mécanismes cellulaires d'activation de l'apoptose suite aux dommages à l'ADN. Par exemple, dans un contexte de dommages à l'ADN, l'histone H1.2 a la capacité d'induire l'apoptose en quittant le noyau et en se relocalisant directement à la mitochondrie. Le mécanisme proapoptotique associé à l'histone H1.2 implique, semble-t-il, un relâchement du cytochrome c qui est dépendent de l'activité associée à la protéine Bak [543]. Une seconde hypothèse, qui permettrait de faire la lumière sur les événements moléculaires qui se produisent entre le noyau et la mitochondrie, implique un rôle pour les protéines Bcl-2 possédant un domaine BH3 unique. Après que la cellule ait subi un stress important, les protéines telles que Bid, Bad, Bim, Bmf, Hrk, Puma/Bbc3 et Noxa, qui sont associées à différents compartiments cellulaires (cytoplasme, membrane nucléaire, microtubule et filament d'actine), sont relocalisées à la mitochondrie afin de déclencher les événements mitochondriaux ainsi que l'apoptose [169, 171, 172, 176, 177, 178, 179-181]. Il a été montré que le facteur de transcription E2F1 situé dans le noyau est activé suite à des dommages à l'ADN et transactive non seulement les protéines p73, APAF et procaspase-7 mais aussi les Bcl-2 avec un domaine BH3 unique tels que Bim, Hrk, Puma/Bbc3 et Noxa afin d'induire l'apoptose [175, 483-491]. Par conséquent, contrairement à l'histone H1.2 qui agit directement sur la mitochondrie dans un contexte de dommages à l'ADN, le facteur de transcription E2F1 transmet un signal de mortalité du noyau à la mitochondrie en transactivant des cibles intermédiaires, notamment certains membres appartenant à la famille des Bcl-2 avec un domaine BH3 unique. Ces études récentes, de même que nos observations expérimentales concernant les mécanismes moléculaires de la CPT et du VP16 et les hypothèses et questions que nos travaux ont soulevées, permettront d'orienter la recherche scientifique des prochaines années, afin de mieux comprendre la nature exacte des événements moléculaires existant entre le noyau et la mitochondrie dans un contexte de dommages à l'ADN.

Tandis que la fonction apoptotique de Abl est principalement associée à la CPT dans notre modèle expérimental, cela implique nécessairement que le VP16 active une voie de

signalisation autre que Abl pour induire l'apoptose. De plus, il est essentiel de conserver à l'esprit que le potentiel apoptotique attribué à Abl est tout de même assez modeste et insuffisant pour expliquer l'importante cytotoxicité engendrée par la CPT dans les cellules HL-60 qui sont très sensibles à l'action des agents chimiothérapeutiques. Ceci suggère donc qu'il existe d'autres voies de signalisation apoptotique qui doivent réguler la mort cellulaire avec possiblement plus ou moins d'intensité. La CPT est prescrite en clinique depuis très longtemps et étonnamment, bien que ses mécanismes moléculaires ont été abondamment étudiés, on ignore toujours l'identité de toutes les voies associées à l'apoptose qui permettraient de mieux comprendre les réponses cellulaires associées à la toxicité de la CPT. Les études publiées jusqu'à ce jour mentionnent l'existence de certains mécanismes moléculaires ou de certains éléments régulant le processus apoptotique, permettant de comprendre en partie les réponses cellulaires associées à la cytotoxicité de la CPT, mais tout comme les travaux que nous avons effectués, aucune de ces études ne permet de comprendre dans sa totalité les mécanismes de mort cellulaire associés à ces drogues. Il apparaît de plus en plus évident que c'est la somme d'une panoplie de signaux, parfois contradictoires, qui permettent d'obtenir un niveau de cytotoxicité ou de résistance médicamenteuse appréciable. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction du dommage à l'ADN par la CPT sont très bien caractérisés et sont hautement conservés. En revanche, ces lésions induisent l'activation d'une multitude de voies de signalisation en aval qui complexifient la réponse cellulaire et varient grandement en fonction des paramètres contextuels tels que le type cellulaire, la concentration de la drogue et la durée du traitement. Ces voies de signalisation, comme par exemple la voie Abl dans notre modèle, peuvent contribuer pour un 10, 15 ou 25 % du phénomène apoptotique dans la cellule si elles fonctionnent individuellement. Par contre, lorsque plusieurs voies agissent de concert, les signaux s'additionnent et permettent d'atteindre, à la limite, 100% du phénomène. L'avantage d'un tel système pour la cellule est que contrairement à une voie unique et centrale, qui dans le cas où celle-ci serait inactivée pour une raison ou une autre, la cellule deviendrait automatiquement résistante à l'apoptose. Mais la diversification des voies qui contribuent au processus apoptotique diminue les chances de la cellule de développer un phénotype de résistance vis-à-vis un agent chimiothérapeutique donné. En fait, les événements moléculaires générés par un traitement avec des agents chimiothérapeutiques se produisent possiblement selon le modèle qui suit.

L'induction de lésions à l'ADN se produit selon des mécanismes spécifiques aux drogues utilisées et qui sont bien conservées. Par exemple, la CPT et le VP16 inhibent les topoisomérases I et II en adoptant des mécanismes moléculaires précis et généralement, opèrent toujours de la même manière pour induire des lésions au génome des cellules ciblées. Il est fort probable également que les protéines senseurs, situées très en amont dans la séquence des événements et qui sont impliquées dans la reconnaissance des dommages telles que ATM, ATR et DNA-PK, fonctionnent selon un mode d'action hautement spécifique et conservé. En fait, la variété de la réponse cellulaire provient de l'étape suivante, c'est-à-dire de l'activation des différents effecteurs et voies de signalisation situées en aval des protéines senseurs. C'est à partir de cette étape que nous pouvons observer l'activation de différentes kinases et facteurs de transcription, ainsi que de protéines multifonctionnelles dont p53, qui entraîneront l'activation simultanée d'une grande variété de voies de signalisation qui seront aussi bien impliquées dans les arrêts du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN endommagé, la survie cellulaire ainsi que la mort par la nécrose ou par l'apoptose. En accord avec cette vision, nous avons remarqué que suite à un traitement à la CPT, les cellules leucémiques HL-60 activaient simultanément des voies qui seraient impliquées dans la protection et la survie de la cellule (p38 et NF- $\kappa$ B) ainsi que dans la mort par apoptose (Abl) (Schéma 16). À partir de ce point, on peut imaginer que l'activation de certaines voies qui induisent l'apoptose dans un contexte cellulaire, comme par exemple la voie Abl, l'activation de l'histone H1.2 et des molécules Bcl-2 avec un domaine BH3 unique, les récepteurs de la mort cellulaires et les protéines proapoptotiques appartenant à la famille de p53, contribuera modestement au phénomène apoptotique si elles agissent individuellement, mais en coopérant entre elles et en fonctionnant simultanément, elles permettront de s'assurer que la cellule mourra par apoptose. De toute évidence, c'est l'intégration de l'ensemble de ces voies apoptotiques qui permet de l'emporter sur l'activation des voies impliquées dans la survie de la cellule, possiblement parce que l'intensité de la signalisation apoptotique l'emporte sur l'intensité du signal antiapoptotique. Également, des voies de signalisation apoptotiques pourraient se charger de neutraliser les mécanismes de survie, tel que cité précédemment au sujet de Abl et de NF- $\kappa$ B et p38, ou vice-versa. Cependant, il semble que l'ensemble de ces voies converge très souvent vers la voie mitochondriale de l'apoptose. Parfois, elles peuvent activer directement les caspases effectrices comme la procaspase-3, mais très souvent

l'activation de ces voies est associée directement ou indirectement au déclenchement des événements mitochondriaux, comme le relâchement du cytochrome c et l'activation de la procaspase-9. D'ailleurs la très grande majorité des agents chimiothérapeutiques sont connues pour induire l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose dans une grande variété de cellules cancéreuses et la mitochondrie constitue une voie centrale dans l'induction de l'apoptose. Tout comme les mécanismes moléculaires impliqués dans la reconnaissance et la réparation des lésions à l'ADN, la voie mitochondriale est très conservée dans le processus de cytotoxicité des agents chimiothérapeutiques et la grande variabilité et diversification de la réponse provient plutôt des éléments intermédiaires qui opèrent entre le site des lésions et l'activation de la mitochondrie. Donc, le traitement de cellules cancéreuses avec un agent chimiothérapeutique est susceptible d'activer une grande variété de voies apoptotiques qui convergeront vers la mitochondrie, et si l'une d'entre elles connaît une défaillance, les autres voies de signalisation compenseront, permettant l'induction de l'apoptose dans la cellule et diminuant ainsi les chances de développer un phénotype de résistance vis-à-vis le traitement. Evidemment, la réalité clinique nous montre à tous les jours que les phénomènes de résistance médicamenteuse sont très fréquents dans les tumeurs humaines. Il apparaît donc plausible, qu'en plus d'activer une panoplie de voies facilitant l'apoptose, les cellules ont également un très grand potentiel pour activer une panoplie de voies favorisant la survie cellulaire.

À l'heure actuelle, les scientifiques ont une excellente maîtrise des mécanismes d'action utilisés par les agents chimiothérapeutiques pour induire les dommages à l'ADN, ainsi qu'une excellente connaissance des événements mitochondriaux et du déclenchement de l'apoptose qui s'ensuit. L'essentiel du travail est de comprendre ce qui se passe entre ces deux principaux événements et compte tenu de la complexité et de la grande diversification des voies de signalisation et des organites impliquées, la tâche sera plutôt ardue. C'est uniquement par l'action concertée de plusieurs équipes de recherche que l'on pourra élucider toutes ces voies et développer une vision d'ensemble de la problématique. C'est avec une vision générale des événements et une excellente maîtrise des connaissances se rapportant à ces différentes voies de signalisation et des relations moléculaires qui existent entre elles que nous pourrons aspirer à obtenir une meilleure compréhension des mécanismes d'action attribués aux agents chimiothérapeutiques.

#### 4.5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons montré que la CPT et le VP16 activent les kinases Abl et p38 et que l'inhibition de ces kinases et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B modulent les cinétiques d'activation de l'apoptose dans les cellules HL-60 traitées à la CPT. Alors que leur fonction biologique est incertaine dans le cas des cellules traitées au VP16, nous avons pu définir que la p38 et le facteur NF- $\kappa$ B étaient impliqués dans une tentative de protection de la part de la cellule contre la cytotoxicité engendrée par la CPT bien que la majorité de la population cellulaire soit décimée seulement 8 h après le traitement. Il semble que ce mécanisme de protection implique d'une part l'inhibition d'une caspase effectrice, la caspase-3, mais n'affecte pas l'activité de la caspase-9 qui est associée à la voie mitochondriale de l'apoptose. L'activation de la p38 se produit indépendamment des voies de signalisation associées aux récepteurs de la mort cellulaire et indépendamment de la cascade classique d'activation des mapkinases, puisque les kinases MKK4 et MKK3/MKK6 ne sont pas impliquées. De plus, les JNK ne sont pas activées par les dommages à l'ADN générés par un traitement à la CPT ou au VP16. À ce point du travail, nous ignorons si le potentiel antiapoptotique de la p38 et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B constitue une seule voie de signalisation ou au contraire, constitue deux voies qui fonctionnent parallèlement. Nous avons aussi observé que la voie de signalisation associée à Abl participait à l'apoptose induite par la CPT, bien que nous ignorons à l'heure actuelle les mécanismes moléculaires exacts. En revanche, nous savons que Abl induit l'apoptose de façon indépendante à p53, p73 $\alpha$ , p73 $\beta$ , p63 $\alpha$ , p63 $\beta$  et PKC- $\delta$  et que l'ensemble de ces protéines ne semble pas fortement impliqué dans l'apoptose induite par la CPT dans les cellules HL-60. Nous avons aussi remarqué que la CPT et le VP16 induisent l'agrégation des récepteurs DR3 et DR4 à la membrane cellulaire sans affecter l'expression de ces récepteurs. Aucun de ces agents chimiothérapeutiques n'a induit l'oligomérisation du récepteur Fas. Nous avons aussi corrélié le phénomène d'agrégation des récepteurs avec la formation de complexes protéiques de haut poids moléculaires. La présence de l'inhibiteur SODD au complexe DR3 et les analyses fonctionnelles effectuées dans les cellules HL-60 et U937 ont permis de démontrer que les récepteurs de la mort cellulaire ne participent pas significativement à l'apoptose induite par la CPT ou le VP16. Cependant, tardivement dans

le processus de cytotoxicité, nous avons observé une diminution importante de l'expression des inhibiteurs des récepteurs de la mort cellulaire SODD et FLIP, suggérant qu'à partir de ce moment, le potentiel apoptotique des récepteurs est restauré. De plus, la présence du ligand du récepteur DR4, TRAIL, combiné au traitement avec la CPT ou le VP16, accélère la cinétique de l'apoptose, suggérant une coopération entre ces agents chimiothérapeutiques et le ligand. Donc, le rôle biologique du récepteur DR4 dans l'apoptose induite par la CPT ou le VP16 reste ambigu. Le schéma 16 illustre un modèle qui résume l'ensemble de nos observations. Suite au traitement avec les agents chimiothérapeutiques, la cellule active différentes voies de signalisation dont la fonction est diamétralement opposée. D'un côté, les voies associées à la p38 et à NF- $\kappa$ B ont le rôle de bloquer l'apoptose et conséquemment de favoriser la survie cellulaire alors que de l'autre côté, l'activation de la voie associée à Abl facilite l'induction de l'apoptose dans les cellules HL-60. Parallèlement à ces deux mécanismes fort différents, les voies de signalisation associées aux récepteurs DR3 et DR4 constituent une voie alternative dont le rôle pourrait être de sensibiliser les cellules à l'apoptose, tel que suggéré par les expériences avec le ligand et les agents anticancéreux, et/ou d'agir comme boucle d'amplification du phénomène apoptotique en se basant sur l'inhibition tardive de l'expression des inhibiteurs FLIP et SODD. En revanche, il semble que les récepteurs de la mort cellulaire ne participent pas directement au processus apoptotique, tel qu'il a été observé avec la voie de signalisation associée à Abl.

Évidemment, dépendamment du résultat de nos futures études, ce modèle subira des ajustements ainsi que des modifications. Il y a donc plusieurs études que nous devons réalisées à court et moyen termes afin de raffiner ce modèle. Concernant les voies antiapoptotiques p38 et NF- $\kappa$ B, la première question à résoudre est de déterminer si ces voies fonctionnent indépendamment l'une de l'autre ou si au contraire, elles ne constituent qu'une seule et unique voie. Il est en effet possible que la p38 soit liée à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, afin de promouvoir une réponse antiapoptotique. De plus, nous savons que le mécanisme antiapoptotique de la p38 implique une inhibition partielle de l'activité de la caspase-3, alors que les mécanismes de protection associés à NF- $\kappa$ B restent à être déterminés dans notre modèle. Une piste intéressante, selon la littérature, est la capacité de NF- $\kappa$ B à transactiver les protéines appartenant à la famille des IAPs connues pour être des inhibiteurs spécifiques des caspases, dont la caspase-3.

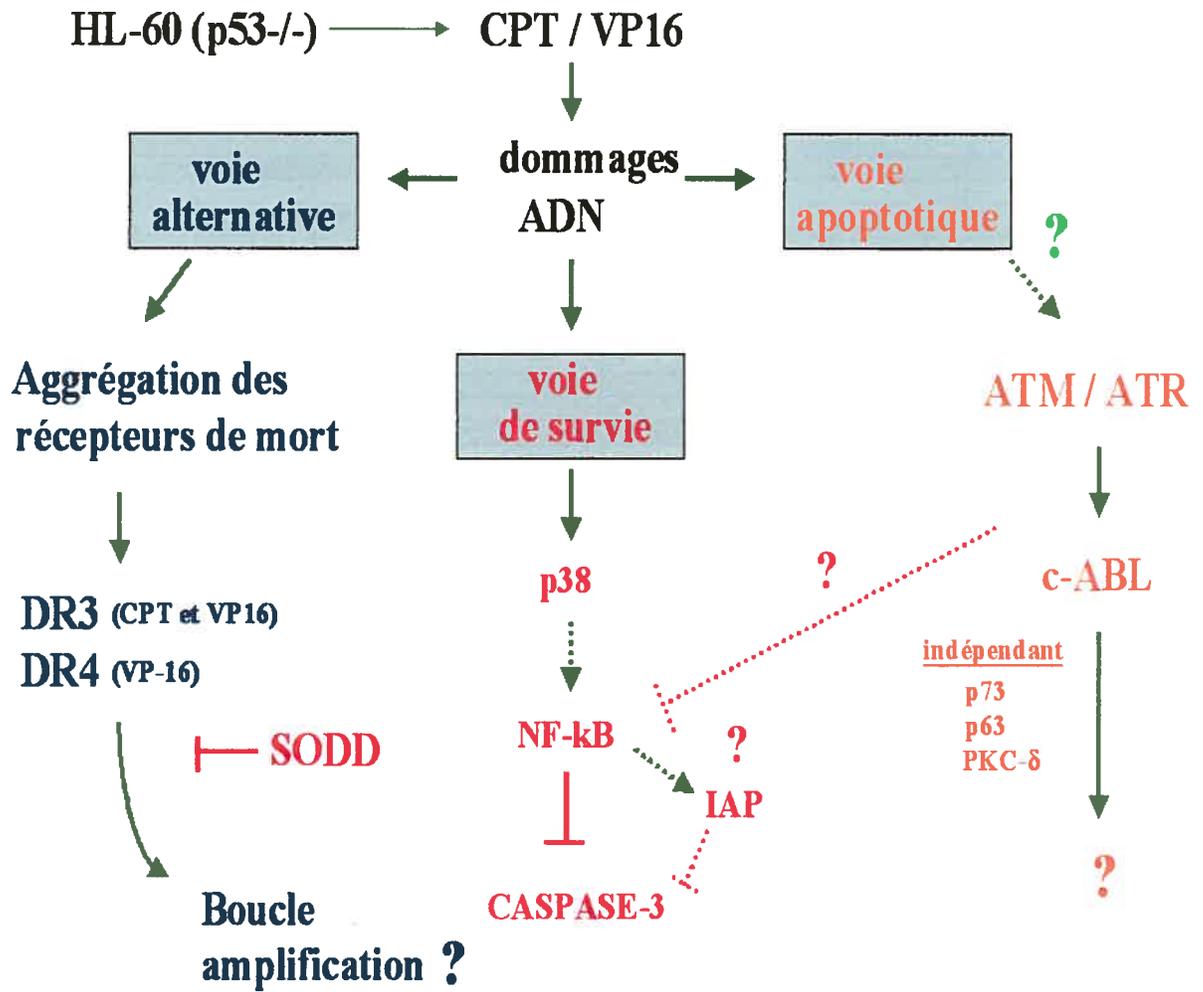


Schéma 16: modèle de travail et perspectives futures

Cette expérience permettra, dans un premier temps, de confirmer si les IAP sont impliqués dans la voie NF- $\kappa$ B et nous pourrions également discriminer lequel des trois modèles antiapoptotiques suivants correspond à notre système :

A) modèle à 1 voie :  $p38 \rightarrow NF-\kappa B \rightarrow IAPs \dashv caspase-3$

B) modèle à 2 voies: #1  $p38 \dashv caspase-3$   
 #2  $NF-\kappa B \rightarrow IAPs \dashv caspase-3$

C) modèle à 3 voies: #1  $p38 \dashv caspase-3$   
 #2  $NF-\kappa B \rightarrow IAPs \dashv caspase-3$   
 #3  $p38 \rightarrow NF-\kappa B \rightarrow IAPs \dashv caspase-3$

Le modèle à une voie implique que la p38 inhibe indirectement l'activité de la caspase-3 en activant la voie NF- $\kappa$ B et des IAP alors que dans le deuxième modèle, la p38 inhibe directement l'activité de la caspase-3 et que parallèlement et indépendamment à cette voie, NF- $\kappa$ B activerait les IAP afin d'inhiber également la caspase-3. Le modèle à trois voies impliquent la combinaison du modèle 1 et 2. Afin de clarifier ces questions, nous devons analyser si l'inhibition de la p38 affecte l'activation de NF- $\kappa$ B, démontrant alors un lien fonctionnel entre les deux protéines. Ensuite, nous devons analyser le profil d'expression des IAPs suite à un traitement avec les agents chimiothérapeutiques et déterminer si l'inhibition de NF- $\kappa$ B empêche l'expression ou l'activation des IAPs étudiés. Dans le cas où le modèle à deux voies reflèterait la réalité de notre système, il faudrait alors procéder à une analyse plus poussée pour démontrer que la p38 phosphoryle directement la procaspase-3 et que cela favorise l'inactivation ou la dégradation de la caspase. Si ce n'était pas le cas, il faudrait alors trouver un candidat intermédiaire qui agirait entre la p38 et la caspase-3. Puisque la cascade classique d'activation des mapkinases n'est pas impliquée dans l'activation de la p38, il faudra alors remonter la voie en amont afin d'isoler un effecteur qui pourrait expliquer l'activation de la kinase. Le candidat le plus probable à étudier est la protéine TAB1 qui est connue pour induire des changements d'ordre

conformationnel, conduisant à l'autophosphorylation de la p38. De plus, si le modèle à deux voies est valide, cela implique également que la p38 n'est pas responsable de l'activation de NF- $\kappa$ B, nous forçant alors à trouver un autre mécanisme potentiel pour expliquer l'activation de ce facteur de transcription. En se basant sur la littérature et nos observations qui montrent que la procaspase-8 n'est pas fortement recrutée par les récepteurs, celle-ci pourrait activer NF- $\kappa$ B en interagissant avec les kinases IKKs situées en amont du facteur de transcription. En utilisant différentes techniques comme les RNAi afin d'inhiber la procaspase-8, il sera facile de déterminer si cela interfère avec l'activation de NF- $\kappa$ B, validant ainsi ce mécanisme d'activation.

Concernant la voie proapoptotique Abl, ayant rejeté l'implication d'un certains nombres des effecteurs de Abl pouvant favoriser l'apoptose, il serait intéressant de démontrer ou d'évaluer une interaction complexe impliquant RAD51 et les systèmes de réparation de l'ADN d'où pourrait surgir de nouveaux effecteurs inconnus de l'apoptose et offrir de nouvelles stratégies à étudier. De plus, le facteur de transcription E2F1, qui constitue une cible potentielle de Abl, pourrait participer à l'apoptose en transactivant certaines molécules Bcl-2 avec un domaine BH3 unique. Afin de déterminer s'il existe un lien fonctionnel entre la kinase et le facteur de transcription, on procédera à l'inhibition de Abl afin de déterminer si l'activation de E2F1 est affectée. S'il existe un lien entre les deux molécules, on pourra alors par la suite vérifier l'implication des protéines Bim, Hrk, Noxa et Puma/Bbc3 connues pour être des substrats apoptotiques de E2F1, et déterminer si ces éléments font partie de la même voie de signalisation ou s'ils opèrent distinctement et parallèlement à Abl. Tel que discuté à la section 4.3, il serait intéressant de vérifier si Abl peut agir directement sur la mitochondrie, en effectuant tout d'abord des études d'immunohistochimie afin de voir si un traitement à la CPT induit une relocalisation de Abl à la mitochondrie. Si c'est le cas, il faudra alors tenter d'expliquer le mécanisme que Abl emploie sur la mitochondrie en étudiant si la kinase facilite le déclenchement des événements mitochondriaux tels que la chute de la perte du potentiel membranaire, le relâchement du cytochrome c ou si elle régule l'ouverture des pores mitochondriaux. Il faudra alors vérifier si Abl interagit physiquement avec les protéines Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bax, Bak, VDAC et ANT qui sont toutes connues pour réguler l'ouverture ou la fermeture des pores mitochondriaux. Il est aussi possible que Abl régule la voie mitochondriale en

agissant sur une protéine intermédiaire qui, une fois activée par la kinase, serait relocalisée à la mitochondrie. Les candidats les plus probables à ce sujet font tous parties de la grande famille des protéines Bcl-2 avec un domaine BH3 unique. Il s'agira donc de prendre candidat par candidat et de déterminer s'ils sont phosphorylés par Abl et si tel est le cas, montrer que cette phosphorylation favorise la relocalisation de ces protéines à la mitochondrie facilitant ainsi le déclenchement de l'apoptose. Une troisième hypothèse à étudier est la capacité de Abl à induire l'apoptose en neutralisant l'efficacité des protéines antiapoptotiques dont NF- $\kappa$ B et p38. C'est en inhibant l'activité de Abl avec un inhibiteur que nous pourrions analyser si l'activité de NF- $\kappa$ B s'accroît et dans un cas affirmatif, cela prouverait que Abl favoriserait l'apoptose en neutralisant l'effet antiapoptotique associé à NF- $\kappa$ B. Des expériences similaires pourraient être réalisées en s'attardant à p38. Idéalement, il faudrait également reprendre l'ensemble des études effectuées avec la p38, p63, p73 et PKC- $\delta$ , afin de tester les autres isoformes que nous n'avons pas étudiées, dans le but d'établir si nous confirmerons nos premières observations ou si au contraire, nous identifierons une isoforme qui posséderait une fonction proapoptotique dans notre système. Il serait également intéressant de remonter en amont de Abl pour comprendre les événements précoces, entre autres en déterminant si ATM/ATR est impliqué dans l'activation de Abl.

Finalement, les expériences que nous devrions pratiquer au sujet des récepteurs de la mort cellulaire, comporteraient une analyse qui aurait comme principal dessein d'inhiber l'expression des récepteurs DR3 et DR4. En utilisant des techniques de d'ARNm-antisens ou de RNAi, il serait possible de confirmer les résultats de nos précédentes analyses et également s'assurer qu'il n'existe pas une protéine adaptatrice dont on ignore l'identité à l'heure actuelle et qui pourrait permettre aux récepteurs de participer à notre insu à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques. De plus, ces expériences permettront de confirmer le modèle de coopération entre le ligand TRAIL et les agents chimiothérapeutiques. Nous supposons que c'est l'oligomérisation des récepteurs induite par la CPT ou le VP16 qui favorise l'interaction du ligand au récepteur, accélérant ainsi le processus apoptotique par rapport à des cellules qui ont seulement été traitées avec les agents anticancéreux. Par conséquent, nous devrions observer une perte de l'effet de coopération entre le ligand et les drogues chez les cellules dont les récepteurs DR3 et DR4

ont été supprimés. Dans le cas contraire, cela indiquerait que le mécanisme de coopération emploie une voie de signalisation indépendante aux récepteurs DR3 et DR4, par exemple le récepteur DR5, qui peut aussi interagir avec le ligand TRAIL. Si cette situation se présente, il serait intéressant de reprendre les études d'immunohistochimie et de chromatographie afin de déterminer si la CPT et le VP16 ont aussi la capacité d'induire l'oligomérisation et la formation de complexes protéiques de haut poids moléculaire concernant DR5. Du même coup, on pourrait aussi analyser les autres récepteurs de la mort cellulaire que nous n'avons pas étudiés au cours de ce travail. En se basant sur la diminution importante de l'expression des inhibiteurs FLIP et SODD, qui suggère que les récepteurs de la mort cellulaire pourraient être impliqués tardivement dans le processus apoptotique, il serait intéressant de reprendre l'ensemble de cette étude (immunohistochimie, chromatographie et transfection des inhibiteurs de la voie des RMC) à des temps tardifs comme 5 ou 6 heures après le traitement, afin de déterminer si les récepteurs sont effectivement impliqués que dans les phases tardives de l'apoptose. Évidemment, puisque les cellules HL-60 sont extrêmement sensibles et que très peu d'entre elles survivent à des temps aussi tardifs, il est possible que nous soyons dans l'obligation de reprendre toute l'étude dans un nouveau modèle cellulaire moins sensible, ce qui permettrait de mieux discerner la fonction biologique des RMC, sans avoir un trop fort niveau de mortalité qui pourrait masquer le potentiel des RMC lors de nos analyses. Le choix d'une lignée cellulaire qui exprimerait de très faibles niveaux de l'inhibiteur SODD représenterait un avantage certain car dans notre modèle, le récepteur DR3 a possiblement le potentiel d'induire l'apoptose dans les temps précoces du traitement avec la CPT ou le VP16, mais la présence de l'inhibiteur l'empêche de recruter les molécules adaptatrices. Donc, l'utilisation d'une lignée cellulaire qui ne comporterait pas de SODD ainsi que l'inactivation de cet inhibiteur dans les cellules HL-60 par des techniques d'ARNm antisens ou de RNAi permettrait de voir si on restaure le potentiel apoptotique de DR3. Cela permettrait de confirmer si ce récepteur est normalement impliqué dans l'apoptose induite par la CPT ou le VP16, contrairement à notre modèle cellulaire qui exprime de forts niveaux de SODD, court-circuitant ainsi le mécanisme apoptotique de DR3.

Les perspectives expérimentales à long terme comporteraient l'identification d'une nouvelle voie apoptotique dans la cellule autre que la voie Abl. Les voies de signalisation en amont, qui sont impliquées dans la reconnaissance des dommages et dans la réparation

de l'ADN et qui peuvent fonctionner indépendamment de la voie Abl, telles que ATM, ATR et DNA-PK représentent d'excellentes cibles moléculaires qui ont le potentiel de réguler les événements apoptotiques induits par les agents chimiothérapeutiques. Tel que mentionné précédemment, les voies de signalisation associées à Rad51 et impliquées dans la régulation des systèmes de réparation offrent également une piste intéressante à suivre. De plus, une hypothèse plausible à étudier est le relâchement de l'histone H1.2 du noyau vers la mitochondrie, tel que décrit dans la littérature, qui pourrait être régulée par Rad51 ou Abl. Les protéines Bcl-2 avec un domaine BH3 unique seraient également d'excellents candidats susceptibles de transporter un signal de mort du noyau suite à l'induction des lésions vers la mitochondrie. Dans une situation où les résultats expérimentaux de nos futures études indiquent que Abl ne régule pas les événements mitochondriaux, n'active pas E2F1 et est incapable de neutraliser l'effet antiapoptotique de NF- $\kappa$ B ou p38, nous devrions alors isoler un nouveau partenaire de Abl afin de mieux comprendre le mécanisme proapoptotique de la kinase. Comme nous aurions épuisé toutes les connaissances scientifiques actuelles pouvant expliquer le mode d'action proapoptotique de Abl, nous serions dans l'obligation de nous rabattre sur des méthodes de criblage à grande échelle en espérant isoler des protéines qui interagiraient avec Abl qui, dans ce cas, pourrait peut-être nous fournir de précieux indices sur le mode d'action de Abl.

La recherche expérimentale comporte plusieurs types d'approches afin de développer de nouveaux traitements contre le cancer. Certaines approches emploient une démarche plus ou moins hasardeuse en testant le plus grand nombre possible de composés, en espérant de tomber sur un nouvel agent possédant des propriétés anticancéreuses. D'autres privilégient une approche plus réfléchie, en tentant de développer une excellente compréhension de la biologie et des différents mécanismes physiologiques des cellules cancéreuses, afin d'identifier de nouvelles cibles potentielles qui seraient susceptibles d'induire leur mort ou encore, de bloquer leur prolifération. Tout comme les travaux réalisés dans notre laboratoire, certains scientifiques préfèrent utiliser une approche plus directe, en essayant de comprendre la nature exacte des mécanismes moléculaires employés par les agents chimiothérapeutiques actuels. Toutes ces approches ont un seul et unique but : amasser le maximum de données scientifiques, permettant de contribuer modestement à l'avancement des connaissances. C'est en intégrant l'ensemble de ces connaissances scientifiques qui ne cessent de s'accumuler et qui orientent la recherche à venir de même que l'amélioration des

technologies utilisées qui permettront éventuellement la création de nouvelles drogues anticancéreuses, l'élimination des problèmes de résistance des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques ou encore, l'amélioration de l'efficacité des traitements actuels ce qui, en bout de ligne, permettra l'obtention de gains significatifs dans la lutte contre le cancer.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Marchall, E. *Historical perspectives in chemotherapy*. Adv Chemother, 1964. 1(1).
2. Alexander, F. *Final report of Bari mustard casualties*. 1944, Allied Force Headquarters, Office of the Surgeon.: Washington DC. p. 512.
3. Hersh, S. *Chemical and biological warfare: America's hidden arsenal*. 1968, New York: Bobbs Merrill.
4. Dong, Q., et al. *A structural basis for a phosphoramidate mustard-induced DNA interstrand cross-link at 5'-d(GAC)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(26): p. 12170-4.
5. Chu, E., Grem, J.L., Johnston, P.G. and Allegra, C.J. *New concepts for the development and use of antifolates*. Stem Cells, 1996. 14(1): p. 41-6.
6. Chu, E., Drake, J.C., Boarman, D., Baram, J. and Allegra, C.J. *Mechanism of thymidylate synthase inhibition by methotrexate in human neoplastic cell lines and normal human myeloid progenitor cells*. J Biol Chem, 1990. 265(15): p. 8470-8.
7. Gelfand, V.I. and Bershadsky, A.D. *Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function*. Annu Rev Cell Biol, 1991. 7(1): p. 93-116.
8. Schiff, P.B. and Horwitz, S.B. *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. 77(3): p. 1561-5.
9. Manfredi, J.J., Parness, J. and Horwitz, S.B. *Taxol binds to cellular microtubules*. J Cell Biol, 1982. 94(3): p. 688-96.
10. Jaiyesimi, I.A., Buzdar, A.U., Decker, D.A. and Hortobagyi, G.N. *Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later*. J Clin Oncol, 1995. 13(2): p. 513-29.
11. Soignet, S., Fleischauer, A., Polyak, T., Heller, G. and Warrell, R.P., Jr. *All-trans retinoic acid significantly increases 5-year survival in patients with acute promyelocytic leukemia: long-term follow-up of the New York study*. Cancer Chemother Pharmacol, 1997. 40 Suppl(1): p. S25-9.
12. Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. and Okami, Y. *New antibiotics, bleomycin A and B*. J Antibiot (Tokyo), 1966. 19(5): p. 200-9.
13. Barlogie, B., Drewinko, B., Schumann, J. and Freireich, E.J. *Pulse cytophotometric analysis of cell cycle perturbation with bleomycin in vitro*. Cancer Res, 1976. 36(3): p. 1182-7.
14. Tran, P.L., et al. *Prevention of bleomycin-induced pulmonary fibrosis after adenovirus-mediated transfer of the bacterial bleomycin resistance gene*. J Clin Invest, 1997. 99(4): p. 608-17.

15. Gianni, R. *Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines*. *Cancer Surv*, 1993. **17**(2): p. 219.
16. Wall, M.E. and Wani, M.C. *Camptothecin and taxol: discovery to clinic--thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture*. *Cancer Res*, 1995. **55**(4): p. 753-60.
17. Potmesil, M. *Camptothecins: from bench research to hospital wards*. *Cancer Res*, 1994. **54**(6): p. 1431-9.
18. Ogasawara, H., et al. *Intracellular carboxyl esterase activity is a determinant of cellular sensitivity to the antineoplastic agent KW-2189 in cell lines resistant to cisplatin and CPT-11*. *Jpn J Cancer Res*, 1995. **86**(1): p. 124-9.
19. Gerrits, C.J., et al. *Five days of oral topotecan (Hycamtin), a phase I and pharmacological study in adult patients with solid tumours*. *Eur J Cancer*, 1998. **34**(7): p. 1030-5.
20. Tanizawa, A., Fujimori, A., Fujimori, Y. and Pommier, Y. *Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials*. *J Natl Cancer Inst*, 1994. **86**(11): p. 836-42.
21. Stahelin, H.F. and von Wartburg, A. *The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide: ninth Cain memorial Award lecture*. *Cancer Res*, 1991. **51**(1): p. 5-15.
22. Schacter, L.P., et al. *Clinical and pharmacokinetic overview of parenteral etoposide phosphate*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994. **34 Suppl**(1): p. S58-63.
23. Fields, S.Z., et al. *Phase I study of etoposide phosphate (etopophos) as a 30-minute infusion on days 1, 3, and 5*. *Clin Cancer Res*, 1995. **1**(1): p. 105-11.
24. Quoix, E., et al. *Etoposide phosphate with carboplatin in the treatment of elderly patients with small-cell lung cancer: a phase II study*. *Ann Oncol*, 2001. **12**(7): p. 957-62.
25. Champoux, J.J. *DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 369-413.
26. Brown, P.O. and Cozzarelli, N.R. *Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(2): p. 843-7.
27. Tse, Y. and Wang, J.C. *E. coli and M. luteus DNA topoisomerase I can catalyze catenation of decatenation of double-stranded DNA rings*. *Cell*, 1980. **22**(1 Pt 1): p. 269-76.
28. Shuman, S. *Polynucleotide ligase activity of eukaryotic topoisomerase I*. *Mol Cell*, 1998. **1**(5): p. 741-8.
29. Poljak, L. and Kas, E. *Resolving the role of topoisomerase II in chromatin structure and function*. *Trends Cell Biol*, 1995. **5**(9): p. 348-54.

30. Suda, N., *et al.* *Function of the loop residue Thr792 in human DNA topoisomerase II alpha.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(1): p. 46-51.
31. Masse, E. and Drolet, M. *Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of Escherichia coli DNA topoisomerase I.* J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16654-8.
32. Free, A. and Dorman, C.J. *Escherichia coli tyrT gene transcription is sensitive to DNA supercoiling in its native chromosomal context: effect of DNA topoisomerase IV overexpression on tyrT promoter function.* Mol Microbiol, 1994. **14**(1): p. 151-61.
33. Shykind, B.M., Kim, J., Stewart, L., Champoux, J.J. and Sharp, P.A. *Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription.* Genes Dev, 1997. **11**(3): p. 397-407.
34. Goulaouic, H., *et al.* *Purification and characterization of human DNA topoisomerase IIIalpha.* Nucleic Acids Res, 1999. **27**(12): p. 2443-50.
35. Lin, C.W., *et al.* *Differential expression of human topoisomerase IIIalpha during the cell cycle progression in HL-60 leukemia cells and human peripheral blood lymphocytes.* Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 225-36.
36. Shimamoto, A., Nishikawa, K., Kitao, S. and Furuichi, Y. *Human RecQ5beta, a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3alpha and 3beta.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(7): p. 1647-55.
37. Wilson, T.M., Chen, A.D. and Hsieh, T. *Cloning and characterization of Drosophila topoisomerase IIIbeta. Relaxation of hypernegatively supercoiled DNA.* J Biol Chem, 2000. **275**(3): p. 1533-40.
38. Li, W. and Wang, J.C. *Mammalian DNA topoisomerase IIIalpha is essential in early embryogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1010-3.
39. Khodursky, A.B., *et al.* *Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9419-24.
40. Lee, M.P., Brown, S.D., Chen, A. and Hsieh, T.S. *DNA topoisomerase I is essential in Drosophila melanogaster.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6656-60.
41. Morham, S.G., Kluckman, K.D., Voulomanos, N. and Smithies, O. *Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6804-9.
42. Berger, J.M. *Structure of DNA topoisomerases.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1400**(1-3): p. 3-18.

43. Chen, M. and Beck, W.T. *Differences in inhibition of chromosome separation and G2 arrest by DNA topoisomerase II inhibitors merbarone and VM-26*. *Cancer Res*, 1995. **55**(7): p. 1509-16.
44. Dereuddre, S., Frey, S., Delaporte, C. and Jacquemin-Sablon, A. *Cloning and characterization of full-length cDNAs coding for the DNA topoisomerase II beta from Chinese hamster lung cells sensitive and resistant 9-OH-ellipticine*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1264**(2): p. 178-82.
45. Yang, X., Li, W., Prescott, E.D., Burden, S.J. and Wang, J.C. *DNA topoisomerase IIbeta and neural development*. *Science*, 2000. **287**(5450): p. 131-4.
46. Hsiang, Y.H. and Liu, L.F. *Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin*. *Cancer Res*, 1988. **48**(11): p. 1722-6.
47. Morris, E.J. and Geller, H.M. *Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity*. *J Cell Biol*, 1996. **134**(3): p. 757-70.
48. Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S. and Liu, L.F. *Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I*. *J. Biol. Chem.*, 1985. **260**(27): p. 14873-8.
49. Svejstrup, J.Q., Christiansen, K., Gromova, II, Andersen, A.H. and Westergaard, O. *New technique for uncoupling the cleavage and religation reactions of eukaryotic topoisomerase I. The mode of action of camptothecin at a specific recognition site*. *J Mol Biol*, 1991. **222**(3): p. 669-78.
50. Hsiang, Y.H., Lihou, M.G. and Liu, L.F. *Arrest of DNA replication by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin*. *Cancer Res*, 1989. **49**(18): p. 5077-2.
51. Tsao, Y.P., Russo, A., Nyamuswa, G., Silber, R. and Liu, L.F. *Interaction between replication forks and topoisomerase I-DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV40 DNA replication system*. *Cancer Res*, 1993. **53**(24): p. 5908-14.
52. Pommier, Y., et al. *Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage*. *Mutat Res*, 2003. **532**(1-2): p. 173-203.
53. Nitiss, J. and Wang, J.C. *DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1988. **85**(20): p. 7501-5.
54. Karagiannis, T.C. and El-Osta, A. *epigenetic changes activate widespread signals in response to double-strand breaks*. *Cancer Biol Ther*, 2004. **3**(7): p. 617-3.
55. Mallya, S.M. and Sikpi, M.O. *Requirement for p53 in ionizing-radiation-inhibition of double-strand-break rejoining by human lymphoblasts*. *Mutat Res*, 1999. **434**(2): p. 119-32.

56. Ljungman, M. and Hanawalt, P.C. *The anti-cancer drug camptothecin inhibits elongation but stimulates initiation of RNA polymerase II transcription.* Carcinogenesis, 1996. **17**(1): p. 31-5.
57. Zhang, H., Wang, J.C. and Liu, L.F. *Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(4): p. 1060-4.
58. Wu, J. and Liu, L.F. *Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription.* Nucleic Acids Res, 1997. **25**(21): p. 4181-6.
59. Sanchez-Alcazar, J.A., Bradbury, D.A., Brea-Calvo, G., Navas, P. and Knox, A.J. *Camptothecin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer is independent of cyclooxygenase expression.* Apoptosis, 2003. **8**(6): p. 639-47.
60. King, M.A. and Radicchi-Mastroianni, M.A. *Effects of caspase inhibition on camptothecin-induced apoptosis of HL-60 cells.* Cytometry, 2002. **49**(1): p. 28-35.
61. Piret, B. and Piette, J. *Topoisomerase poisons activate the transcription factor NF-kappaB in ACH-2 and CEM cells.* Nucleic Acids Res, 1996. **24**(21): p. 4242-8.
62. Huang, T.T., et al. *NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events.* J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9501-9.
63. Shao, R.G., et al. *Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes.* Embo J, 1999. **18**(5): p. 1397-406.
64. Tsao, Y.P., D'Arpa, P. and Liu, L.F. *The involvement of active DNA synthesis in camptothecin-induced G2 arrest: altered regulation of p34cdc2/cyclin B.* Cancer Res, 1992. **52**(7): p. 1823-9.
65. Beidler, D.R. and Cheng, Y.C. *Camptothecin induction of a time- and concentration-dependent decrease of topoisomerase I and its implication in camptothecin activity.* Mol Pharmacol, 1995. **47**(5): p. 907-14.
66. Desai, S.D., Liu, L.F., Vazquez-Abad, D. and D'Arpa, P. *Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin.* J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24159-64.
67. Desai, S.D., et al. *Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(7): p. 2341-50.
68. Pouliot, J.J., Yao, K.C., Robertson, C.A. and Nash, H.A. *Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes.* Science, 1999. **286**(5439): p. 552-5.

69. Loike, J.D. and Horwitz, S.B. *Effects of Podophyllotoxin and VP-16-213 on microtubule assembly in vitro and nucleoside transport in HeLa cells.* Biochemistry, 1976. **15**: p. 5435-43.
70. Hande, K.R. *Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor.* Eur J Cancer, 1998. **34**(10): p. 1514-21.
71. Yoon, H.J., et al. *DNA topoisomerase II cleavage of telomeres in vitro and in vivo.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1395**(1): p. 110-20.
72. Lee, C.C. and Huang, T.S. *A novel topoisomerase II poison GL331 preferentially induces DNA cleavage at (C/G)T sites and can cause telomere DNA damage.* Pharm Res, 2001. **18**(6): p. 846-51.
73. Klapper, W., Qian, W., Schulte, C. and Parwaresch, R. *DNA damage transiently increases TRF2 mRNA expression and telomerase activity.* Leukemia, 2003. **17**(10): p. 2007-15.
74. Rubio, M.A., Davalos, A.R. and Campisi, J. *Telomere length mediates the effects of telomerase on the cellular response to genotoxic stress.* Exp Cell Res, 2004. **298**(1): p. 17-27.
75. Jeyapalan, J., et al. *The Role of Telomeres in Etoposide Induced Tumour Cell Death.* Cell Cycle, 2004. **3**(9).
76. Sleiman, R.J. and Stewart, B.W. *Early caspase activation in leukemic cells subject to etoposide-induced G2-M arrest: evidence of commitment to apoptosis rather than mitotic cell death.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(9): p. 3756-65.
77. Boesen-de Cock, J.G., de Vries, E., Williams, G.T. and Borst, J. *The anti-cancer drug etoposide can induce caspase-8 processing and apoptosis in the absence of CD95 receptor-ligand interaction.* Apoptosis, 1998. **3**(1): p. 17-25.
78. Siitonen, T., et al. *Contribution of the induction of heme oxygenase-1 to etoposide-induced apoptosis in acute myeloblastic leukemia.* Haematologica, 2003. **88**(1): p. 112-3.
79. Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K. and Wahl, G.M. *DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts.* Genes Dev, 1994. **8**(21): p. 2540-51.
80. Baus, F., Gire, V., Fisher, D., Piette, J. and Dulic, V. *Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts.* Embo J, 2003. **22**(15): p. 3992-4002.
81. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. and Housman, D.E. *p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents.* Cell, 1993. **74**(6): p. 957-67.
82. Igney, F.H. and Krammer, P.H. *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.* Nature Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.

83. Hibino, Y., Hiraoka, Y., Kamiuchi, S., Kusashio, E. and Sugano, N. *Enhancement of excision repair of cisplatin-DNA adducts by cell-free extract from a cisplatin-resistant rat cell line.* *Biochem Pharmacol*, 1999. **57**(12): p. 1415-22.
84. Runger, T.M., *et al.* *Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide.* *J Invest Dermatol*, 2000. **114**(1): p. 34-9.
85. Shiloh, Y. *ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage.* *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(1): p. 71-7.
86. Shiloh, Y. *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity.* *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(3): p. 155-68.
87. Norbury, C.J. and Hickson, I.D. *Cellular responses to DNA damage.* *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. **41**: p. 367-401.
88. New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E. and Kowalczykowski, S.C. *Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A.* *Nature*, 1998. **391**(6665): p. 407-10.
89. Benson, F.E., Baumann, P. and West, S.C. *Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair.* *Nature*, 1998. **391**(6665): p. 401-4.
90. Petukhova, G., Stratton, S. and Sung, P. *Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins.* *Nature*, 1998. **393**(6680): p. 91-4.
91. Swagemakers, S.M., Essers, J., de Wit, J., Hoeijmakers, J.H. and Kanaar, R. *The human RAD54 recombinational DNA repair protein is a double-stranded DNA-dependent ATPase.* *J Biol Chem*, 1998. **273**(43): p. 28292-7.
92. Thacker, J. *A surfeit of RAD51-like genes?* *Trends Genet*, 1999. **15**(5): p. 166-8.
93. Sung, P. *Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase.* *Genes Dev*, 1997. **11**(9): p. 1111-21.
94. Chen, J., *et al.* *Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells.* *Mol Cell*, 1998. **2**(3): p. 317-28.
95. Venkitaraman, A.R. *Breast cancer genes and DNA repair.* *Science*, 1999. **286**(5442): p. 1100-2.
96. Karran, P. *DNA double strand break repair in mammalian cells.* *Curr Opin Genet Dev*, 2000. **10**(2): p. 144-50.
97. Haber, J.E. *Partners and pathways repairing a double-strand break.* *Trends Genet*, 2000. **16**(6): p. 259-64.
98. Smith, G.C. and Jackson, S.P. *The DNA-dependent protein kinase.* *Genes Dev*, 1999. **13**(8): p. 916-34.

99. Difilippantonio, M.J., *et al.* *DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation.* Nature, 2000. **404**(6777): p. 510-4.
100. Nick McElhinny, S.A., Snowden, C.M., McCarville, J. and Ramsden, D.A. *Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(9): p. 2996-3003.
101. Hannun, Y.A. *Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy.* Blood, 1997. **89**(6): p. 1845-53.
102. Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. *Induction of apoptosis by cancer chemotherapy.* Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 42-9.
103. Palissot, V., Liautaud-Roger, F., Carpentier, Y. and Dufer, J. *Image cytometry of early nuclear events during apoptosis induced by camptothecin in HL-60 leukemic cells.* Cytometry, 1996. **25**(4): p. 341-8.
104. Yoshida, A., Takauji, R., Inuzuka, M., Ueda, T. and Nakamura, T. *Role of serine and ICE-like proteases in induction of apoptosis by etoposide in human leukemia HL-60 cells.* Leukemia, 1996. **10**(5): p. 821-4.
105. Lindsay, G.S. and Wallace, H.M. *Changes in polyamine catabolism in HL-60 human promyelogenous leukaemic cells in response to etoposide-induced apoptosis.* Biochem J, 1999. **337**(Pt1): p. 83-7.
106. Carson, D.A. and Ribeiro, J.M. *Apoptosis and disease.* Lancet, 1993. **341**(8855): p. 1251-4.
107. Thompson, C.B. *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.* Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
108. Wyllie, A.H. *Apoptosis and carcinogenesis.* Eur J Cell Biol, 1997. **73**(3): p. 189-97.
109. O'Reilly, L.A. and Strasser, A. *Apoptosis and autoimmune disease.* Inflamm Res, 1999. **48**(1): p. 5-21.
110. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
111. Savill, J. *Apoptosis. Phagocytic Docking Without Shocking.* Nature, 1998. **392**(6675): p. 442-3.
112. Assuncao Guimaraes, C. and Linden, R. *Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative death styles.* Eur J Biochem, 2004. **271**(9): p. 1638-50.
113. Formigli, L., *et al.* *Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis.* J Cell Physiol, 2000. **182**(1): p. 41-9.

114. Leist, M. and Jaattela, M. *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(8): p. 589-98.
115. Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. *Caspases: enemies within*. Science, 1998. 281(5381): p. 1312-6.
116. Carmody, R.J. and Cotter, T.G. *Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro*. Cell Death Differ, 2000. 7(3): p. 282-91.
117. Mateo, V., et al. *CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia*. Nat Med, 1999. 5(11): p. 1277-84.
118. Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J. and Kroemer, G. *Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death*. Cell Death Differ, 1999. 6(6): p. 516-24.
119. Kluck, R.M., et al. *Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a Xenopus cell-free apoptosis system*. Embo J, 1997. 16(15): p. 4639-49.
120. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. Science, 1997. 275(5303): p. 1132-6.
121. Zamzami, N., et al. *Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo*. J Exp Med, 1995. 181(5): p. 1661-72.
122. Marchetti, P., et al. *Mitochondrial Permeability Transition Triggers Lymphocyte Apoptosis*. Journal of Immunology, 1996. 157(11): p. 4830-6.
123. Yang, J., et al. *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked*. Science, 1997. 275(5303): p. 1129-32.
124. Kim, C.N., et al. *Overexpression of Bcl-X(L), inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis*. Cancer Res, 1997. 57(15): p. 3115-20.
125. Scorrano, L., et al. *BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis*. Science, 2003. 300(5616): p. 135-9.
126. Nakagawa, T., et al. *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature, 2000. 403(6765): p. 98-103.
127. Germain, M., Mathai, J.P. and Shore, G.C. *BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria*. J Biol Chem, 2002. 277(20): p. 18053-60.
128. Bakhshi, A., et al. *Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18*. Cell, 1985. 41(3): p. 899-906.

129. Cleary, M.L. and Sklar, J. *Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(21): p. 7439-43.
130. Almawi, W.Y., Melemedjian, O.K. and Jaoude, M.M. *On the link between Bcl-2 family proteins and glucocorticoid-induced apoptosis*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(1): p. 7-14.
131. Borner, C., et al. *Dissection of functional domains in Bcl-2 alpha by site-directed mutagenesis*. Biochem Cell Biol, 1994. **72**(11-12): p. 463-9.
132. Farrow, S.N. and Brown, R. *New members of the Bcl-2 family and their protein partners*. Curr Op Gen Devel, 1996. **6**(1): p. 45-9.
133. Borner, C., et al. *The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis*. J Cell Biol, 1994. **126**(4): p. 1059-68.
134. Yin, X.M., Oltvai, Z.N. and Korsmeyer, S.J. *BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax*. Nature, 1994. **369**(6478): p. 321-3.
135. Cheng, E.H.Y., et al. *Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases*. Science, 1997. **278**(5345): p. 1966-68.
136. Huang, D.C.S., Adams, J.M. and Cory, S. *The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with Ced-4*. EMBO J, 1998. **17**(4): p. 1029-39.
137. Antonsson, B. and Martinou, J.C. *The Bcl-2 protein family*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 50-7.
138. Chittenden, T., et al. *A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5589-96.
139. Hunter, J.J. and Parslow, T.G. *A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(15): p. 8521-4.
140. Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L. and Korsmeyer, S.J. *BID: a novel BH3 domain-only death agonist*. Genes Dev, 1996. **10**(22): p. 2859-69.
141. Zha, J.P., et al. *BH3 domain of Bad is required for heterodimerization with Bcl-X-L and pro-apoptotic activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24101-4.
142. Letai, A., et al. *Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2002. **2**(3): p. 183-92.

143. Chittenden, T. *BH3 domains: intracellular death-ligands critical for initiating apoptosis*. *Cancer Cell*, 2002. **2**(3): p. 165-6.
144. Fischer, U., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates*. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(1): p. 76-100.
145. Nicholson, D.W. *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death*. *Cell Death Differ*, 1999. **6**(11): p. 1028-42.
146. Denault, J.B. and Salvesen, G.S. *Caspases: keys in the ignition of cell death*. *Chem Rev*, 2002. **102**(12): p. 4489-500.
147. Thornberry, N.A., 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**(29): p. 17907-11.
148. Fesik, S.W. and Shi, Y. *Controlling the caspases*. *Science*, 2001. **294**(5546): p. 1477-8.
149. Salvesen, G.S. and Abrams, J.M. *Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2774-84.
150. Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. *Caspase activation: the induced-proximity model*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999. **96**(20): p. 10964-7.
151. Hengartner, M.O. *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
152. Yang, Y.L. and Li, X.M. *The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities*. *Cell Res*, 2000. **10**(3): p. 169-77.
153. Crook, N.E., Clem, R.J. and Miller, L.K. *An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif*. *J Virol*, 1993. **67**(4): p. 2168-74.
154. Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M. and Ashwell, J.D. *Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli*. *Science*, 2000. **288**(5467): p. 874-7.
155. Miller, L.K. *An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs*. *Trends Cell Biol*, 1999. **9**(8): p. 323-8.
156. Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G. and Altieri, D.C. *Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(18): p. 11177-82.
157. Li, F., et al. *Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin*. *Nature*, 1998. **396**(6711): p. 580-4.

158. Chu, Z.L., *et al.* *Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis C-Iap2 is under Nf-Kappa-B control.* Proc Natl Acad Sci (USA), 1997. **94**(19): p. 10057-62.
159. Joazeiro, C.A., *et al.* *The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase.* Science, 1999. **286**(5438): p. 309-12.
160. Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. and Weissman, A.M. *Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53.* J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8945-51.
161. Kluck, R.M., Bossywetzel, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. *The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.* Science, 1997. **275**(5303): p. 1132-6.
162. Mancini, M., *et al.* *The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling.* J Cell Biol, 1998. **140**(6): p. 1485-95.
163. Susin, S.A., *et al.* *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.* Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
164. Susin, S.A., *et al.* *Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process.* J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 381-3.
165. Li, L.Y., Luo, X. and Wang, X. *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria.* Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-9.
166. Kroemer, G. and Reed, J.C. *Mitochondrial control of cell death.* Nature Med, 2000. **6**(5): p. 513-9.
167. Suzuki, M., Youle, R.J. and Tjandra, N. *Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization.* Cell, 2000. **103**(4): p. 645-54.
168. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X.D. *Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.* Cell, 1998. **94**(4): p. 481-90.
169. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. and Martinou, J.C. *Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(3): p. 929-5.
170. Roucou, X., Rostovtseva, T., Montessuit, S., Martinou, J.C. and Antonsson, B. *Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes.* Biochem J, 2002. **363**(Pt 3): p. 547-52.
171. Virdee, K., Parone, P.A. and Tolkovsky, A.M. *Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155, a novel site, contributes to cell survival.* Curr Biol, 2000. **10**(18): p. 1151-4.

172. Datta, S.R., *et al.* *Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.* Cell, 1997. **91**(2): p. 231-1.
173. Klumpp, S., Selke, D. and Krieglstein, J. *Protein phosphatase type 2C dephosphorylates BAD.* Neurochem Int, 2003. **42**(7): p. 555-60.
174. Melino, G., *et al.* *p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation.* J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 8076-83.
175. Hershko, T. and Ginsberg, D. *Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis.* J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8627-34.
176. Oda, E., *et al.* *Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis.* Science, 2000. **288**(5468): p. 1053-8.
177. Han, J., *et al.* *Expression of Bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals.* Proc Natl Acad Sci USA, 2001. **98**(20): p. 11318-23.
178. Nakano, K. and Vousden, K.H. *Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53.* Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 683-94.
179. Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Zhang, L. *PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells.* Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**(4): p. 1931-6.
180. Puthalakath, H., *et al.* *Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis.* Science, 2001. **293**(5536): p. 1829-32.
181. Puthalakath, H., Huang, D.C.S., O'Reilly, L.A., King, S.M. and Strasser, A. *The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex.* Mol Cell, 1999. **3**(3): p. 287-96.
182. Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J. and Lemoine, N.R. *Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3577-89.
183. Rosse, T., *et al.* *Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome C.* Nature, 1998. **391**(6666): p. 496-9.
184. Bossywetzel, E., Newmeyer, D.D. and Green, D.R. *Mitochondrial cytochrome C release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization.* Embo J, 1998. **17**(1): p. 37-49.
185. Kroemer, G. and Reed, J.C. *Mitochondrial control of cell death.* Nat Med, 2000. **6**(5): p. 513-9.
186. Muchmore, S.W., *et al.* *X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death.* Nature, 1996. **381**(6580): p. 335-41.

187. Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J. and Wagner, G. *Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling*. *Cell*, 1999. **96**(5): p. 615-24.
188. Eskes, R., *et al.* *Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions*. *J Cell Biol*, 1998. **143**(1): p. 217-24.
189. Jurgensmeier, J.M., *et al.* *Bax directly induces release of cytochrome C from isolated mitochondria*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. **95**(9): p. 4997-5002.
190. Saito, M., Korsmeyer, S.J. and Schlesinger, P.H. *Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(8): p. 553-5.
191. Lewis, S., Bethell, S.S., Patel, S., Martinou, J.C. and Antonsson, B. *Purification and biochemical properties of soluble recombinant human Bax*. *Protein Expr Purif*, 1998. **13**(1): p. 120-6.
192. Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. and Martinou, J.C. *Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria*. *Biochem J*, 2000. **345**(Pt 2): p. 271-8.
193. Orrenius, S. *Mitochondrial regulation of apoptotic cell death*. *Toxicol Lett*, 2004. **149**(1-3): p. 19-23.
194. Crompton, M. *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. *Biochem J*, 1999. **341**(Pt 2): p. 233-49.
195. Gogvadze, V., Robertson, J.D., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. *Cytochrome c release occurs via Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent mechanisms that are regulated by Bax*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(22): p. 19066-71.
196. Shimizu, S., *et al.* *Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. **95**(4): p. 1455-9.
197. Marzo, I., *et al.* *Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis*. *Science*, 1998. **281**(5385): p. 2027-31.
198. Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. *Nature*, 1999. **399**(6735): p. 483-7.
199. Martinou, J.C. and Green, D.R. *Breaking the mitochondrial barrier*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(1): p. 63-7.
200. Mancini, M., *et al.* *Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line*. *J Cell Biol*, 1997. **138**(2): p. 449-69.
201. Martinou, I., *et al.* *The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event*. *J Cell Biol*, 1999. **144**(5): p. 883-9.

202. Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. *Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002. **99**(3): p. 1259-63.
203. Li, P., et al. *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
204. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X.S., Lutschg, A. and Wang, X.D. *Apaf-1, a human protein homologous to C. Elegans Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
205. Hu, Y., Ding, L., Spencer, D.M. and Nunez, G. *WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33489-94.
206. Hu, Y., Benedict, M.A., Ding, L. and Nunez, G. *Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis*. Embo J, 1999. **18**(13): p. 3586-95.
207. Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. *Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization*. Mol Cell, 1998. **1**(7): p. 949-57.
208. Acehan, D., et al. *Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 423-32.
209. Slee, E.A., et al. *Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner*. J Cell Biol, 1999. **144**(2): p. 281-92.
210. Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
211. Stennicke, H.R., et al. *Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8*. J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27084-90.
212. Lassus, P., Opitz-Araya, X. and Lazebnik, Y. *Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization*. Science, 2002. **297**(5585): p. 1352-4.
213. Tinel, A. and Tschopp, J. *The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress*. Science, 2004. **304**(5672): p. 843-6.
214. Wieder, T., et al. *Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1378-87.

215. Cowling, V. and Downward, J. *Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain.* Cell Death Differ, 2002. 9(10): p. 1046-56.
216. Blanc, C., et al. *Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells.* Cancer Res, 2000. 60(16): p. 4386-90.
217. McDonnell, M.A., Wang, D., Khan, S.M., Vander Heiden, M.G. and Kelekar, A. *Caspase-9 is activated in a cytochrome c-independent manner early during TNFalpha-induced apoptosis in murine cells.* Cell Death Differ, 2003. 10(9): p. 1005-15.
218. Cheng, E.H.-Y.A., et al. *Bcl-2, bcl-x(l) sequester BH3 domain-only molecules preventing bax- and bak-mediated mitochondrial apoptosis.* Mol Cell, 2001. 8(3): p. 705-11.
219. Hu, Y.M., Benedict, M.A., Wu, D.Y., Inohara, N. and Nunez, G. *Bcl-X-L interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998. 95(8): p. 4386-91.
220. Carswell, E.A., et al. *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. 72(9): p. 3666-70.
221. Debatin, K.M. and Krammer, P.H. *Death receptors in chemotherapy and cancer.* Oncogene, 2004. 23(16): p. 2950-66.
222. Ozoren, N. and El-Deiry, W.S. *Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells.* Semin Cancer Biol, 2003. 13(2): p. 135-47.
223. Marsters, S.A., et al. *Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3.* Curr Biol, 1998. 8(9): p. 525-8.
224. Lynch, C.N., et al. *TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells.* J Biol Chem, 1999. 274(13): p. 8455-9.
225. Kaptein, A., et al. *Studies on the interaction between TWEAK and the death receptor WSL-1/TRAMP (DR3).* FEBS Lett, 2000. 485(2-3): p. 135-41.
226. Wiley, S.R., et al. *A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis.* Immunity, 2001. 15(5): p. 837-46.
227. Schneider, P., et al. *TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1.* Eur J Immunol, 1999. 29(6): p. 1785-92.
228. Nakayama, M., et al. *Multiple pathways of TWEAK-induced cell death.* J Immunol, 2002. 168(2): p. 734-43.
229. Migone, T.S., et al. *TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator.* Immunity, 2002. 16(3): p. 479-92.

230. Marsters, S.A., *et al.* *A novel receptor for Apo2l/Trail contains a truncated death domain.* *Curr Biol*, 1997. **7**(12): p. 1003-6.
231. Pan, G.H., *et al.* *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for Trail.* *Science*, 1997. **277**(5327): p. 815-8.
232. Jenkins, M., Keir, M. and McCune, J.M. *A membrane-bound Fas decoy receptor expressed by human thymocytes.* *J Biol Chem*, 2000. **275**(11): p. 7988-93.
233. Pitti, R.M., *et al.* *Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer.* *Nature*, 1998. **396**(6712): p. 699-703.
234. Yasuda, H., *et al.* *Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro.* *Endocrinology*, 1998. **139**(3): p. 1329-37.
235. Mongkolsapaya, J., *et al.* *Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation.* *Nat Struct Biol*, 1999. **6**(11): p. 1048-53.
236. Cha, S.S., *et al.* *Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity.* *J Biol Chem*, 2000. **275**(40): p. 31171-7.
237. Pan, G.H., *et al.* *Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor.* *FEBS Let*, 1998. **431**(3): p. 351-6.
238. Chinnaiyan, A.M., *et al.* *Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95.* *Science*, 1996. **274**(5289): p. 990-2.
239. Wang, E.C., *et al.* *DR3 regulates negative selection during thymocyte development.* *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(10): p. 3451-61.
240. Siegel, R.M., Chan, F.K., Chun, H.J. and Lenardo, M.J. *The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity.* *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 469-74.
241. Krammer, P.H. *CD95's deadly mission in the immune system.* *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 789-95.
242. Yue, T.L., *et al.* *Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol.* *Circ Res*, 1998. **82**(2): p. 166-74.
243. Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. *Non-apoptotic Fas signaling.* *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**(1): p. 53-66.
244. Sayani, F.A., *et al.* *The expression and role of Fas ligand in intestinal inflammation.* *Neurogastroenterol Motil*, 2004. **16**(1): p. 61-74.

245. Yang, J., *et al.* *Kupffer cell-derived Fas ligand plays a role in liver injury and hepatocyte death.* J Gastrointest Surg, 2004. **8**(2): p. 166-74.
246. Choi, C. and Benveniste, E.N. *Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses.* Brain Res, 2004. **44**(1): p. 65-81.
247. Tucker, A.S., Headon, D.J., Courtney, J.M., Overbeek, P. and Sharpe, P.T. *The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development.* Dev Biol, 2004. **268**(1): p. 185-94.
248. Zauli, G., *et al.* *TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL+M-CSF.* Blood, 2004. **104**(7): p. 2044-50.
249. Testa, U. *Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis.* Leukemia, 2004. **18**(7): p. 1176-99.
250. Schmidt, U., *et al.* *Btk Is Required for an Efficient Response to Erythropoietin and for SCF-controlled Protection against TRAIL in Erythroid Progenitors.* J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 785-95.
251. Ashkenazi, A., *et al.* *Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand.* J Clin Invest, 1999. **104**(2): p. 155-62.
252. Jo, M., *et al.* *Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.* Nat Med, 2000. **6**(5): p. 564-7.
253. Lawrence, D., *et al.* *Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions.* Nat Med, 2001. **7**(4): p. 383-5.
254. Nitsch, R., *et al.* *Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL).* Lancet, 2000. **356**(9232): p. 827-8.
255. Sheridan, J.P., *et al.* *Control of Trail-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.* Science, 1997. **277**(5327): p. 818-21.
256. van Noesel, M.M., *et al.* *Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation.* Cancer Res, 2002. **62**(7): p. 2157-61.
257. Leverkus, M., *et al.* *Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes.* Cancer Res, 2000. **60**(3): p. 553-9.
258. MacFarlane, M., *et al.* *Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia.* Oncogene, 2002. **21**(44): p. 6809-18.
259. Walczak, H., *et al.* *Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo.* Nat Med, 1999. **5**(2): p. 157-63.

260. LeBlanc, H.N. and Ashkenazi, A. *Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 66-75.
261. Chuntharapai, A., et al. *Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4*. J Immunol, 2001. **166**(8): p. 4891-8.
262. Ichikawa, K., et al. *Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 954-60.
263. Keane, M.M., Ettenberg, S.A., Nau, M.M., Russell, E.K. and Lipkowitz, S. *Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines*. Cancer Res, 1999. **59**(3): p. 734-41.
264. Gliniak, B. and Le, T. *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11*. Cancer Res, 1999. **59**(24): p. 6153-8.
265. Gibson, S.B., Oyer, R., Spalding, A.C., Anderson, S.M. and Johnson, G.L. *Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 205-12.
266. Shankar, S. and Srivastava, R.K. *Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation: mechanisms and clinical implications*. Drug Resist Updat, 2004. **7**(2): p. 139-56.
267. Singh, T.R., Shankar, S., Chen, X., Asim, M. and Srivastava, R.K. *Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo*. Cancer Res, 2003. **63**(17): p. 5390-400.
268. Bouwmeester, T., et al. *A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(2): p. 97-105.
269. Eischen, C.M., et al. *Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells; chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions*. Blood, 1997. **90**(3): p. 935-43.
270. Aragane, Y., et al. *Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of Cd95 (Fas/Apo-1) independently of its ligand Cd95l*. J Cell Biol, 1998. **140**(1): p. 171-82.
271. Micheau, O., Solary, E., Hammann, A. and Dimanche-Boitrel, M.T. *Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7987-92.
272. Shao, R.G., et al. *Activation of the Fas pathway independently of Fas ligand during apoptosis induced by camptothecin in p53 mutant human colon carcinoma cells*. Oncogene, 2001. **20**(15): p. 1852-9.

273. Siegel, R.M., *et al.* *Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations.* Science, 2000. **288**(5475): p. 2354-7.
274. Chan, F.K., *et al.* *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling.* Science, 2000. **288**(5475): p. 2351-4.
275. Grassme, H., *et al.* *CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts.* J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20589-96.
276. Cottin, V., Doan, J.E. and Riches, D.W. *Restricted localization of the TNF receptor CD120a to lipid rafts: A novel role for the death domain.* J Immunol, 2002. **168**(8): p. 4095-102.
277. Lee, Y. and Shacter, E. *Fas aggregation does not correlate with Fas-mediated apoptosis.* J Immunol, 2001. **167**(1): p. 82-9.
278. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V.M. *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.* Cell, 1995. **81**(4): p. 505-12.
279. Miyazaki, T. and Reed, J.C. *A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins.* Nat Immunol, 2001. **2**(6): p. 493-500.
280. Berger, T. and Kretzler, M. *TRAIL-induced apoptosis is independent of the mitochondrial apoptosis mediator DAP3.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(4): p. 880-7.
281. Hulkko, S.M. and Zilliacus, J. *Functional interaction between the pro-apoptotic DAP3 and the glucocorticoid receptor.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **295**(3): p. 749-55.
282. Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. *An induced proximity model for caspase-8 activation.* J Biol Chem, 1998. **273**(5): p. 2926-30.
283. Kuwana, T., *et al.* *Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome C.* J Biol Chem, 1998. **273**(26): p. 16589-94.
284. Scaffidi, C., *et al.* *Two Cd95 (Apo-1/Fas) signaling pathways.* EMBO J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
285. Kischkel, F.C., *et al.* *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8.* J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46639-46.
286. Barnhart, B.C., Alappat, E.C. and Peter, M.E. *The CD95 type I/type II model.* Semin Immunol, 2003. **15**(3): p. 185-93.
287. Harper, N., Hughes, M., MacFarlane, M. and Cohen, G.M. *Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor*

- receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis.* J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25534-41.
288. Micheau, O. and Tschopp, J. *Induction of TNF receptor 1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes.* Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.
289. Vanden Berghe, T., et al. *Differential signaling to apoptotic and necrotic cell death by Fas-associated death domain protein FADD.* J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7925-33.
290. Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. and Karin, M. *Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death.* Cell, 1996. **87**(3): p. 565-76.
291. Tobiume, K., et al. *ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis.* EMBO J, 2001. **2**(3): p. 222-8.
292. Bild, A.H., et al. *MEKK1-induced apoptosis requires TRAIL death receptor activation and is inhibited by AKT/PKB through inhibition of MEKK1 cleavage.* Oncogene, 2002. **21**(43): p. 6649-56.
293. Chen, G. and Goeddel, D.V. *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway.* Science, 2002. **296**(5573): p. 1634-5.
294. Desbarats, J., et al. *Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(2): p. 118-25.
295. Ohtsuka, T., et al. *Synergistic induction of tumor cell apoptosis by death receptor antibody and chemotherapy agent through JNK/p38 and mitochondrial death pathway.* Oncogene, 2003. **22**(13): p. 2034-44.
296. Newton, K., Kurts, C., Harris, A.W. and Strasser, A. *Effects of a dominant interfering mutant of FADD on signal transduction in activated T cells.* Curr Biol, 2001. **11**(4): p. 273-6.
297. Shimada, K., et al. *c-Jun NH2-terminal kinase-dependent fas activation contributes to etoposide-induced apoptosis in p53-mutated prostate cancer cells.* Prostate, 2003. **55**(4): p. 265-80.
298. Vivo, C., Liu, W. and Broaddus, V.C. *c-Jun N-terminal kinase contributes to apoptotic synergy induced by TRAIL plus DNA damage in chemoresistant, p53 inactive mesothelioma cells.* J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25461-7.
299. Degliesposti, M.A., et al. *The novel receptor Trail-R4 induces Nf-Kappa-B and protects against Trail-mediated apoptosis, yet retains an Incomplete death domain.* Immunity, 1997. **7**(6): p. 813-20.
300. Kasibhatla, S., et al. *DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of Nf-Kb and Ap-1.* Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 543-51.

301. Villunger, A., Huang, D.C., Holler, N., Tschopp, J. and Strasser, A. *Fas ligand-induced c-Jun kinase activation in lymphoid cells requires extensive receptor aggregation but is independent of DAXX, and Fas-mediated cell death does not involve DAXX, RIP, or RAIDD.* J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1337-43.
302. Zhang, J., et al. *Regulation of Fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 Mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase.* J Exp Med, 2000. **191**(6): p. 1017-30.
303. Muhlenbeck, F., et al. *The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation.* J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 32208-13.
304. Kinoshita, H., et al. *Cisplatin (CDDP) sensitizes human osteosarcoma cell to Fas/CD95-mediated apoptosis by down-regulating FLIP-L expression.* Int J Cancer, 2000. **88**(6): p. 986-91.
305. Bin, L., Li, X., Xu, L.G. and Shu, H.B. *The short splice form of Casper/c-FLIP is a major cellular inhibitor of TRAIL-induced apoptosis.* FEBS Lett, 2002. **510**(1-2): p. 37-40.
306. Tschopp, J., Irmeler, M. and Thome, M. *Inhibition of Fas death signals by FLIPs.* Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 552-8.
307. Roth, W. and Reed, J.C. *FLIP protein and TRAIL-induced apoptosis.* Vitam Horm, 2004. **67**: p. 189-206.
308. Jiang, Y., Woronicz, L., Liu, W. and Goeddel, D. *Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains.* Science, 1999. **283**(5401): p. 543-46.
309. Miki, K. and Eddy, E.M. *Tumor necrosis factor receptor 1 is an ATPase regulated by silencer of death domain.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(8): p. 2536-43.
310. Endres, R., Hacker, G., Brosch, I. and Pfeffer, K. *Apparently normal tumor necrosis factor receptor 1 signaling in the absence of the silencer of death domains.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(18): p. 6609-17.
311. Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. and Reed, J.C. *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases.* Embo J, 1997. **16**(23): p. 6914-25.
312. Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. and Reed, J.C. *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.* Nature, 1997. **388**(6639): p. 300-4.
313. Holcik, M. and Korneluk, R.G. *XIAP, the guardian angel.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(7): p. 550-6.

314. Verhagen, A.M., *et al.* *Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.* Cell, 2000. **102**(1): p. 43-53.
315. Tikoo, A., *et al.* *Tissue distribution of Diablo/Smac revealed by monoclonal antibodies.* Cell Death Differ, 2002. **9**(7): p. 710-6.
316. Ozawa, F., Friess, H., Zimmermann, A., Kleeff, J. and Buchler, M.W. *Enhanced expression of silencer of death domains (SODD/BAG-4) in pancreatic cancer.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **271**(2): p. 409-13.
317. Ryu, B.K., Lee, M.G., Chi, S.G., Kim, Y.W. and Park, J.H. *Increased expression of cFLIP(L) in colonic adenocarcinoma.* J Pathol, 2001. **194**(1): p. 15-9.
318. Bilim, V., Kasahara, T., Hara, N., Takahashi, K. and Tomita, Y. *Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer (TCC) and therapeutic activity of XIAP antisense oligonucleotides against multidrug-resistant TCC in vitro.* Int J Cancer, 2003. **103**(1): p. 29-37.
319. Friesen, C., Herr, I., Krammer, P.H. and Debatin, K.M. *Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells.* Nat Med, 1996. **2**(5): p. 574-7.
320. 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): p. 1180-9.
321. Posovszky, C., Friesen, C., Herr, I. and Debatin, K.M. *Chemotherapeutic drugs sensitize pre-B ALL cells for CD95- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis.* Leukemia, 1999. **13**(3): p. 400-9.
322. Wu, X.X., Mizutani, Y., Kakehi, Y., Yoshida, O. and Ogawa, O. *Enhancement of Fas-mediated apoptosis in renal cell carcinoma cells by adriamycin.* Cancer Res, 2000. **60**(11): p. 2912-8.
323. Muller, M., *et al.* *Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the Cd95 (Apo-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53.* J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 403-13.
324. Sheard, M.A., Vojtesek, B., Janakova, L., Kovarik, J. and Zaloudik, J. *Up-regulation of Fas (CD95) in human p53 wild-type cancer cells treated with ionizing radiation.* Int J Cancer, 1997. **73**(5): p. 757-62.
325. Kasibhatla, S., *et al.* *DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1.* Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 543-51.
326. Mo, Y.Y. and Beck, W.T. *DNA damage signals induction of Fas ligand in tumor cells.* Mol Pharmacol, 1999. **55**(2): p. 216-22.

327. Cuvillier, O., Mayhew, E., Janoff, A.S. and Spiegel, S. *Liposomal ET-18-OCH(3) induces cytochrome c-mediated apoptosis independently of CD95 (APO-1/Fas) signaling.* Blood, 1999. **94**(10): p. 3583-92.
328. Wesselborg, S., Engels, I.H., Rossmann, E., Los, M. and Schulze-Osthoff, K. *Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction.* Blood, 1999. **93**(9): p. 3053-63.
329. Newton, K. and Strasser, A. *Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy.* J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 195-200.
330. Chinnaiyan, A.M., et al. *Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1754-9.
331. Rohn, T.A., et al. *CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release.* Oncogene, 2001. **20**(31): p. 4128-37.
332. Hotta, T., et al. *Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential.* J Orthop Res, 2003. **21**(5): p. 949-57.
333. Wen, J., et al. *Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells.* Blood, 2000. **96**(12): p. 3900-6.
334. Nagane, M., et al. *Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo.* Cancer Res, 2000. **60**(4): p. 847-53.
335. Kyriakis, J.M. and Avruch, J. *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.* Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 807-69.
336. Liu, B., Fang, M., Lu, Y., Mills, G.B. and Fan, Z. *Involvement of JNK-mediated pathway in EGF-mediated protection against paclitaxel-induced apoptosis in SiHa human cervical cancer cells.* Br J Cancer, 2001. **85**(2): p. 303-11.
337. Porras, A., et al. *P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 922-33.
338. Sarkar, D., et al. *mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 10054-9.

339. Park, J.M., Greten, F.R., Li, Z.W. and Karin, M. *Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2048-51.
340. Yosimichi, G., et al. *CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK)*. Eur J Biochem, 2001. **268**(23): p. 6058-65.
341. Juretic, N., Santibanez, J.F., Hurtado, C. and Martinez, J. *ERK 1,2 and p38 pathways are involved in the proliferative stimuli mediated by urokinase in osteoblastic SaOS-2 cell line*. J Cell Biochem, 2001. **83**(1): p. 92-8.
342. Alonso, G., Ambrosino, C., Jones, M. and Nebreda, A.R. *Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40641-8.
343. Enslin, H., Brancho, D.M. and Davis, R.J. *Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms*. Embo J, 2000. **19**(6): p. 1301-11.
344. Nebreda, A.R. and Porras, A. *p38 MAP kinases: beyond the stress response*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(6): p. 257-60.
345. Lee, J.T., Jr. and McCubrey, J.A. *The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia*. Leukemia, 2002. **16**(4): p. 486-507.
346. Alessandrini, A., Namura, S., Moskowitz, M.A. and Bonventre, J.V. *MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12866-9.
347. Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D. and Palmer, E. *Signaling life and death in the thymus: timing is everything*. Science, 2003. **299**(5614): p. 1859-63.
348. Bulavin, D.V., et al. *Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase*. Nature, 2001. **411**(6833): p. 102-7.
349. Plataniias, L.C. *Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4667-79.
350. Cardone, M.H., Salvesen, G.S., Widmann, C., Johnson, G. and Frisch, S.M. *The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases*. Cell, 1997. **90**(2): p. 315-23.
351. Graves, J.D., et al. *Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1*. Embo J, 1998. **17**(8): p. 2224-34.
352. Lee, S.H., et al. *BetaPix-enhanced p38 activation by Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated pathway. Implication in the regulation of membrane ruffling*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25066-72.

353. Tibbles, L.A. and Woodgett, J.R. *The stress-activated protein kinase pathways*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(10): p. 1230-54.
354. Davis, R.J. *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 239-52.
355. Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B. and Davis, R.J. *Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway*. Science, 1995. **267**(5196): p. 389-93.
356. Schaeffer, H.J., et al. *MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1668-71.
357. Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J. and Davis, R.J. *A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1671-4.
358. Ichijo, H., et al. *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways*. Science, 1997. **275**(5296): p. 90-4.
359. Chen, Z., et al. *ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress*. Oncogene, 1999. **18**(1): p. 173-80.
360. Saitoh, M., et al. *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) I*. Embo J, 1998. **17**(9): p. 2596-606.
361. Ge, B., et al. *MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha*. Science, 2002. **295**(5558): p. 1291-4.
362. Ge, B., et al. *TAB1beta (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1-binding protein 1beta), a novel splicing variant of TAB1 that interacts with p38alpha but not TAK1*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2286-93.
363. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis*. Science, 1995. **270**(5240): p. 1326-31.
364. Juo, P., et al. *Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(1): p. 24-35.
365. Brenner, B., et al. *Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 22173-81.
366. Wada, T. and Penninger, J.M. *Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2838-49.

367. Hsu, S.C., Gavrilin, M.A., Tsai, M.H., Han, J. and Lai, M.Z. *p38 mitogen-activated protein kinase is involved in Fas ligand expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25769-76.
368. Ivanov, V.N. and Ronai, Z. *Down-regulation of tumor necrosis factor alpha expression by activating transcription factor 2 increases UVC-induced apoptosis of late-stage melanoma cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14079-89.
369. Toyoshima, F., Moriguchi, T. and Nishida, E. *Fas induces cytoplasmic apoptotic responses and activation of the MKK7-JNK/SAPK and MKK6-p38 pathways independent of CPP32-like proteases*. J Cell Biol, 1997. **139**(4): p. 1005-15.
370. Zechner, D., et al. *MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8232-9.
371. Ivanov, V.N. and Ronai, Z. *p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression*. Oncogene, 2000. **19**(26): p. 3003-12.
372. Guay, J., et al. *Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27*. J Cell Sci, 1997. **110**(Pt3): p. 357-68.
373. Alvarado-Kristensson, M., et al. *p38-MAPK Signals Survival by Phosphorylation of Caspase-8 and Caspase-3 in Human Neutrophils*. J Exp Med, 2004. **199**(4): p. 449-58.
374. Seimiya, H., Mashima, T., Toho, M. and Tsuruo, T. *c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1beta converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4631-6.
375. Boldt, S., Weidle, U.H. and Kolch, W. *The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs*. Carcinogenesis, 2002. **23**(11): p. 1831-8.
376. Kang, Y.J., Zhou, Z.X., Wang, G.W., Buridi, A. and Klein, J.B. *Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13690-8.
377. Pillaire, M.J., Nebreda, A.R. and Darbon, J.M. *Cisplatin and UV radiation induce activation of the stress-activated protein kinase p38gamma in human melanoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **278**(3): p. 724-8.
378. Donzelli, E., et al. *Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y*. J Neurooncol, 2004. **67**(1-2): p. 65-73.
379. Yamauchi, Y., et al. *Methotrexate induces interleukin-8 production by human bronchial and alveolar epithelial cells*. Clin Sci (Lond), 2004. **106**(6): p. 619-25.

380. Stadheim, T.A. and Kucera, G.L. *c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for mitoxantrone- and anisomycin-induced apoptosis in HL-60 cells.* Leuk Res, 2002. **26**(1): p. 55-65.
381. Brantley-Finley, C., et al. *The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide.* Biochem Pharmacol, 2003. **66**(3): p. 459-69.
382. Yuan, Z.Q., et al. *AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance.* J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23432-40.
383. Lee, L.F., Li, G., Templeton, D.J. and Ting, J.P. *Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK).* J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28253-60.
384. Wang, T.H., et al. *Microtubule dysfunction induced by paclitaxel initiates apoptosis through both c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent pathways in ovarian cancer cells.* J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 8208-16.
385. Wang, T.H., et al. *Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways.* J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 4928-36.
386. Bacus, S.S., et al. *Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53.* Oncogene, 2001. **20**(2): p. 147-55.
387. Osborn, M.T. and Chambers, T.C. *Role of the stress-activated/c-Jun NH2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs.* J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30950-5.
388. Anderson, C.N. and Tolkovsky, A.M. *A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside.* J Neurosci, 1999. **19**(2): p. 664-73.
389. Patel, R., Bartosch, B. and Blank, J.L. *P21(Waf1) is dynamically associated with Jnk in human T-lymphocytes during cell cycle progression.* J Cell Sci, 1998. **111**(Part 15): p. 2247-55.
390. Okano, J. and Rustgi, A.K. *Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery.* J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19555-64.
391. Panwalkar, A., Verstovsek, S. and Giles, F. *Nuclear factor-kappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies.* Cancer, 2004. **100**(8): p. 1578-89.
392. Lin, L. and Ghosh, S. *A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2248-54.

393. Orian, A., et al. *Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF-kappaB precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain.* Mol Cell Biol, 1999. 19(5): p. 3664-73.
394. Plaksin, D., Baeuerle, P.A. and Eisenbach, L. *KBF1 (p50 NF-kappa B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells.* J Exp Med, 1993. 177(6): p. 1651-62.
395. Lin, A. and Karin, M. *NF-kappaB in cancer: a marked target.* Semin Cancer Biol, 2003. 13(2): p. 107-14.
396. Houldsworth, J., et al. *REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma.* Blood, 1996. 87(1): p. 25-9.
397. Lu, D., et al. *Alterations at the rel locus in human lymphoma.* Oncogene, 1991. 6(7): p. 1235-41.
398. Liptay, S., et al. *Related subunits of NF-kappa B map to two distinct loci associated with translocations in leukemia, NFKB1 and NFKB2.* Genomics, 1992. 13(2): p. 287-92.
399. Rao, P.H., et al. *Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma.* Blood, 1998. 92(1): p. 234-40.
400. Neri, A., et al. *B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50.* Cell, 1991. 67(6): p. 1075-87.
401. Joos, S., et al. *Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene.* Blood, 1996. 87(4): p. 1571-8.
402. Beauparlant, P., et al. *Disruption of I kappa B alpha regulation by antisense RNA expression leads to malignant transformation.* Oncogene, 1994. 9(11): p. 3189-97.
403. Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T. and Baltimore, D. *Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice.* Genes Dev, 1995. 9(22): p. 2736-46.
404. Bargou, R.C., et al. *High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells.* Blood, 1996. 87(10): p. 4340-7.
405. Chang, C.C., Zhang, J., Lombardi, L., Neri, A. and Dalla-Favera, R. *Rearranged NFKB-2 genes in lymphoid neoplasms code for constitutively active nuclear transactivators.* Mol Cell Biol, 1995. 15(9): p. 5180-7.
406. Chen, C., Edelstein, L.C. and Gelinas, C. *The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L).* Mol Cell Biol, 2000. 20(8): p. 2687-95.

407. Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Mayo, M.W. and Baldwin, A.S., Jr. *NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(9): p. 5923-9.
408. Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. and Baldwin, A.S., Jr. *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation.* Science, 1998. **281**(5383): p. 1680-3.
409. Dumont, A., et al. *Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB.* Oncogene, 1999. **18**(3): p. 747-57.
410. Lin, K.I., et al. *Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kappa B.* J Cell Biol, 1995. **131**(5): p. 1149-61.
411. Kasibhatla, S., Genestier, L. and Green, D.R. *Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB.* J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 987-92.
412. Ouaz, F., Li, M. and Beg, A.A. *A critical role for the RelA subunit of nuclear factor kappaB in regulation of multiple immune-response genes and in Fas-induced cell death.* J Exp Med, 1999. **189**(6): p. 999-1004.
413. Usami, I., et al. *Role of protein tyrosine phosphorylation in etoposide-induced apoptosis and NF-kappa B activation.* Biochem Pharmacol, 1998. **55**(2): p. 185-91.
414. Ouaz, F., Li, M. and Beg, A.A. *A critical role for the RelA subunit of nuclear factor kappa B in regulation of multiple immune-response genes and in Fas-induced cell death.* J Exp Med, 1999. **189**(6): p. 999-1004.
415. Harper, N., Farrow, S.N., Kaptein, A., Cohen, G.M. and MacFarlane, M. *Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases.* J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34743-52.
416. Teixeira, E., Garcia-Sahuquillo, A., Alarcon, B. and Bragado, R. *Apoptosis-resistant T cells have a deficiency in NF-kappaB-mediated induction of Fas ligand transcription.* Eur J Immunol, 1999. **29**(3): p. 745-54.
417. Regnier, C.H., et al. *Identification and characterization of an IkappaB kinase.* Cell, 1997. **90**(2): p. 373-83.
418. Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M. *The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation.* Cell, 1997. **91**(2): p. 243-52.

419. Yamaoka, S., *et al.* *Complementation cloning of NEMO, a component of the I $\kappa$ B kinase complex essential for NF- $\kappa$ B activation.* *Cell*, 1998. **93**(7): p. 1231-40.
420. Kisselev, A.F. and Goldberg, A.L. *Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates.* *Chem Biol*, 2001. **8**(8): p. 739-58.
421. Krappmann, D., *et al.* *Molecular mechanisms of constitutive NF- $\kappa$ B/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells.* *Oncogene*, 1999. **18**(4): p. 943-53.
422. Baldwin, A.S. *Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B.* *J Clin Invest*, 2001. **107**(3): p. 241-6.
423. Spencer, W., *et al.* *Taxol selectively blocks microtubule dependent NF- $\kappa$ B activation by phorbol ester via inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and degradation.* *Oncogene*, 1999. **18**(2): p. 495-505.
424. Brandes, L.M., Lin, Z.P., Patierno, S.R. and Kennedy, K.A. *Reversal of physiological stress-induced resistance to topoisomerase II inhibitors using an inducible phosphorylation site-deficient mutant of I $\kappa$ B $\alpha$ .* *Mol Pharmacol*, 2001. **60**(3): p. 559-67.
425. Weldon, C.B., *et al.* *NF- $\kappa$ B-mediated chemoresistance in breast cancer cells.* *Surgery*, 2001. **130**(2): p. 143-50.
426. Yeh, P.Y., *et al.* *Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF $\kappa$ B activation.* *Biochem Pharmacol*, 2002. **63**(8): p. 1423-30.
427. Yeh, P.Y., Chuang, S.E., Yeh, K.H., Song, Y.C. and Cheng, A.L. *Involvement of nuclear transcription factor- $\kappa$ B in low-dose doxorubicin-induced drug resistance of cervical carcinoma cells.* *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(1): p. 25-33.
428. Maldonado, V., Melendez-Zajgla, J. and Ortega, A. *Modulation of NF- $\kappa$ B, and Bcl-2 in apoptosis induced by cisplatin in HeLa cells.* *Mutat Res*, 1997. **381**(1): p. 67-75.
429. Singh, S., Raju, U., Mendoza, J., Pantazis, P. and Aggarwal, B.B. *Acquisition of cellular resistance to 9-nitro-camptothecin correlates with suppression of transcription factor NF- $\kappa$ B activation and potentiation of cytotoxicity by tumor necrosis factor in human histiocytic lymphoma U-937 cells.* *Anticancer Drugs*, 1998. **9**(8): p. 703-14.
430. Giri, D.K., Pantazis, P. and Aggarwal, B.B. *Cellular resistance to vincristine suppresses NF- $\kappa$ B activation and apoptosis but enhances c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase activation by tumor necrosis.* *Apoptosis*, 1999. **4**(4): p. 291-301.
431. Bian, X., *et al.* *NF- $\kappa$ B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells.* *J Biol Chem*, 2001. **276**(52): p. 48921-9.

432. Fan, W., Sui, M. and Huang, Y. *Glucocorticoids selectively inhibit paclitaxel-induced apoptosis: mechanisms and its clinical impact*. *Curr Med Chem*, 2004. **11**(4): p. 403-11.
433. Santos-Silva, M.C., Sampaio de Freitas, M. and Assreuy, J. *Killing of lymphoblastic leukemia cells by nitric oxide and taxol: involvement of NF-kappaB activity*. *Cancer Lett*, 2001. **173**(1): p. 53-61.
434. Gumy-Pause, F., Wacker, P. and Sappino, A.P. *ATM gene and lymphoid malignancies*. *Leukemia*, 2004. **18**(2): p. 238-42.
435. Maillet, P., et al. *Constitutional alterations of the ATM gene in early onset sporadic breast cancer*. *J Med Genet*, 2002. **39**(10): p. 751-3.
436. Dork, T., et al. *Spectrum of ATM gene mutations in a hospital-based series of unselected breast cancer patients*. *Cancer Res*, 2001. **61**(20): p. 7608-15.
437. Haidar, M.A., et al. *ATM gene deletion in patients with adult acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer*, 2000. **88**(5): p. 1057-62.
438. Stilgenbauer, S., et al. *Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia*. *Nat Med*, 1997. **3**(10): p. 1155-9.
439. Pandita, T.K., et al. *Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle*. *Oncogene*, 2000. **19**(11): p. 1386-91.
440. Andegeko, Y., et al. *Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(41): p. 38224-30.
441. Wright, J.A., et al. *Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(13): p. 7445-50.
442. Suzuki, K., Kodama, S. and Watanabe, M. *Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(36): p. 25571-5.
443. Unsal-Kacmaz, K., Makhov, A.M., Griffith, J.D. and Sancar, A. *Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(10): p. 6673-8.
444. Smith, G.C., et al. *Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11134-9.
445. Wang, Y., et al. *BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures*. *Genes Dev*, 2000. **14**(8): p. 927-39.

446. Kim, G.D., *et al.* *Sensing of ionizing radiation-induced DNA damage by ATM through interaction with histone deacetylase.* J Biol Chem, 1999. **274**(44): p. 31127-30.
447. Zou, L., Cortez, D. and Elledge, S.J. *Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin.* Genes Dev, 2002. **16**(2): p. 198-208.
448. Tibbetts, R.S., *et al.* *Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress.* Genes Dev, 2000. **14**(23): p. 2989-3002.
449. Schmidt, D.R. and Schreiber, S.L. *Molecular association between ATR and two components of the nucleosome remodeling and deacetylating complex, HDAC2 and CHD4.* Biochemistry, 1999. **38**(44): p. 14711-7.
450. Shafman, T., *et al.* *Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage.* Nature, 1997. **387**(6632): p. 520-3.
451. Baskaran, R., *et al.* *Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation.* Nature, 1997. **387**(6632): p. 516-9.
452. Shangary, S., *et al.* *Regulation of DNA-dependent protein kinase activity by ionizing radiation-activated abl kinase is an ATM-dependent process.* J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30163-8.
453. Takao, N., Mori, R., Kato, H., Shinohara, A. and Yamamoto, K. *c-Abl tyrosine kinase is not essential for ataxia telangiectasia mutated functions in chromosomal maintenance.* J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 725-8.
454. Wen, S.T., Jackson, P.K. and Van Etten, R.A. *The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products.* Embo J, 1996. **15**(7): p. 1583-95.
455. Taagepera, S., *et al.* *Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7457-62.
456. McWhirter, J.R. and Wang, J.Y. *An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias.* Embo J, 1993. **12**(4): p. 1533-46.
457. Van Etten, R.A., *et al.* *The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity.* J Cell Biol, 1994. **124**(3): p. 325-40.
458. Kipreos, E.T. and Wang, J.Y. *Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA.* Science, 1992. **256**(5055): p. 382-5.
459. David-Cordonnier, M.H., Hamdane, M., Bailly, C. and D'Halluin, J.C. *The DNA binding domain of the human c-Abl tyrosine kinase preferentially binds to DNA*

- sequences containing an AAC motif and to distorted DNA structures. Biochemistry, 1998. 37(17): p. 6065-76.*
460. Miao, Y.J. and Wang, J.Y. *Binding of A/T-rich DNA by three high mobility group-like domains in c-Abl tyrosine kinase. J Biol Chem, 1996. 271(37): p. 22823-30.*
461. Fernandez-Luna, J.L. *Bcr-Abl and inhibition of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. Apoptosis, 2000. 5(4): p. 315-8.*
462. Neshat, M.S., Raitano, A.B., Wang, H.G., Reed, J.C. and Sawyers, C.L. *The survival function of the bcr-Abl oncogene is mediated by bad- dependent and - independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3- kinase and Raf. Mol Cell Biol, 2000. 20(4): p. 1179-86.*
463. Ghaffari, S., Jagani, Z., Kitidis, C., Lodish, H.F. and Khosravi-Far, R. *Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. 100(11): p. 6523-8.*
464. Wang, J.Y. *Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. Oncogene, 2000. 19(49): p. 5643-50.*
465. Huang, M., *et al. Inhibition of Bcr-Abl kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of Stat5 and growth of CML cells. Oncogene, 2002. 21(57): p. 8804-16.*
466. Gottlieb, T.M. and Oren, M. *p53 and apoptosis. Semin Cancer Biol, 1998. 8(5): p. 359-68.*
467. Waterman, M.J.F., Stavridi, E.S., Waterman, J.L.F. and Halazonetis, T.D. *Atm-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. Nat Genet, 1998. 19(2): p. 175-8.*
468. Barlow, C., Brown, K.D., Deng, C.X., Tagle, D.A. and Wynshawboris, A. *Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways. Nat Genet, 1997. 17(4): p. 453-6.*
469. Westphal, C.H., *et al. Atm and p53 cooperate in apoptosis and suppression of tumorigenesis, but not in resistance to acute radiation toxicity. Nat Genet, 1997. 16(4): p. 397-401.*
470. Aguda, B.D. *A quantitative analysis of the kinetics of the G(2) DNA damage checkpoint system. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(20): p. 11352-7.*
471. Shiloh, Y. *ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis. Biochem Soc Trans, 2001. 29(Pt 6): p. 661-6.*
472. Maya, R., *et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. Genes Dev, 2001. 15(9): p. 1067-77.*

473. Khosravi, R., *et al.* *Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 14973-7.
474. Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M.N., McGowan, C.H. and Russell, P. *Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1.* Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 833-45.
475. Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J. and Wang, H. *DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation.* Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5834-47.
476. Li, S., *et al.* *Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response.* Nature, 2000. **406**(6792): p. 210-5.
477. Deng, C.X. and Brodie, S.G. *Roles of BRCA1 and its interacting proteins.* Bioessays, 2000. **22**(8): p. 728-37.
478. Yazdi, P.T., *et al.* *SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint.* Genes Dev, 2002. **16**(5): p. 571-82.
479. Stiff, T., *et al.* *ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation.* Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2390-6.
480. Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A. and Chen, D.J. *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks.* J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42462-7.
481. Horejsi, Z., *et al.* *Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation.* Oncogene, 2004. **23**(17): p. 3122-7.
482. Powers, J.T., *et al.* *E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis.* Mol Cancer Res, 2004. **2**(4): p. 203-14.
483. Stiewe, T. and Putzer, B.M. *Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis.* Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 464-9.
484. Stanelle, J., Stiewe, T., Theseling, C.C., Peter, M. and Putzer, B.M. *Gene expression changes in response to E2F1 activation.* Nucleic Acids Res, 2002. **30**(8): p. 1859-67.
485. Stanelle, J., *et al.* *Mechanism of E2F1-induced apoptosis in primary vascular smooth muscle cells.* Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 512-9.
486. Pediconi, N., *et al.* *Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(6): p. 552-8.
487. Ho, A.T., Li, Q.H., Hakem, R., Mak, T.W. and Zacksenhaus, E. *Coupling of caspase-9 to Apaf1 in response to loss of pRb or cytotoxic drugs is cell-type-specific.* Embo J, 2004. **23**(2): p. 460-72.

488. Blattner, C., Sparks, A. and Lane, D. *Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3704-13.
489. Irwin, M., et al. *Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6804): p. 645-8.
490. Muller, H., et al. *E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis*. Genes Dev, 2001. **15**(3): p. 267-85.
491. Nahle, Z., et al. *Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(11): p. 859-64.
492. De Felice, B., Wilson, R.R., Nacca, M., Ciarmiello, L.F. and Pinelli, C. *Molecular characterization and expression of p63 isoforms in human keloids*. Mol Genet Genomics, 2004. **272**(1): p. 28-34.
493. Vincek, V., Knowles, J., Li, J. and Nassiri, M. *Expression of p63 mRNA isoforms in normal human tissue*. Anticancer Res, 2003. **23**(5A): p. 3945-8.
494. De Laurenzi, V.D., et al. *Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta*. Cell Death Differ, 1999. **6**(5): p. 389-90.
495. De Laurenzi, V., et al. *Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity*. J Exp Med, 1998. **188**(9): p. 1763-8.
496. Melino, G., Lu, X., Gasco, M., Crook, T. and Knight, R.A. *Functional regulation of p73 and p63: development and cancer*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(12): p. 663-70.
497. Flores, E.R., et al. *p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 560-4.
498. Kaghad, M., et al. *Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers*. Cell, 1997. **90**(4): p. 809-19.
499. Benard, J., Douc-Rasy, S. and Ahomadegbe, J.C. *TP53 family members and human cancers*. Hum Mutat, 2003. **21**(3): p. 182-91.
500. Vousden, K.H. and Lu, X. *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
501. Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W. and Chen, X. *The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes*. Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5061-5.
502. Nakano, K., Balint, E., Ashcroft, M. and Vousden, K.H. *A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73*. Oncogene, 2000. **19**(37): p. 4283-9.

503. Steegenga, W.T., Shvarts, A., Riteco, N., Bos, J.L. and Jochemsen, A.G. *Distinct regulation of p53 and p73 activity by adenovirus E1A, E1B, and E4orf6 proteins.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3885-94.
504. Moll, U.M., Erster, S. and Zaika, A. *p53, p63 and p73--solos, alliances and feuds among family members.* Biochim Biophys Acta, 2001. **1552**(2): p. 47-59.
505. Sionov, R.V., et al. *c-Abl regulates p53 levels under normal and stress conditions by preventing its nuclear export and ubiquitination.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(17): p. 5869-78.
506. Nie, Y., Li, H.H., Bula, C.M. and Liu, X. *Stimulation of p53 DNA binding by c-Abl requires the p53 C terminus and tetramerization.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(3): p. 741-8.
507. Brown, A., Browes, C., Mitchell, M. and Montano, X. *c-abl is involved in the association of p53 and trk A.* Oncogene, 2000. **19**(26): p. 3032-40.
508. Agami, R., Blandino, G., Oren, M. and Shaul, Y. *Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis.* Nature, 1999. **399**(6738): p. 809-13.
509. Yuan, Z.M., et al. *p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage.* Nature, 1999. **399**(6738): p. 814-7.
510. Hug, H. and Sarre, T.F. *Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?* Biochem J, 1993. **291** ( Pt 2): p. 329-43.
511. Jaken, S. *Protein kinase C isozymes and substrates.* Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(2): p. 168-73.
512. Le Good, J.A., et al. *Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1.* Science, 1998. **281**(5385): p. 2042-5.
513. Emoto, Y., Kisaki, H., Manome, Y., Kharbanda, S. and Kufe, D. *Activation of protein kinase Cdelta in human myeloid leukemia cells treated with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine.* Blood, 1996. **87**(5): p. 1990-6.
514. Ruvolo, P.P., Deng, X.M., Carr, B.H. and May, W.S. *A functional role for mitochondrial protein kinase C-alpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis.* J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 25436-42.
515. Gubina, E., Rinaudo, M.S., Szallasi, Z., Blumberg, P.M. and Mufson, R.A. *Overexpression of protein kinase C isoform epsilon but not delta in human interleukin-3-dependent cells suppresses apoptosis and Induces Bcl-2 expression.* Blood, 1998. **91**(3): p. 823-9.
516. Jamieson, L., Carpenter, L., Biden, T.J. and Fields, A.P. *Protein kinase C $\alpha$  activity is necessary for Bcr-Abl-mediated resistance to drug-induced apoptosis.* J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 3927-30.

517. Datta, R., Kojima, H., Yoshida, K. and Kufe, D. *Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20317-20.
518. Endo, K., et al. *Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18476-81.
519. Kaasinen, S.K., Goldsteins, G., Alhonen, L., Janne, J. and Koistinaho, J. *Induction and activation of protein kinase C delta in hippocampus and cortex after kainic acid treatment*. Exp Neurol, 2002. **176**(1): p. 203-12.
520. Kilpatrick, L.E., et al. *A role for PKC-delta and PI 3-kinase in TNF-alpha-mediated antiapoptotic signaling in the human neutrophil*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C48-57.
521. Peluso, J.J., Pappalardo, A. and Fernandez, G. *Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC delta-dependent pathway*. Endocrinology, 2001. **142**(10): p. 4203-11.
522. Ghayur, T., et al. *Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis*. J Exp Med, 1996. **184**(6): p. 2399-404.
523. Yuan, Z.M., et al. *Activation of protein kinase C delta by the c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation*. Oncogene, 1998. **16**(13): p. 1643-8.
524. Sun, C., Zong, Z., Wang, Y., Wang, Z. and Yu, B. *[Expressions of five protein kinase C isoforms in salivary adenoid cystic carcinoma]*. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2000. **18**(4): p. 237-9.
525. Yoshida, K. and Kufe, D. *Negative regulation of the SHPTP1 protein tyrosine phosphatase by protein kinase C delta in response to DNA damage*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(6): p. 1431-8.
526. Majumder, P.K., et al. *Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response*. Cell Growth Differ, 2001. **12**(9): p. 465-70.
527. Brodie, C. and Blumberg, P.M. *Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta*. Apoptosis, 2003. **8**(1): p. 19-27.
528. Sumitomo, M., et al. *Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells*. J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 827-36.
529. Bharti, A., et al. *Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6719-28.

530. Ren, J., *et al.* *p73beta is regulated by protein kinase Cdelta catalytic fragment generated in the apoptotic response to DNA damage.* J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 33758-65.
531. Yang, Y., *et al.* *Cells preconditioned with mild, transient UVA irradiation acquire resistance to oxidative stress and UVA-induced apoptosis: role of 4-hydroxynonenal in UVA-mediated signaling for apoptosis.* J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 41380-8.
532. Kruman, II, *et al.* *Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage.* Neuron, 2004. **41**(4): p. 549-61.
533. Damia, G., *et al.* *Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation.* Neoplasia, 2001. **3**(1): p. 10-6.
534. Fedier, A., *et al.* *Loss of atm sensitises p53-deficient cells to topoisomerase poisons and antimetabolites.* Ann Oncol, 2003. **14**(6): p. 938-45.
535. Panta, G.R., *et al.* *ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF-kappaB through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 1823-35.
536. Amarantemendes, G.P., *et al.* *Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis. protection is correlated with up regulation of Bcl-X(L).* Oncogene, 1998. **16**(11): p. 1383-90.
537. McGahon, A., *et al.* *BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death [published erratum appears in Blood 1994 Jun 15;83(12):3835].* Blood, 1994. **83**(5): p. 1179-87.
538. Piccaluga, P.P., *et al.* *Dose increase of imatinib mesylate may overcome acquired resistance in bcr/abl-positive acute lymphoid leukaemia.* Eur J Haematol, 2004. **72**(4): p. 302-3.
539. Zhang, P., Gao, W.Y., Turner, S. and Ducatman, B.S. *Gleevec (STI571) inhibits lung cancer cell growth A549 and potentiates the cisplatin effect in vitro.* Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 2003. **2**(1): p. 1-9.
540. Liu, Z.G., *et al.* *Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress.* Nature, 1996. **384**(6606): p. 273-6.
541. Dan, S., *et al.* *Activation of c-Abl tyrosine kinase requires caspase activation and is not involved in JNK/SAPK activation during apoptosis of human monocytic leukemia U937 cells.* Oncogene, 1999. **18**(6): p. 1277-83.
542. Nehme, A., *et al.* *Effect of c-Abl tyrosine kinase on the cellular response to paclitaxel-induced microtubule damage.* Br J Cancer, 2000. **83**(10): p. 1360-6.
543. Konishi, A., *et al.* *Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks.* Cell, 2003. **114**(6): p. 673-88.

544. Wu, G., *et al.* *DNp63a and TAp63a regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development.* *Cancer Res*, 2003. **63**: p. 2351-7.
545. Ryan, K.M., Ernst, M.K., Rice, N.R. and Vousden, K.H. *Role of NFkB in p53-mediated programmed cell death.* *Nature*, 2000. **404**: p. 892-6.
546. Wajant, H., *et al.* *Dominant-negative Fadd inhibits TNFR60-, Fas/Apo1- and Trail-R/Apo2-mediated cell death but not gene induction.* *Curr Biol*, 1997. **8**(2): p. 113-6.
547. Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D.V. *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation.* *Cell*, 1995. **81**(4): p. 495-504.
548. Chaudhary, P.M., *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**(6): p. 821-30.
549. Schmitt, E., Cimoli, G., Steyaert, A. and Bertrand, R. *Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities.* *Exp Cell Res*, 1998. **240**(1): p. 107-21.
550. Garcia-Calvo, M., *et al.* *Purification and catalytic properties of human caspase family members.* *Cell Death Differ*, 1999. **6**(4): p. 362-9.
551. Bertrand, R., Sarang, M., Jenkin, J., Kerrigan, D. and Pommier, Y. *Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression.* *Cancer Res*, 1991. **51**(23 Pt1): p. 6280-5.
552. Kaufmann, S.H. *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**(21): p. 5870-8.
553. Del Bino, G. and Darzynkiewicz, Z. *Camptothecin, teniposide, or 4'-(9-acridinylamino)-3-methanesulfon-m-anisidide, but not mitoxantrone or doxorubicin, induces degradation of nuclear DNA in the S-phase HL-60 cells.* *Cancer Res*, 1991. **51**(4): p. 1165-9.
554. Bertrand, R., Solary, E., Jenkins, J. and Pommier, Y. *Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors.* *Exp Cell Res*, 1993. **207**(2): p. 388-97.
555. Sun, X.M., *et al.* *Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis.* *J Biol Chem*, 1999. **274**(8): p. 5053-60.
556. Belka, C., *et al.* *The tyrosine kinase Lck is required for CD95-independent caspase-8 activation and apoptosis in response to ionizing radiation.* *Oncogene*, 1999. **18**(35): p. 4983-92.

557. Engels, I.H., *et al.* *Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis.* *Oncogene*, 2000. **19**(40): p. 4563-73.
558. Ferreira, C.G., Span, S.W., Peters, G.J., Kruyt, F.A. and Giaccone, G. *Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460.* *Cancer Res*, 2000. **60**(24): p. 7133-41.
559. Jones, D.T., *et al.* *Caspase 8 activation independent of Fas (CD95/APO-1) signaling may mediate killing of B-chronic lymphocytic leukemia cells by cytotoxic drugs or gamma radiation.* *Blood*, 2001. **98**(9): p. 2800-7.
560. Sakaida, T., *et al.* *Acquisition of drug resistance by constitutive suppression of NF-kappaB in ras-transformed NIH3T3 mouse fibroblasts.* *Int J Oncol*, 2003. **23**(4): p. 1071-7.
561. Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. and Wajant, H. *NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling.* *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(12): p. 3964-73.
562. Kumar, S., Mishra, N., Raina, D., Saxena, S. and Kufe, D. *Abrogation of the cell death response to oxidative stress by the c-Abl tyrosine kinase inhibitor STI571.* *Mol Pharmacol*, 2003. **63**(2): p. 276-82.
563. Zhang, P., Gao, W.Y., Turner, S. and Ducatman, B.S. *Gleevec (STI571) inhibits lung cancer cell growth A549 and potentiates the cisplatin effect in vitro.* *Mol Cancer*, 2003. **2**(1): p. 1-9.
564. Fontemaggi, G., *et al.* *The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation.* *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(24): p. 8461-70.
565. Tschan, M.P., *et al.* *Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **277**(1): p. 62-5.
566. Hug, H., *et al.* *Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells.* *J Biol Chem*, 1997. **272**(45): p. 28191-3.
567. Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I. and Debatin, K.M. *The CD95 (Apo-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells.* *Cancer Res*, 1997. **57**(17): p. 3823-9.
568. Houghton, J.A., Harwood, F.G. and Tillman, D.M. *Thymineless death in colon carcinoma cells is mediated via Fas signaling.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997. **94**(15): p. 8144-9.
569. Muller, M., *et al.* *p53 activates the CD95(Apo-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs.* *J. Exp Med*, 1998. **188**(11): p. 2033-45.

570. Eichhorst, S.T., *et al.* *A novel AP-1 element in the CD95 ligand promoter is required for induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells upon treatment with anticancer drugs.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(20): p. 7826-37.
571. Eichhorst, S.T., Muerkoster, S., Weigand, M.A. and Krammer, P.H. *The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil induces apoptosis in mouse thymocytes in vivo via activation of the CD95(APO-1/Fas) system.* Cancer Res, 2001. **61**(1): p. 243-8.
572. Nomura, Y., Inanami, O., Takahashi, K., Matsuda, A. and Kuwabara, M. *2-Chloro-2'-deoxyadenosine induces apoptosis through the Fas/Fas ligand pathway in human leukemia cell line MOLT-4.* Leukemia, 2000. **14**(2): p. 299-306.
573. Harwood, F.G., *et al.* *Regulation of FasL by NF-kappaB and AP-1 in Fas-dependent thymineless death of human colon carcinoma cells.* J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10023-9.
574. Fulda, S., Strauss, G., Meyer, E. and Debatin, K.M. *Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells.* Blood, 2000. **95**(1): p. 301-8.
575. Fulda, S., *et al.* *Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis.* Oncogene, 2001. **20**(9): p. 1063-5.
576. Sheikh, M.S., *et al.* *p53-dependent and -independent regulation of the death receptor Killer/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha.* Cancer Res, 1998. **58**(8): p. 1593-8.
577. Wu, G.S., *et al.* *Induction of the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis but not growth arrest.* Oncogene, 1999. **18**(47): p. 6411-8.
578. Wu, G.S., Kim, K. and el-Deiry, W.S. *Killer/Dr5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death.* Adv Exp Med Biol, 2000. **465**: p. 143-51.
579. Gong, B. and Almasan, A. *Apo2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand and death receptor 5 mediate the apoptotic signaling induced by ionizing radiation in leukemic cells.* Cancer Res, 2000. **60**(20): p. 5754-60.
580. Burns, T.F., Bernhard, E.J. and El-Deiry, W.S. *Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo.* Oncogene, 2001. **20**(34): p. 4601-12.
581. Guan, B., Yue, P., Clayman, G.L. and Sun, S.Y. *Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene.* J Cell Physiol, 2001. **188**(1): p. 98-105.
582. Villunger, A., *et al.* *Drug-induced apoptosis is associated with enhanced Fas (Apo-1/CD95) ligand expression but occurs independently of Fas (Apo-1/CD95)*

- signaling in human T-acute lymphatic leukemia cells.* Cancer Res, 1997. **57**(16): p. 3331-4.
583. Fuchs, E.J., McKenna, K.A. and Bedi, A. *p53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires Fas/APO-1-independent activation of CPP32beta.* Cancer Res, 1997. **57**(13): p. 2550-4.
584. Tolomeo, M., et al. *The CD95/CD95 ligand system is not the major effector in anticancer drug-mediated apoptosis.* Cell Death Differ, 1998. **5**(9): p. 735-42.
585. McGahon, A.J., Pereira, A.P.C., Daly, L. and Cotter, T.G. *Chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human leukaemic cells is independent of the Fas (Apo-1/Cd95) receptor/ligand system.* Br J Haematol, 1998. **101**(3): p. 539-47.
586. Petak, I., Tillman, D.M., Harwood, F.G., Mihalik, R. and Houghton, J.A. *Fas-dependent and -independent mechanisms of cell death following DNA damage in human colon carcinoma cells.* Cancer Res, 2000. **60**(10): p. 2643-50.
587. Ferreira, C.G., et al. *Drug-induced apoptosis in lung cancer cells is not mediated by the Fas/FasL (CD95/APO1) signaling pathway.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 203-12.
588. Condorelli, G., et al. *PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates FAS/TNFR1-induced apoptosis.* Oncogene, 1999. **18**(31): p. 4409-15.
589. Himeji, D., et al. *Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade.* Blood, 2002. **99**(11): p. 4070-8.
590. Xiao, C., Yang, B.F., Asadi, N., Beguinot, F. and Hao, C. *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death- inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25020-5.
591. Matzke, A., Massing, U. and Krug, H.F. *Killing tumour cells by alkylphosphocholines: evidence for involvement of CD95.* Eur J Cell Biol, 2001. **80**(1): p. 1-10.
592. Rosenthal, D.S., Simbulan-Rosenthal, C.M., Liu, W.F., Stoica, B.A. and Smulson, M.E. *Mechanisms of JP-8 jet fuel cell toxicity. II. Induction of necrosis in skin fibroblasts and keratinocytes and modulation of levels of Bcl-2 family members.* Toxicol Appl Pharmacol, 2001. **171**(2): p. 107-16.
593. Kissil, J.L., Cohen, O., Raveh, T. and Kimchi, A. *Structure-function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF-alpha- and Fas-induced cell death.* EMBO J, 1999. **18**(2): p. 353-62.
594. Werner, A.B., de Vries, E., Tait, S.W., Bontjer, I. and Borst, J. *TRAIL receptor and CD95 signal to mitochondria via FADD, caspase-8/10, Bid, and Bax but differentially regulate events downstream from truncated Bid.* J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40760-7.

595. de Jong, S., Timmer, T., Heijnenbrok, F.J. and de Vries, E.G. *Death receptor ligands, in particular TRAIL, to overcome drug resistance*. *Cancer Metastasis Rev*, 2001. **20**(1-2): p. 51-6.
596. French, L.E. and Tschopp, J. *Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape*. *Semin Cancer Biol*, 2002. **12**(1): p. 51-5.
597. Park, J., Kim, C. and Gupta, S. *Differential transcriptional regulation of silencer of death domains in cord blood and peripheral blood lymphocytes*. *Int J Mol Med*, 2000. **6**(3): p. 289-93.
598. Lacour, S., et al. *Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis*. *Cancer Res*, 2001. **61**(4): p. 1645-51.
599. Cripe, L.D., et al. *Role for c-jun N-terminal kinase in treatment-refractory acute myeloid leukemia (AML): signaling to multidrug-efflux and hyperproliferation*. *Leukemia*, 2002. **16**(5): p. 799-812.
600. Stehlik, C., et al. *Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis*. *J Exp Med*, 1998. **188**(1): p. 211-6.
601. Lee, R. and Collins, T. *Nuclear factor-kappaB and cell survival: IAPs call for support*. *Circ Res*, 2001. **88**(3): p. 262-4.
602. Xiao, C.W., Ash, K. and Tsang, B.K. *Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis*. *Endocrinology*, 2001. **142**(2): p. 557-63.
603. Zou, T., et al. *NF-kappaB-mediated IAP expression induces resistance of intestinal epithelial cells to apoptosis after polyamine depletion*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(5): p. C1009-18.
604. Chaudhary, P.M., et al. *Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs*. *Oncogene*, 2000. **19**(39): p. 4451-60.
605. Gong, J.G., et al. *The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage*. *Nature*, 1999. **399**(6738): p. 806-9.
606. Hamer, G., Gademan, I.S., Kal, H.B. and de Rooij, D.G. *Role for c-Abl and p73 in the radiation response of male germ cells*. *Oncogene*, 2001. **20**(32): p. 4298-304.
607. Ben-Yehoyada, M., Ben-Dor, I. and Shaul, Y. *c-Abl tyrosine kinase selectively regulates p73 nuclear matrix association*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(36): p. 34475-82.
608. Tsai, K.K. and Yuan, Z.M. *c-Abl stabilizes p73 by a phosphorylation-augmented interaction*. *Cancer Res*, 2003. **63**(12): p. 3418-24.

609. Chau, B.N., Chen, T.T., Wan, Y.Y., DeGregori, J. and Wang, J.Y. *Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis requires p73 and c-ABL activation downstream of RB degradation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4438-47.
610. Kawai, H., Nie, L. and Yuan, Z.M. *Inactivation of NF-kappaB-dependent cell survival, a novel mechanism for the proapoptotic function of c-Abl*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(17): p. 6079-88.
611. Ito, Y., Pandey, P., Mishra, N., Kumar, S., Narula, N., Kharbanda, S., Saxena, S. and Kufe, D. *Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(18): p. 6233-42.
612. Moriarty, T.J., Dupuis, S., and Autexier, C. *Rapid upregulation of telomerase activity in human leukemia HL-60 cells treated with clinical doses of the DNA-damaging drug etoposide*. Leukemia, 2002. **16**(6): p. 1112-20.
613. Shah, N.P. and C.L. Sawyers, *Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7389-95.
614. Lee, J.C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A. and Adams, J.L. *p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials*. Pharmacol Ther., 1999. **82**(3): p. 389-97.
615. Frantz, B., Klatt, T., Pang, M., Parsons, J., Rolando, A., Williams, H., Tocci, M.J., O'Keefe, S.J. and O'Neill, E.A. *The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding*. Biochemistry, 1998. **37**(39):13846-53.
616. Gschwendt, M., Muller, H.J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G. and Marks, F. *Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor*. Biochem Biophys Res Commun., 1994. **199**(1): p. 93-8.
617. O'Connor, J., Jackman, I., Bae, T.G., Myers, S., Fan, M., Mutoh, D.A., Scudiero, A., Monks, E.A., Sausville, J.N., Weinstein, S., Friend, A.J., Fornace, Jr. and Kohn, K.W. *Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents*. Cancer Res. 1997. **57**: p. 4285-4300
618. Bertrand, R., et al., *Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression*. Cancer Res, 1991. **51**(23 Pt1): p. 6280-85.
619. Kaufmann, S.H. *Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs-more questions than answers*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1400**(1-3): p. 195-211.
620. Pommier, Y., et al., *Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2934-49.

621. Kohn, K.W., R.G. Shao, and Pommier, Y. *How do drug-induced topoisomerase I-DNA lesions signal to the molecular interaction network that regulates cell cycle checkpoints, DNA replication, and DNA repair?* Cell Biochem Biophys, 2000. **33**(2): p. 175-80.
622. Wolf, D. and V. Rotter, *Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells.* PNAS **82**(3):790-4, 1985.
623. Sugimoto, K., et al., *Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines.* Blood, 1992. **79**(9): p. 2378-83.
624. Koeffler, H.P., et al., *Increased expression of p53 protein in human leukemia cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 4035-9.
625. Ehinger, M., et al., *p53-dependent and -independent differentiation of leukemic U-937 cells: relationship to cell cycle control.* Exp Hematol, 1998. **26**(11): p. 1043-52.
626. Rizzo, M.G., et al., *Wt-p53 action in human leukaemia cell lines corresponding to different stages of differentiation.* Br J Cancer, 1998. **77**(9): p. 1429-38.
627. Bertrand, R. and Pommier, Y. *Assessment of DNA damage in mammalian cells by DNA filter elution methodology, in Cell growth and apoptosis; A practical approach*, G.P. Studzinski, Editor. 1995, IRL Press: New York. p. 97-118.
628. Bertrand, R., et al. *Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors.* Exp Cell Res, 1993. **207**(2): p. 388-397.
629. Johnstone, R.W., A.A. Ruefli, and S.W. Lowe, *Apoptosis. A link between cancer genetics and chemotherapy.* Cell, 2002. **108**(2): p. 153-164.

