

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE DE PHARMACIE

Année : 2003

Thèse N°

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Biologie Cellulaire et Biologie Moléculaire

présentée et soutenue par

Cécile CORBIERE

le 19 novembre 2003

**Comparaison de l'effet anti-prolifératif de trois stéroïdes végétaux
(diosgénine, hécogénine, tigogénine) sur la lignée 1547
d'ostéosarcome humain.**

**Implication de la mitochondrie et de la cyclooxygénase-2 dans
l'apoptose induite par la diosgénine sur les lignées 1547, HEP-2
(laryngocarcinome) et M4Beu (mélanome).**

Thèse dirigée par M. le Professeur Jean-Louis BENEYTOUT

JURY :

Mme le Professeur G. DURAND

Président

M. le Professeur G. FAVRE

Rapporteur

M. le Professeur N. GUALDE

Rapporteur

M. le Professeur J.L. DUROUX

Examineur

M. le Professeur J.L. BENEYTOUT

Examineur

M. le Docteur B. LIAGRE

Examineur

UNIVERSITE DE LIMOGES**FACULTÉ DE PHARMACIE**

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard

ASSESEURS : Madame le Professeur CHULIA Dominique

Monsieur COMBY Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

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

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame ROCHE Doriane

A Monsieur le Professeur BENEYTOU

Professeur des Universités de Biochimie et Biologie Moléculaire
Faculté de Pharmacie de Limoges
UPRES EA 1085 Biomolécules et cibles cellulaires tumorales
Directeur de Thèse

Recevez, Monsieur Beneytout, mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Je tiens également à vous exprimer ma reconnaissance pour votre grande disponibilité, votre rigueur scientifique, votre enthousiasme et vos précieux conseils qui ont fait progresser ce travail. La confiance que vous m'avez accordée pendant ces trois ans m'a permis de progresser rapidement. Soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

A Madame le Professeur DURAND

Professeur de Biochimie
Faculté de Pharmacie, Paris XI
Laboratoire de Biochimie A
G.H. Bichat-Claude Bernard, Paris

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de Thèse. Soyez assurée de mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur FAVRE

Professeur de Biochimie
Faculté de Pharmacie de Toulouse
Directeur de l'Unité INSERM U563 « Département Innovation Thérapeutique et Oncologie Moléculaire »

Je suis très touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je vous remercie pour vos conseils et vos suggestions qui ont permis l'amélioration de ce manuscrit. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assuré de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur GUALDE

Professeur d'Immunologie
Université Victor Segalen Bordeaux 2
UMR CNRS 5164 CIRID

Mes remerciements les plus respectueux vont également à Monsieur le Professeur Gualde qui m'a fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être rapporteur. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Duroux

Professeur de Biophysique
Faculté de Pharmacie de Limoges
UPRES EA 1085 Biomolécules et cibles cellulaires tumorales

J'adresse toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Jean-Luc Duroux pour sa disponibilité et sa sympathie. Je suis particulièrement honorée de sa présence dans ce jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Habrioux

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Limoges
Chef du Service de Biochimie

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans le Service de Biochimie de la Faculté de Pharmacie.

A Monsieur le Maître de Conférences Bertrand LIAGRE

Maître de Conférences en Biochimie et Biologie Moléculaire, Sciences Biologiques
Faculté de Pharmacie de Limoges

Les remerciements exprimés ici ne seront jamais à la hauteur de ton implication dans ce travail de thèse. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide, tes nombreux conseils, ton soutien sans faille, ta disponibilité, ton dynamisme et ta bonne humeur. Sois assuré, Bertrand, de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A Madame le Docteur Sandra Moalic-Juge

Docteur de l'Université de Limoges

En témoignage du temps que tu m'as accordé lors de ma première année de thèse pendant laquelle tu m'as initiée au travail de recherche et en souvenir de ta fin de rédaction de Thèse qui m'a également beaucoup appris. Sois assurée, Sandra, de mon profond respect et de toute mon amitié.

A Monsieur le Maître de Conférences Serge BATTU

Maître de Conférences en Chimie Analytique et Bromatologie
Faculté de Pharmacie de Limoges

Je t'exprime ma reconnaissance pour le travail que nous avons réalisé en commun et pour la confiance que tu m'as accordée. Sois assuré de mon profond respect.

A Madame le Docteur Chantal JAYAT-VIGNOLES
Responsable scientifique du service commun de cytométrie
Faculté des Sciences

Je vous adresse ma sincère reconnaissance pour vos conseils, votre disponibilité concernant la cytométrie en flux. Vous avez contribué à la réalisation de ce travail, soyez assurée de mon plus profond respect pour votre compétence.

A Madame le Maître de Conférences Jeanny COOK-MOREAU
Maître de Conférences en Immunologie
Faculté de Médecine de Limoges

Je vous exprime ma reconnaissance pour le temps passé à corriger mes publications en anglais. En remerciement de votre disponibilité et de votre bonne humeur. Soyez assurée de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Faraj TERRO
Assistant au Laboratoire de Biologie Cellulaire
Faculté de Médecine de Limoges

Je t'exprime ma reconnaissance pour l'aide que tu m'as apportée, pour tes conseils, ainsi que pour ta disponibilité. Sois assuré de mon profond respect.

Au service de Biophysique de la Faculté de Pharmacie

J'ai toujours été accueillie chaleureusement dans votre laboratoire et j'ai toujours pu compter sur votre aide pour le travail que je réalisais. Je vous exprime ma reconnaissance pour votre implication et votre intérêt dans le travail que nous menons en commun sur les stéroïdes végétaux.

Au service de Biochimie et de Génétique Moléculaire de la Faculté de Médecine

Pour leur sympathie et leur disponibilité. Un grand merci à Karine Faucher pour ses précieux conseils concernant la technique de western blot.

A Monsieur Karim BORDJI (Ingénieur de Recherche au CNRS) **et à Monsieur Arnaud BIANCHI** (Ingénieur d'Etude au CNRS)

J'adresse ma sincère reconnaissance à Messieurs les Professeurs Netter et Gillet pour leur accueil dans le laboratoire de Pharmacologie de Nancy ainsi qu'à Monsieur le Professeur Dauça pour m'avoir accueillie dans le laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement de Nancy.

En souvenir du séjour passé à Nancy, je vous exprime, Karim et Arnaud, toute ma reconnaissance pour l'accueil chaleureux que vous m'avez fait ainsi que pour vos compétences, votre disponibilité et votre sympathie. Soyez assurés de mon amitié.

A Monsieur David LEGER

Je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide et tes conseils pertinents. Je suis certaine que tes nombreuses qualités te permettront de réaliser tes projets personnels et professionnels. Sois assuré, David, de mon profond respect et de mon amitié.

A Mademoiselle Armelle RAMETTI

En souvenir des western blots réalisés ensemble. Ton aide m'a été très précieuse. Je t'exprime toute ma reconnaissance pour le temps que tu m'as accordé et pour ton accueil. Je suis convaincue de l'accomplissement de tes projets personnels et professionnels.

A Lucie, Virginie, Pierre-Olivier, Yves, Raphaël, Fabrice, Frédérique

A tous les moments passés ensemble au travail et en dehors. A l'accueil chaleureux que vous m'avez fait lors de mon arrivée et au soutien que vous m'avez apporté tout au long de ma Thèse. Je vous exprime toute mon amitié.

Lucie, je t'exprime mon plus profond respect pour le courage dont tu as fait preuve au cours de ta Thèse t'ayant emmener loin de ta famille et de tes amis. Tes nombreuses qualités te permettront, j'en suis certaine, de réaliser tes projets personnels et professionnels.

Virgine, en souvenir des manipulations de western blots et d'immunohistochimie réalisées ensemble, et en souvenir de notre rédaction de Thèse, je t'exprime toute ma reconnaissance pour ton aide et tes précieux conseils.

Yves, Pierre, à votre soutien et vos conseils ; ainsi qu'à nos parties de squash.

A mes amis

Catherine, Hélène, Céline, Virginie, Vincent, Anthony, Christophe, Dominique et Mylène, Pascal et Dominique, Nicolas et Caroline, Marc, Amandine et l'équipe Paradoxe...

Je voudrais adresser un remerciement particulier à tous les étudiants et personnes des Facultés de Pharmacie et de Médecine qui m'ont aidé et soutenu.

A mes parents,

A Véronique,

A Séverine,

A Stéphane,

Sommaire

SOMMAIRE	8
PUBLICATIONS ÉLABORÉES AU COURS DE LA THÈSE.....	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	11
INTRODUCTION	17
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	20
I- L' Apoptose	Erreur ! Signet non défini.
II- Le cycle cellulaire.....	Erreur ! Signet non défini.
III- Les cyclooxygénases	78
IV- Les stéroïdes végétaux	Erreur ! Signet non défini.
MATÉRIELS ET MÉTHODES	109
I- Lignées cellulaires, culture et traitements	110
II-Etude de la croissance par le test au MTT	111
III-Extraction et amplification des ARNs	112
IV- Analyse de l'expression des protéines.....	115
V-Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en Flux.....	118
VI-Analyse quantitative de l'apoptose.....	118
VII-Etude du potentiel membranaire mitochondrial	120
VIII-Dosage des activités caspases-3, -8 et -9	120
IX-Dosage de l'ATP	121
X-Transformation bactérienne et transfection cellulaire.....	121
XI-Préparation des extraits nucléaires et étude de l'activation de NF-κB et PPAR par des analyses de retard sur gel.....	125
XII-Etude de l'activité COX-2 par dosage de la PGE ₂	127
XIII-Utilisation du modèle 1547/diosgénine en SdFFF.....	129
XIV-Statistiques	131
RÉSULTATS	132
I- Effets de la diosgénine, de l'héogénine et de la tigogénine sur les cellules 1547	133
II- Effets de la diosgénine sur deux autres types cellulaires : les cellules HEp-2 et M4Beu	165
DISCUSSION.....	185
CONCLUSION.....	202
BIBLIOGRAPHIE	205
TABLE DES MATIÈRES.....	242

LISTE DES TABLEAUX	246
LISTE DES FIGURES	247
ANNEXES	250

Publications élaborées au cours de la thèse

MOALIC S., LIAGRE B., **CORBIERE C.**, BIANCHI A., DAUÇA M., BORDJI K. and BENEYTOUT J.L.

A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells.

FEBS Lett. 2001;506:225-230.

MOALIC-JUGE S., LIAGRE B., DUVAL R., **CORBIERE C.**, BIANCHI A., BORDJI K., BOSGIRAUD C. and BENEYTOUT J.L.

The anti-apoptotic property of NS-398 at high dose can be mediated in part through NF-kappaB activation, hsp70 induction and a decrease in caspase-3 activity in human osteosarcoma cells.

Int. J. Oncol. 2002;20:1255-1262.

CORBIERE C., LIAGRE B., BIANCHI A., BORDJI K., DAUÇA M., NETTER P. and BENEYTOUT J.L.

Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells.

Int. J. Oncol. 2003;22:899-905.

CORBIERE C., LIAGRE B., TERRO F. and BENEYTOUT J.L.

Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells.

article soumis à Biochim. Biophys. Acta.

CORBIERE C., BATTU S., LIAGRE B., CARDOT P.J.P. and BENEYTOUT J.L.

SdFFF monitoring of cellular apoptosis induction by diosgenin and different inducers into human 1547 osteosarcoma cell line.

article soumis à Analytical Chemistry.

Liste des abréviations

A

AA : acide arachidonique
ABTS : 2,2-azino-di-[3-éthylbenzothiazoline sulfonate]
Ac : anticorps
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADP : adénosine diphosphate
AIF : « apoptosis-inducing factor »
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMC : « 7-amino-4-méthylcoumarine »
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ANT : transporteur de nucléotide adénylique
AP-1 : « activator protein », facteur de transcription
Apaf-1 : « Apoptotic protease-activating factor »
APC : « Anaphase-Promoting Complex »
ARE : « AU-rich element »
ARN : acide ribonucléique
ATF6 ou 4 : « Activating Transcription Factor »
ATM : « ataxia telangiectica mutated »
ATP : adénosine triphosphate
ATR : « ATM and Rad3-related »

B

BAR : « bifunctional apoptosis regulator »
Bcl-2 : « B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins »
BET : bromure d'éthidium
BH : « Bcl-2 homology »
BiP : « heavy-chain-binding protein »
BIR : « baculoviral IAP repeat »
BUB1 : « budding uninhibited by benomyl »
BSA : albumine sérique bovine

C

CAD : « caspase activated-DNase »
CAK : « CDK-activating kinase »
CARD : « caspase recruitment domain »

CBP : « CREB-binding protein »
 CDK : kinases dépendantes des cyclines
 C/EBP : « CCAAT/enhancer-binding protein »
 Chk : « checkpoint kinase »
 CHOP : « C/EBP homologous protein »
 CKI : « CDK inhibitor »
 COX : cyclooxygénases
 CREB : « Cyclic-AMP regulatory binding protein »
 CrmA : « cytokine response modifier A »

D

DAG : diacylglycérol
 DAP-kinase : « Death-associated protein kinase »
 DD : « Death Domain »
 DED : « death effector domain »
 DEDAF : « DED-associated factor »
 DEDD : « DED-containing DNA-binding protein »
 DFF : facteur de fragmentation de l'ADN
 DIABLO : « Direct IAP Binding protein with Low pI »
 DISC : « Death-inducing Signaling Complex »
 DMSO : diméthylsulfoxyde
 DNA-PK : « DNA-activated protein kinase »
 DNase : désoxyribonucléase
 $\Delta\Psi_m$: potentiel membranaire mitochondrial
 DR3, DR4, DR5 : « Death Receptor »
 DTT : dithiothréitol

E

EC : extrait cytosolique
 EGF : « epidermal growth factor »
 EM : extrait mitochondrial
 EN : extrait nucléaire
 endo G : endonucléase G
 EP : récepteur de prostaglandine
 ERAD : « ER-associated degradation »
 ERK : « extracellular signal-regulated protein kinase »
 ERSE : « ER stress response element »

F

FACS : « Fluorescent analysis of cells stained »

FAD: « Flavin Adenin Dinucleotide »
 FADD : « Fas-associated death domain »
 FLAP : « five-lipoxygenase-activating-protein »
 Flice : procaspase-8 (« FADD-like ICE »)
 FLIP : « Flice inhibitory protein »

G

G : Gap (ou intervalle)
 Gadd : « growth arrest and DNA damage-inducible genes »

H

HDAC : histones déacétylases
 Hec1 : « highly expressed in cancer »
 12-HHT : 12-S-hydroxy-5, 8, 10-hepta décatriènoïque
 HEL : lignée de cellules érythroleucémiques
 HEPES : N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonique]
 5, 12 ou 15-HETE : acide (5, 12 ou 15)-hydroxyeicosatétraènoïque
 HGF : « Hepatocyte Growth Factor »
 5, 12 ou 15-HPETE : acide (5, 12 ou 15)-hydroxyperoxyeicosatétraènoïque
 HSF : facteur de stress thermique
 Hsp : « Heat shock protein »
 HtrA2 : « high temperature requirement protein A2 »

I

IAP : protéines inhibitrices de l'apoptose
 ICAD : « inhibitor of CAD »
 ICE : « interleukin-1 β converting enzyme »
 I- κ B : « inhibitor of κ B »
 IKK : I- κ B kinase
 IL-1 : interleukine 1
 IFN γ : interféron gamma
 INK4 : « inhibitors of CDK4 »
 IP : iodure de propidium
 IP3 : inositol tri-phosphate
 IRE : endonucléase de type I (« high inositol-requiring »)

J

JNK : « c-Jun NH₂-terminal kinase »

K

kDa : kilo dalton
kpb : kilo paire de bases

L

LB : milieu Luria Broth
LO : lipoxigénase
LT : leucotriène

M

M : mitose
MAD2 : « mitotic arrest deficiant »
MAPK : « mitogen-activated protein kinase »
MEKK1 : « MAP Kinase Kinase Kinase1 »
Mdm2 : « murine double minute 2 »
MLS : signal de localisation mitochondrial
MMP-2 : « matrix metalloprotéinase »
MPTP : pore de transition de perméabilité membranaire
MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide

N

NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide
NAIP : « neuronal apoptosis inhibitory protein »
NEMO : « NF-κB Essential Modulator »
NF-κB : « nuclear factor-Kappa B »
NF-Y : « nuclear factor Y »
NIK : « NF-κB-inducing Kinase »
NO : oxyde nitrique
NOXA : membre de la famille Bcl-2 (« BH3-only »)

O

ONPG : O-nitrophényl-β-D-galactopyranoside
OPG : ostéoprotégérine
Omi : ou HtrA2

P

PAK-2 : « p21-activated kinase »
 PARP : poly (ADP-ribose) polymérase
 PBP : « PPAR γ -binding protein »
 PBS : tampon de phosphate de sodium
 PCOX-1 : « partial COX-1 »
 PCR : réaction de polymérisation en chaîne
 PDGF : « platelet derived growth factor »
 PERK : « PKR (double stranded RNA-dependent protein kinase)-like ER kinase »
 PG : prostaglandine
 PIG : « p53 inducible genes »
 PIKK : « phosphatidylinositol 3-kinase related kinase »
 PKA : protéine kinase A
 PLA₂ : phospholipase 2
 PLAD : « preligand assembly domain »
 PIK3: « Polo-like Kinase 3 »
 PMA : « phorbol 12-myristate 13-acetate »
 PPAR : « peroxisome proliferator-activated receptors »
 PPRE : « peroxisome proliferator response element »
 pRb : protéine du rétinoblastome
 Pu : base purique
 PUMA : « p53-upregulated modulator of apoptosis »
 PVDF : polyvinylidène difluoride
 Py : base pyrimidique

R

RAIDD : « RIPK1 Domain containing Adapter with DD »
 RbaK : protéine de la famille « KRAB-Zinc-Finger »
 RE : réticulum endoplasmique
 RIP : « receptor-interacting protein »
 RIZ : « Rb-interacting zinc-finger protein »
 RLB : « Reporter Lysis Buffer »
 RLO : radicaux libres oxygénés
 RNase : « ribonucléase »
 RT : transcription reverse
 RXR : récepteurs de l'acide rétinoïque 9-cis

S

SAM : « sterile alpha motif »
 SdFFF : « sedimentation field flow fractionation »
 SDS : sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de poly-acrylamide en présence de SDS

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

SIMP : « soluble inter membrane mitochondrial proteins »

Smac : « Second Mitochondria-derived Activator of Caspase) »

SMN : « survival motor neuron »

SVF : sérum de veau fœtal

T

TBP : « TATA box-binding protein »

TBS : tampon tris salin

TGF β : « tumor growth factor β »

TNF : facteur nécrosant des tumeurs

TNF-R1 : « TNF receptor 1 »

TRADD : « TNF-R-associated death domain »

TRAF : « TNF-R-associated factor »

TRAIL : « tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand »

TX : thromboxane

U

URF : unité relative de fluorescence

URL : unité relative de luminescence

V

VDAC : canal anionique voltage-dépendant

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

X

XAF-1 : « XIAP associated factor »

XIAP : « X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein »

Introduction

La prolifération cellulaire est un mécanisme étroitement contrôlé qui répond à des besoins particuliers de l'organisme. Chez l'adulte, la naissance de nouvelles cellules et la mort d'autres cellules se compensent selon un état stationnaire dynamique. Certaines cellules se renouvellent rapidement alors que d'autres ne survivent que quelques jours avant d'être remplacées. Les cellules du foie sont pratiquement immortelles alors que les cellules nerveuses sont progressivement détruites. Lorsque le contrôle de la prolifération cellulaire est altéré et que cette prolifération incontrôlée se transmet aux cellules filles, il apparaît alors plusieurs cellules immortelles qui finissent par former une tumeur. Les événements génétiques et physiologiques qui font perdre à la cellule la maîtrise de son cycle et qui amorcent la prolifération anarchique de la cellule sont donc très étudiés. La principale cause de cette prolifération incontrôlée est la transformation de proto-oncogènes en oncogènes.

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées de l'organisme. Elle est donc nécessaire au développement et au maintien du bon fonctionnement de tout organisme vivant puisqu'elle joue un rôle important dans l'embryogénèse, dans les changements morphologiques, dans l'homéostasie cellulaire, dans l'atrophie, dans le système immunitaire, dans la réparation des tissus mais aussi dans la régression des tumeurs. Malheureusement, le dérèglement de la mort cellulaire par apoptose (défaut d'induction ou excès) est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies (cancers, maladies neurodégénératives, SIDA). La prolifération aberrante des cellules lors de la carcinogénèse peut également être le résultat d'un dérèglement dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, les cellules peuvent se dupliquer en générant des aberrations génétiques causées par une déficience du système de contrôle du cycle cellulaire.

L'utilisation de cellules en culture a permis de mieux comprendre le fonctionnement des cellules cancéreuses. En effet, il est possible *in vitro* d'étudier l'effet d'agents cancérigènes, les conditions de prolifération des cellules cancéreuses ou encore d'induire une inhibition de la prolifération des cellules. En effet, la recherche et l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques capables d'arrêter la prolifération de cellules cancéreuses sont parmi les principaux buts de la recherche fondamentale en cancérologie. Ces molécules qu'elles soient naturelles ou synthétiques sont généralement sélectionnées pour leurs effets anti-prolifératifs sur des lignées cancéreuses en culture. L'action de telles substances sur des cellules cancéreuses peut résulter d'un blocage du cycle cellulaire ou encore de l'induction de l'apoptose.

La diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine sont des stéroïdes de structure voisine extraits de différents végétaux. Ces molécules sont de plus en plus étudiées dans le domaine biologique en

raison de leur diversité structurale, de leurs activités biologiques et de leur faible toxicité. L'objectif de notre étude est de montrer les effets anti-prolifératifs de ces stéroïdes végétaux sur différentes lignées cancéreuses (ostéosarcome, laryngocarcinome et mélanome).

Après une étude bibliographique sur l'apoptose, sur les différentes voies d'induction de l'apoptose ainsi que sur le cycle cellulaire et son contrôle, nous aborderons le rôle de la cyclooxygénase-2 dans l'organisme et surtout dans les cancers. De plus, nous décrirons brièvement les stéroïdes végétaux que nous avons étudiés.

Nous avons réalisé une première étude qui compare les effets de stéroïdes végétaux de structure proche (diosgénine, hécogénine, tigogénine) sur la prolifération des cellules 1547 d'ostéosarcome humain. Une deuxième étude est consacrée aux effets de la diosgénine sur la prolifération de deux autres types de cellules cancéreuses : laryngocarcinome humain (HEp-2) et mélanome humain (M4Beu).

Après avoir décrit les matériels et méthodes, nous exposerons les résultats obtenus sur la prolifération, l'activité de la cyclooxygénase-2, l'apoptose et le cycle cellulaire des cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine.

Après avoir montré que la diosgénine avait un effet anti-prolifératif plus important que celui de l'hécogénine et de la tigogénine, nous exposerons les résultats obtenus sur les cellules HEp-2 et les cellules M4Beu traitées par la diosgénine.

Partie Bibliographique

I- L'Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles disparaissent de l'organisme.

Les processus de mort cellulaire peuvent être programmés ou non. Une mort cellulaire non programmée est le résultat d'une exposition de la cellule à un produit toxique ou d'une lésion primaire de la membrane externe de la cellule. La mort cellulaire survenant pendant le développement embryonnaire est dite «programmée» à la fois quant à sa survenue dans l'organisme, et quant à son déroulement dans la cellule.

La mort cellulaire programmée est nécessaire au développement et au maintien du bon fonctionnement de tout organisme vivant. Depuis le milieu du XIX^e siècle, il est connu que la disparition d'une cellule résulte d'une capacité à s'autodétruire et non de l'incapacité à résister aux agressions externes mais ce n'est que depuis moins de trente ans que la mort cellulaire est considérée par les biologistes comme une fonction à part entière. Le mot «apoptose» a été introduit en 1972 par Kerr et *al.* et désigne une séquence d'altérations morphologiques comprenant une condensation du cytoplasme et du noyau, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique et une perte de l'asymétrie membranaire, notamment l'externalisation de la phosphatidylsérine membranaire. Ensuite, les recherches sur la mort cellulaire se sont accélérées grâce au travail de Horvitz et *al.* (1983) sur le développement du nématode *Caenorhabditis elegans*, qui a permis d'identifier l'existence d'un programme moléculaire permettant aux cellules de déclencher leur mort. Les travaux sur l'apoptose se sont étendus à l'homme et ont mis en évidence l'existence de deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie intrinsèque (ou mitochondriale) et la voie extrinsèque (ou des récepteurs de mort).

1. Approches génétiques de la mort cellulaire programmée

Au cours du développement de *C. elegans*, 131 cellules sur 1090 meurent au cours d'un processus faisant intervenir quatre protéines clés, chacune correspondant maintenant à une famille de gènes chez les mammifères. Horvitz et *al.* (1983) ont mis en évidence dans cet organisme des mutations pouvant prévenir la mort cellulaire. Deux des principaux gènes mutés ont été nommés *ced-3* et *ced-4* (Horvitz et *al.*, 1983). Différentes techniques ont permis de déterminer que *ced-3* codait pour une cystéine protéase, dont un homologue chez la souris est la cystéine protéase *ICE* pour «interleukin-1 β converting enzyme» (Miura et *al.*, 1993), ce qui a conduit à la description de

plusieurs membres de la même famille appelés caspases. L'activation des caspases est sous le contrôle de la protéine codée par le gène *ced-4* chez *C. elegans* et de son homologue Apaf-1 chez les mammifères (Zou et *al.*, 1997). Un autre gène découvert par Horvitz et *al.* (1983) est *ced-9* qui code pour une protéine contrôlant la survenue de la mort. Cette protéine appartient à la famille Bcl-2 et interagit avec la protéine *Ced-4*, protéine pro-apoptotique, empêchant l'activation de *Ced-3*, protéine exécutive. La mort cellulaire est déclenchée quand la protéine *EGL-1*, protéine pro-apoptotique, se lie à la protéine *Ced-9* et l'inactive, libérant ainsi *Ced-4* qui peut alors s'oligomériser avec *Ced-3* et provoquer son auto-activation.

Au début des années 1990, une approche systématique de la mort cellulaire a été entreprise chez la drosophile. White et *al.* (1994) ont démontré que ce processus intervenait lors du développement de la drosophile et que les cellules mortes présentaient les caractères morphologiques d'une apoptose faisant intervenir les caspases. Plusieurs gènes impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire ont été découverts, *reaper*, *hid* et *grim* (Goyal et *al.*, 2000). Les trois protéines correspondantes ont une homologie de séquence en N-terminal. Ce domaine permet leur association à des protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAP, qui inhibent l'activation des caspases. Aucun homologue structural de *reaper*, *Hid* et *grim* ne sont connus chez *C. elegans* ou chez les mammifères. Cependant, chez les mammifères la molécule appelée Smac/DIABLO (Du et *al.*, 2000 ; Verhagen et *al.*, 2000) et la sérine protéase Omi/HtrA2 (Martins et *al.*, 2002) libérées par la mitochondrie peuvent se lier aux IAP et semblent jouer un rôle homologue à celui de *reaper*, *hid* et *grim*. D'autre part, un homologue du domaine de mort FADD (Hu et Yang, 2000) ont également été décrits chez la drosophile, ce qui suppose l'existence d'une voie de mort relayée par des récepteurs.

Les cellules de mammifères expriment plusieurs membres de chacune des quatre familles de protéines décrites chez *C. elegans* (*Ced-4* et *EGL-1*, protéines pro-apoptotiques ; *Ced-3*, protéine exécutive, et *Ced-9*, protéine anti-apoptotique) et ont ainsi élaboré des réseaux complexes de signalisation conduisant à la mort cellulaire. D'autres types de gènes impliqués dans la mort cellulaire ont été identifiés. C'est le cas de la DAP-kinase (Deiss et *al.*, 1995), protéine kinase ayant une spécificité sérine/thréonine comprenant également une région sous le contrôle de la calmoduline et un domaine de mort. Son expression semble diminuée dans certaines tumeurs à fort pouvoir métastatique et elle s'oppose à la transformation induite par un oncogène en activant un point de contrôle du cycle cellulaire contrôlé par p19ARF/p53 (Raveh et *al.*, 2001). De plus, la DAP-kinase, par son domaine de mort, est nécessaire à la mort cellulaire induite par les récepteurs Fas ou TNF-R1 («TNF receptor 1»), ainsi qu'à la mort induite par TGF β («transforming growth

factor β). Dans tous les cas, son activité s'exerce en amont des événements mitochondriaux.

2. Rôles physiologiques de l'apoptose

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) joue un rôle important dans l'embryogénèse, dans les changements morphologiques, dans l'homéostasie cellulaire, dans l'atrophie et la réparation des tissus et dans la régression des tumeurs.

En effet, au cours du développement animal, de nombreuses structures sont formées mais sont ensuite détruites par apoptose. C'est le cas du canal de Müller qui est détruit chez les hommes, du canal de Wolff, à l'origine de l'appareil reproducteur mâle, qui est détruit chez la femme. Il en est de même pour les tubules pronéphriques utilisés par les poissons et les amphibiens qui ne sont pas utiles chez les mammifères ainsi que pour les cellules présentes au niveau des espaces interdigitaux.

Dans le système immunitaire, l'apoptose joue un rôle crucial dans la sélection des lymphocytes T (délétion des lymphocytes T et B auto-immuns) et dans la suppression des cellules T lors de la dernière phase de la réponse immunitaire.

De plus, au cours du développement du système nerveux central chez les vertébrés, environ 50% des neurones dégèrent au cours de la période périnatale. Ce phénomène est en partie contrôlé par des facteurs trophiques spécifiques. La survie des neurones dépendrait de leur capacité d'accéder à une quantité suffisante de facteurs neurotrophiques (Raff et *al.*, 1993).

3. Aspects pathologiques de l'apoptose

Le dérèglement de la mort cellulaire par apoptose est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies. L'apparition de cellules tumorales ou la persistance de clones lymphocytaires auto-réactifs (maladies auto-immunes) peuvent être la conséquence d'un défaut dans le processus de mort. Au contraire, une mort excessive des cellules neuronales est observée dans certaines maladies neuro-dégénératives comme l'amyotrophie spinale et la chorée de Huntington. Le même phénomène est à l'origine de certaines pathologies provoquées par des infections virales comme le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) dans lequel le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) induit l'apoptose des cellules lymphocytaires T auxiliaires nécessaires pour activer les lymphocytes T cytotoxiques (Saikumar et *al.*, 1999). Le dérèglement de l'apoptose est souvent la conséquence de mutations héréditaires ou acquises de gènes qui participent à l'apoptose ou qui activent ce processus.

3. 1. Les mutations germinales

Les mutations germinales sont le plus souvent responsables d'affections lymphoprolifératives et neurodégénératives. Ces mutations touchent plus fréquemment les voies de signalisation en aval des récepteurs de mort que la voie mitochondriale de l'apoptose. Un exemple de pathologie liée à une ou plusieurs altérations génétiques de la voie Fas (CD95)/Fas-L est le syndrome de Canale-Smith encore appelé syndrome auto-immun lymphoprolifératif (Wu et *al.*, 1996). L'amyotrophie spinale, maladie neuro-dégénérative, est due à des mutations au niveau de gènes codant pour les protéines SMN («survival motor neuron») et NAIP («neuronal apoptosis inhibitory protein»). La protéine SMN interagit dans le cytoplasme avec la protéine Bcl-2 dont elle renforce l'activité anti-apoptotique, propriété qui est perdue chez les sujets malades (Burghes et *al.*, 2001). Dans le noyau, SMN joue un rôle essentiel dans la transcription et la maturation des ARNm. D'autre part, la protéine NAIP fait partie de la famille des IAPs, capables d'inhiber l'activité des caspases (Verhagen et *al.*, 2001).

3. 2. Les mutations somatiques

Les mutations somatiques contribuent en général à la tumorigénèse ou à la progression tumorale. Il peut s'agir d'une altération de la séquence d'un gène ou de modifications épigénétiques ou post-traductionnelles. L'expression anormale d'une ou de plusieurs protéines induit une résistance à l'apoptose. Les protéines codées par ces gènes ont des fonctions variées comme la détection de dommages cellulaires (p53), le contrôle de l'activité mitochondriale de l'apoptose (Bcl-2, Bax, Bak) ou le contrôle de la voie post-mitochondriale (molécule adaptatrice Apaf-1, caspases, protéines IAP).

p53 est une protéine nucléaire essentielle au contrôle du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose induite par divers stress cellulaires (hypoxie, expression anormale d'un oncogène et altérations de l'ADN). Le gène p53 est muté dans la moitié des tumeurs humaines (Vousden, 2000). Plusieurs gènes sont régulés par la protéine p53, c'est le cas du gène codant pour la protéine p21 qui, une fois activée, arrête la progression du cycle cellulaire en phase G₁ favorisant ainsi la réparation de l'ADN (el-Deiry et *al.*, 1993). D'autres gènes impliqués dans l'apoptose sont régulés par la protéine p53 : les gènes PIG ou «p53 inducible genes», les gènes codant pour les protéines Bax, Apaf-1 ou les récepteurs de mort Fas et DR5.

Bax est une protéine pro-apoptotique, membre de la famille Bcl-2, dont l'expression est très souvent inhibée notamment dans les cancers colorectaux. Les protéines de cette famille contrôlent

le relargage de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol, une étape-clé de la voie mitochondriale de l'apoptose. Lorsque p53 est mutée, le gène de la protéine Bax ne peut être transcrit et la voie de signalisation conduisant à la mort est, au moins en partie, interrompue. Il en est de même si p53 est fonctionnelle mais si le gène Bax est muté (Jones, 2001).

La surexpression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 peut également entraîner un dérèglement de la voie de signalisation apoptotique. D'autres types de mutations somatiques peuvent se produire, c'est le cas des mutations des récepteurs de mort comme Fas, TRAIL, DR4 ou DR5, ces trois derniers ayant été identifiés dans des cancers du sein métastatiques (Shin *et al.*, 2001). Ces mutations pourraient contribuer au développement des tumeurs en favorisant l'échappement des cellules malignes aux cellules du système immunitaire (Rozenfeld-Granot *et al.*, 2001).

Des modifications épigénétiques participent également au développement des cancers humains. En effet, l'hyperméthylation de la région promotrice de certains gènes favorise le recrutement d'une histone déacétylase, qui inhibe alors leur expression. C'est le cas du gène de la caspase-8 qui, une fois méthylé, confère aux cellules une résistance à l'apoptose induite par la voie des récepteurs de mort. De la même façon, le gène codant pour Apaf-1 ne s'exprime plus lorsqu'il est méthylé. Par conséquent, l'interaction entre Apaf-1 et la caspase-9 ne peut plus se faire et l'induction de la voie apoptotique mitochondriale est inhibée ; cette méthylation confère alors une résistance des cellules tumorales aux agents cytotoxiques.

4. Acteurs moléculaires majoritaires de l'apoptose

4.1. Les caspases

Les caspases sont des cystéines protéases pouvant intervenir dans le processus de mort cellulaire après stimulation des cellules par différents facteurs comme des molécules chimiques, des signaux physico-chimiques (UV, rayons gamma) ou la privation en facteurs de croissance. Elles ont un rôle primordial dans l'initiation et dans l'exécution de l'apoptose. Le terme caspase a été proposé par Alnemri *et al.* (1996), le « C » représente la cystéine du site actif et « aspase » définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique.

Une autre protéase connue pour avoir la même spécificité est le Granzyme B, une sérine protéase contenue dans les granules des cellules cytotoxiques qui initie la mort par apoptose des cellules cibles.

4.1.1. Structure et activation des caspases

La première caspase, la caspase-1 ou ICE a été mise en évidence chez les mammifères par homologie avec la protéine pro-apoptotique *ced-3* identifiée chez *C. elegans* (Miura *et al.*, 1993) ; 14 caspases différentes ont été mises en évidence jusqu'à présent.

Toutes les caspases ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. Les caspases sont constituées d'un pro-domaine de taille et de séquence variables localisé dans la partie amino-terminale de la protéine, d'une grande sous-unité (20 kda) située au milieu de la molécule et d'une petite sous-unité (10 kda) localisée dans la partie carboxy-terminale. Certains membres de la famille des caspases possèdent un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité. Le domaine N-terminal semble jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines et donc dans la régulation de l'activation de ces enzymes (Thornberry, 1998) (Figure 1).

L'activation des caspases passe par le clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de deux sites consensus, permettant de couper le pro-domaine et de séparer les deux sous-unités. Les caspases peuvent s'autocliver et activer d'autres caspases ou substrats formant alors une cascade enzymatique permettant d'amplifier et d'intégrer les signaux pro-apoptotiques (Thornberry et Lazebnik, 1998 ; Thornberry, 1998). Les deux sites consensus diffèrent selon les caspases mais le clivage se fait toujours après la liaison Asp-X (Figure 1). Bien que la grande sous-unité contienne le domaine catalytique, son activité nécessite la liaison à la petite sous-unité. En effet, les études par cristallographie révèlent que les caspases actives sont sous forme de tétramères formés par l'association de deux hétérodimères, contenant deux sites catalytiques indépendants (Wilson *et al.*, 1994). L'activation des caspases est un événement précoce se produisant au cours de l'apoptose et l'inhibition de ces caspases par des protéines virales ou par des peptides spécifiques empêche l'apparition des caractéristiques morphologiques de l'apoptose alors que l'administration de caspases recombinantes dans des cellules induit leur mort par apoptose (Thornberry *et al.*, 2000).

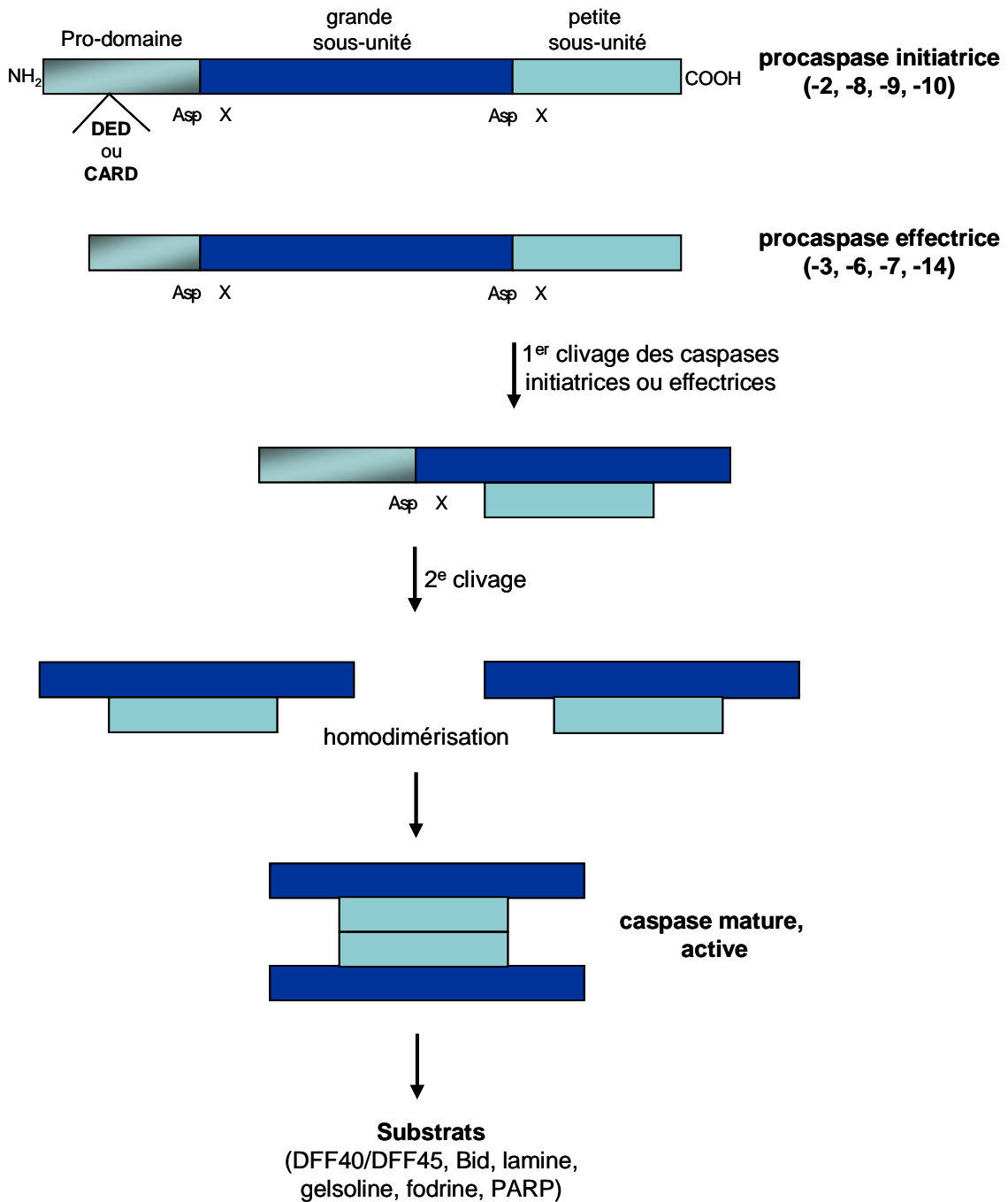


Fig. 1 : Activation des caspases (D'après Amarante-Mendes et Green, 1999)

4.1.2. Les différentes classes de caspases

Toutes les caspases ne sont pas des molécules effectrices du processus de mort. En effet, seules les caspases-3, -6, -7 et -14 ayant un pro-domaine court sont directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose alors que les caspases-2, -8, -9, et -10 à pro-domaines longs sont des molécules initiatrices ou régulatrices (Figure 1). Ces dernières fonctionnent comme des molécules de signalisation, elles sont en effet recrutées au niveau de complexes protéiques par l'intermédiaire de leur pro-domaine et sont capables par autoactivation de transduire le signal et d'activer les caspases effectrices. Il est désormais connu que les caspases-8 et -10 sont activées par la voie des récepteurs de mort alors que la caspase-9 est activée par la voie apoptotique mitochondriale (Amarante-Mendes et Green, 1999 ; Gupta, 2003). Cette différence dans le rôle des caspases est liée à la présence de motifs d'interactions protéines-protéines, tels que les domaines DED pour «death effector domain» (caspase-8 et -10) ou CARD pour «caspase recrutement domain» (caspase-1, -2, -4 et -9) au niveau du pro-domaine. En effet, les caspases-8 et -10 contiennent des DEDs capables de se lier par liaison homophile à d'autres DEDs présents sur des molécules adaptatrices. Le domaine CARD contenu dans les pro-domaines des caspases-1, -2, -4 et -9 leur permet de la même manière de s'associer à d'autres caspases ou à d'autres molécules adaptatrices.

Certaines caspases comme les caspases-1, -4, -5, -11, -12 et -13 semblent être des caspases impliquées dans l'inflammation probablement en induisant le clivage de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 et l'interleukine-18. La caspase-12 bien qu'elle soit une caspase inflammatoire a été récemment décrite comme la caspase médiant l'apoptose à partir d'un stress au niveau du réticulum endoplasmique (Oyadomari et *al.*, 2002).

4.1.3. Principaux substrats des caspases et conséquences de leur clivage

Plusieurs substrats des caspases ont été identifiés et l'un des mécanismes les plus étudiés est l'activation des nucléases conduisant à la fragmentation de l'ADN. Ces nucléases coupent l'ADN génomique entre les nucléosomes pour générer des fragments de 180 paires de bases. Ces nucléases portent le nom de DFF pour facteur de fragmentation de l'ADN chez l'homme et CAD pour «caspase activated-DNase» chez la souris. Elles existent dans la cellule sous forme de complexe inactif parce qu'elles sont liées à une sous-unité inhibitrice. La nucléase DFF40 est complexée à la protéine inhibitrice DFF45 chez l'homme et chez la souris CAD est complexée à ICAD. L'activation de ces endonucléases se produit pendant l'apoptose par clivage de la sous-unité inhibitrice par la caspase-3 (Figure 1). L'endonucléase ainsi libérée va générer des fragments

d'ADN de 180 paires de base (Samejima et *al.*, 2001). Toutefois, il apparaît que dans certaines formes d'apoptose, cette fragmentation internucléosomale de l'ADN soit remplacée par une fragmentation de haut poids moléculaire (Kaufmann et *al.*, 2000).

Certains membres de la famille Bcl-2 peuvent également être clivés pour être activés, c'est le cas de la protéine Bid clivée par la caspase-8 dans certaines conditions (Li et *al.*, 1998 ; Luo et *al.*, 1998) (Figure 1).

D'autres évènements comme le clivage des lamines par les caspases expliquent la condensation nucléaire observée au cours de l'apoptose (Buendia et *al.*, 1999). La perte de la morphologie cellulaire est probablement la conséquence du clivage de protéines du cytosquelette comme la fodrine et la gelsoline (Kothakota et *al.*, 1997) et l'apparition de bourgeonnements membranaires semble être provoquée par le clivage de PAK-2 («p21-activated kinase») au niveau de la sous-unité régulatrice et au niveau de la sous-unité catalytique, permettant ainsi son activation (Rudel et Bokoch, 1997) (Figure 1). Près de 100 substrats de caspases ont été rapportés jusqu'alors indiquant la complexité du phénomène de mort par apoptose.

Un autre substrat très étudié est la poly (ADP-ribose) polymérase ou PARP (Dantzer et *al.*, 1999). Cette protéine enzymatique est constituée d'un domaine amino-terminal de liaison à l'ADN contenant deux motifs en doigts de zinc, un domaine central et un domaine carboxy-terminal catalytique. Dans des conditions normales, l'enzyme inactive réside dans le nucléoplasme et, en réponse à des lésions sur l'ADN, PARP est recrutée. Elle devient active en se liant à l'ADN et permet alors la réparation de l'ADN en synthétisant de longs polymères d'ADP-ribose. Elle fait partie de la superfamille des enzymes utilisant le NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) comme substrat pour transférer l'ADP-ribose sur les protéines « acceptrices ». Contrairement à la mono (ADP-ribosyl) transférase, la PARP peut générer au moins 200 unités d'ADP-ribose comme le font les toxines bactériennes. La PARP semble jouer un rôle important au cours de l'apoptose ainsi qu'au cours de la nécrose. Pendant l'apoptose, la PARP est clivée par des protéases telles que les caspases-3, -7 ou -9, ce qui sépare le domaine de liaison à l'ADN du domaine catalytique (D'Amours et *al.*, 1999) (Figure 1). Le domaine de liaison à l'ADN peut par conséquent, en se fixant sur l'ADN, empêcher toute autre réparation. Néanmoins, étant donné que la synthèse d'un grand nombre d'unités ADP-ribose nécessite une consommation importante de NAD⁺, l'activité excessive de PARP peut provoquer une déplétion de ce dinucléotide dans la cellule et perturber le métabolisme énergétique de la cellule en limitant la synthèse d'ATP (D'Amours et *al.*, 1999 ; Simbulan-Rosenthal et *al.*, 1999). Lorsque l'ADN est peu endommagé, la PARP peut réparer

l'ADN mais lorsque les lésions sur l'ADN sont sévères, la PARP est surexprimée et la quantité de NAD⁺ dans la cellule diminue fortement conduisant donc à une importante déplétion en énergie dans la cellule amenant celle-ci à une mort par nécrose. Récemment quatre nouveaux gènes codant pour la PARP ont été découverts (Dantzer et *al.*, 1999). La famille PARP est donc constituée de la protéine PARP-1 (première protéine mise en évidence), de PARP-2 ayant un rôle majoritaire dans la protection du génome, de PARP-3, de VPARP jouant un rôle dans le transport cellulaire et enfin de tankyrase jouant un rôle dans la réplication du télomère.

4.2. Les membres de la famille Bcl-2

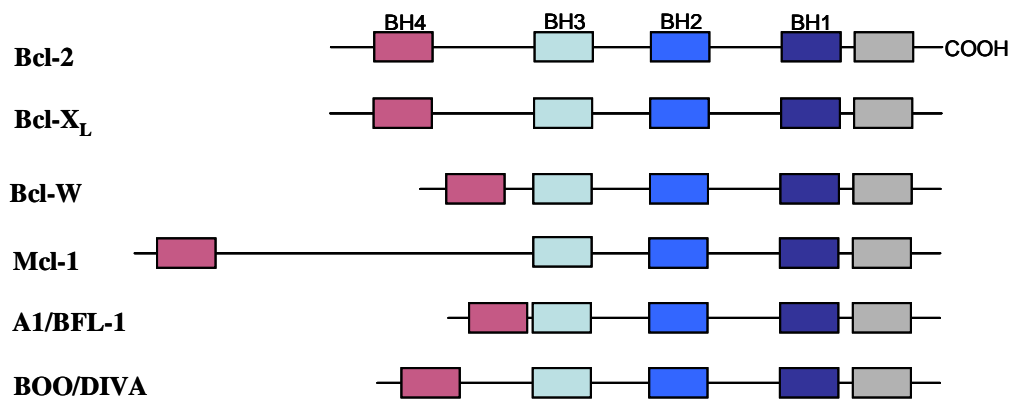
4.2.1. Structure

Les membres de la famille Bcl-2 (« B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins ») sont des régulateurs de l'apoptose. Cette famille, contenant environ 15 membres, peut être divisée en 2 groupes en fonction de leur activité : les protéines possédant une activité anti-apoptotique et les protéines possédant une activité pro-apoptotique.

Ces deux groupes diffèrent par leur structure mais quatre régions sont communes et conservées, il s'agit des domaines BH pour « Bcl-2 homology ». Les régions BH1, 2 et 3 forment la poche hydrophobe capable de lier un domaine BH3 appartenant à une autre protéine, le domaine BH3 étant une hélice α amphipathique (Gross et *al.*, 1999) (Figure 2).

Les membres de la famille Bcl-2 qui sont anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/BFL-1 et BOO/DIVA contiennent les domaines BH1, 2, 3 et 4 (Figure 2). Les membres pro-apoptotiques se divisent en 2 sous-groupes, ceux qui possèdent les 3 domaines (BH1, 2 et 3) comme Bax, Bak, Bok/MTD et ceux qui possèdent uniquement le domaine BH3 comme Bid, Bad, Bik/NBK, BLK, HRK, BIM (BOD) encore appelés « BH3-only proteins » ; la région BH3 semble être fortement impliquée dans l'activité pro-apoptotique (Figure 2). La région BH4 et les séquences proches, présentes dans les protéines anti-apoptotiques uniquement, peuvent être phosphorylées. Par complexation avec d'autres protéines, comme la calcineurine, ce domaine permet de faire un lien avec d'autres voies que l'apoptose (Shibasaki et *al.*, 1997). Toutes les protéines de la famille Bcl-2 contiennent un domaine carboxy-terminal hydrophobe de 20 acides aminés permettant leur ancrage dans la membrane intracellulaire en majorité au niveau de la mitochondrie mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et du noyau (Krajewski et *al.*, 1993) (Figure 2).

Anti-apoptotiques



Pro-apoptotiques

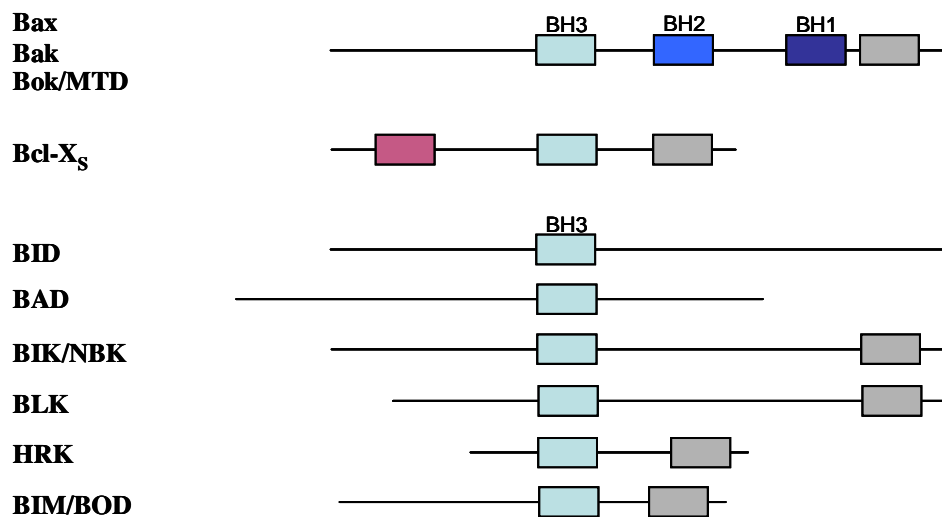


Fig. 2 : Les membres de la famille Bcl-2 (d'après Gross et *al.*, 1999)

4.2.2. Régulation des membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 sont régulés transcriptionnellement et post-traductionnellement par des cytokines ou des facteurs de survie ou de mort. Outre les processus de dimérisation permettant aux protéines de s'activer (homodimérisation) ou de s'inhiber (hétérodimérisation), d'autres phénomènes comme des modifications post-traductionnelles (phosphorylations ou protéolyses) permettent de réguler l'activité de certains membres de cette famille.

Une hyperphosphorylation de Bcl-2 semble altérer son activité anti-apoptotique dans certaines cellules (Chang *et al.*, 1997). La kinase susceptible de phosphoryler Bcl-2 pourrait être la c-Jun N-terminal Kinase (JNK), kinase activée par un stress.

Bad est une protéine pouvant se lier à Bcl-X_L et inhiber son activité anti-apoptotique, cette liaison n'est permise que si le site de liaison de Bad est déphosphorylé. Plusieurs kinases peuvent phosphoryler Bad. C'est le cas de la protéine Akt/PKB/RAC qui est une sérine thréonine kinase agissant en amont de la kinase de l'inositol tri-phosphate (IP-3) (Zha *et al.*, 1996) et de la kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Harada *et al.*, 1999).

La protéine Bid (22 kDa) est un substrat de la caspase-8 et doit être clivée pour être active. Le fragment C-terminal de 15 kDa généré par la protéolyse peut ainsi s'insérer au niveau de la membrane mitochondriale et permettre l'activation de la voie mitochondriale amplifiant ainsi le signal de mort initié par la voie des récepteurs (Li *et al.*, 1998 ; Luo *et al.*, 1998).

Un autre processus permet à Bim d'interagir avec Bcl-2 et de favoriser l'induction de l'apoptose après certains stimuli. Bim est une protéine localisée au niveau du complexe dinéine-microtubule dans les cellules intactes. Après certains signaux de mort, elle se dissocie du complexe et se transloque dans la mitochondrie sans être clivée (Puthalakath *et al.*, 1999). La protéine pro-apoptotique Bax peut être induite par p53 dans certains types cellulaires.

4.2.3. Mode d'action

La plupart de ces petites protéines peuvent donc se dimériser, ce qui se produit souvent entre protéines pro-apoptotiques et protéines anti-apoptotiques. La régulation de l'apoptose par ces protéines résulte par conséquent du niveau d'expression entre protéines pro- ou anti-apoptotiques, les cellules exprimant plus de protéines pro-apoptotiques seront sensibles à la mort, les autres seront résistantes (Hengartner, 2000).

La fonction principale de ces régulateurs est de contrôler la libération de facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome c, de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol. En effet,

l'addition de protéines pro-apoptotiques est suffisante pour induire le relargage du cytochrome c, alors que l'addition de protéines anti-apoptotiques prévient ce relargage (Gross et *al.*, 1999 ; Antonsson et Martinou, 2000). De plus, des inhibiteurs de caspases n'altèrent pas le relargage du cytochrome c, ce qui suppose que les caspases ne sont pas impliquées dans ces événements.

Bcl-2 semble être très souvent liée à la membrane mitochondriale alors que d'autres protéines comme Bax, Bid, Bad et Bim sont cytosoliques mais se transloquent dans la mitochondrie pendant l'apoptose. Ces protéines jouent un rôle important dans la transduction du signal allant du cytosol vers la mitochondrie. La translocation de ces protéines est contrôlée par des modifications post-traductionnelles comme une déphosphorylation pour Bad ou un clivage pour Bid. Bax est premièrement transloquée du cytosol vers la mitochondrie, sa conformation est alors modifiée et l'externalisation de son domaine amino-terminal permet son oligomérisation ainsi que son insertion au niveau de la membrane externe mitochondriale (Jürgensmeier et *al.*, 1998). Cette capacité d'insertion semble être liée à l'homologie de structure des membres de la famille Bcl-2 avec certaines toxines bactériennes, leur permettant de former des pores au niveau de la mitochondrie. Cette insertion est en effet rapidement suivie par le relargage du cytochrome c. D'autres travaux suggèrent que leur capacité d'insertion est facilitée par l'interaction avec le canal anionique voltage-dépendant ou VDAC. Ces changements dans la conformation de Bax semblent être favorisés par l'interaction avec Bid (Eskes et *al.*, 2000) et peuvent être réduits ou empêchés par Bcl-2 ou Bcl-X_L, ces protéines anti-apoptotiques agissant par liaison directe avec Bax (Desagher et *al.*, 1999). Il a été montré que Bcl-2 pouvait en outre empêcher l'activation des caspases par Bax sans effet sur le relargage du cytochrome c (Rosse et *al.*, 1998). Les protéines anti-apoptotiques pourraient donc agir en aval de la libération du cytochrome c.

4.2.4. Rôle des membres de la famille Bcl-2 dans la régulation du cycle cellulaire

Les membres de la famille Bcl-2 peuvent moduler le cycle cellulaire ; en effet Bcl-2 peut favoriser l'entrée des cellules en phase G₀, les bloquer et retarder leur entrée dans le cycle cellulaire (Mazel et *al.*, 1996 ; Linette et *al.*, 1996). Cet effet est probablement dissocié de son activité anti-apoptotique puisque une altération de sa structure au niveau du domaine non conservé permet aux cellules de poursuivre leur cycle cellulaire mais ne modifie pas son activité anti-apoptotique (Uhlmann et *al.*, 1996).

5. Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose

5. 1. Généralités

La mitochondrie joue un rôle vital dans la cellule en produisant une grande partie de l'énergie dont la cellule a besoin, en participant à l'homéostasie calcique, en maintenant le potentiel redox et le pH intracellulaire. Ceci signifie qu'un dysfonctionnement majeur de la mitochondrie peut entraîner la mort cellulaire programmée. Un changement dans le transport des électrons peut suffire à augmenter la production des radicaux libres oxygénés et à acidifier le cytoplasme. Dans ces conditions, les électrons ne sont plus produits en quantité suffisante et la diminution de la synthèse d'ATP entraîne une accumulation de lactate par stimulation de la glycolyse. De plus, les électrons libérés peuvent réduire l'oxygène en ions superoxydes, radicaux libres oxygénés très réactifs. Pendant l'apoptose, de l'eau et différents solutés pénètrent dans la mitochondrie provoquant son gonflement et la libération des différents constituants de l'espace intermembranaire dans le cytosol ; les constituants de la matrice sont retenus dans la mitochondrie grâce à la membrane interne restée intacte.

5. 2. Mécanismes d'ouverture des canaux

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le relargage de solutés de la mitochondrie vers le cytosol, étape correspondant à la phase effectrice de l'apoptose (Figure 3).

5. 2. 1. La théorie de la rupture de la membrane externe mitochondriale

Le premier modèle implique l'hyperpolarisation de la membrane interne précédant la libération du cytochrome c dans certains systèmes. Cette hyperpolarisation résulterait de l'incapacité de l'échange entre l'ADP cytosolique et l'ATP mitochondrial (Vander Heiden et *al.*, 1999). Cet échange est normalement effectué par les canaux anioniques voltage-dépendant ou VDAC localisés au niveau de la membrane externe et par le transporteur de nucléotide adénylique ou ANT localisé au niveau de la membrane interne. Cette absence d'échange semble inhiber l'activité de la F1F0-ATPase, ce qui empêche le retour des ions H⁺ vers la matrice et par conséquent contribue à l'hyperpolarisation. Une telle augmentation du potentiel membranaire mitochondrial peut être à l'origine du gonflement osmotique de la matrice conduisant à la rupture de la membrane externe mitochondriale (Figure 3a).

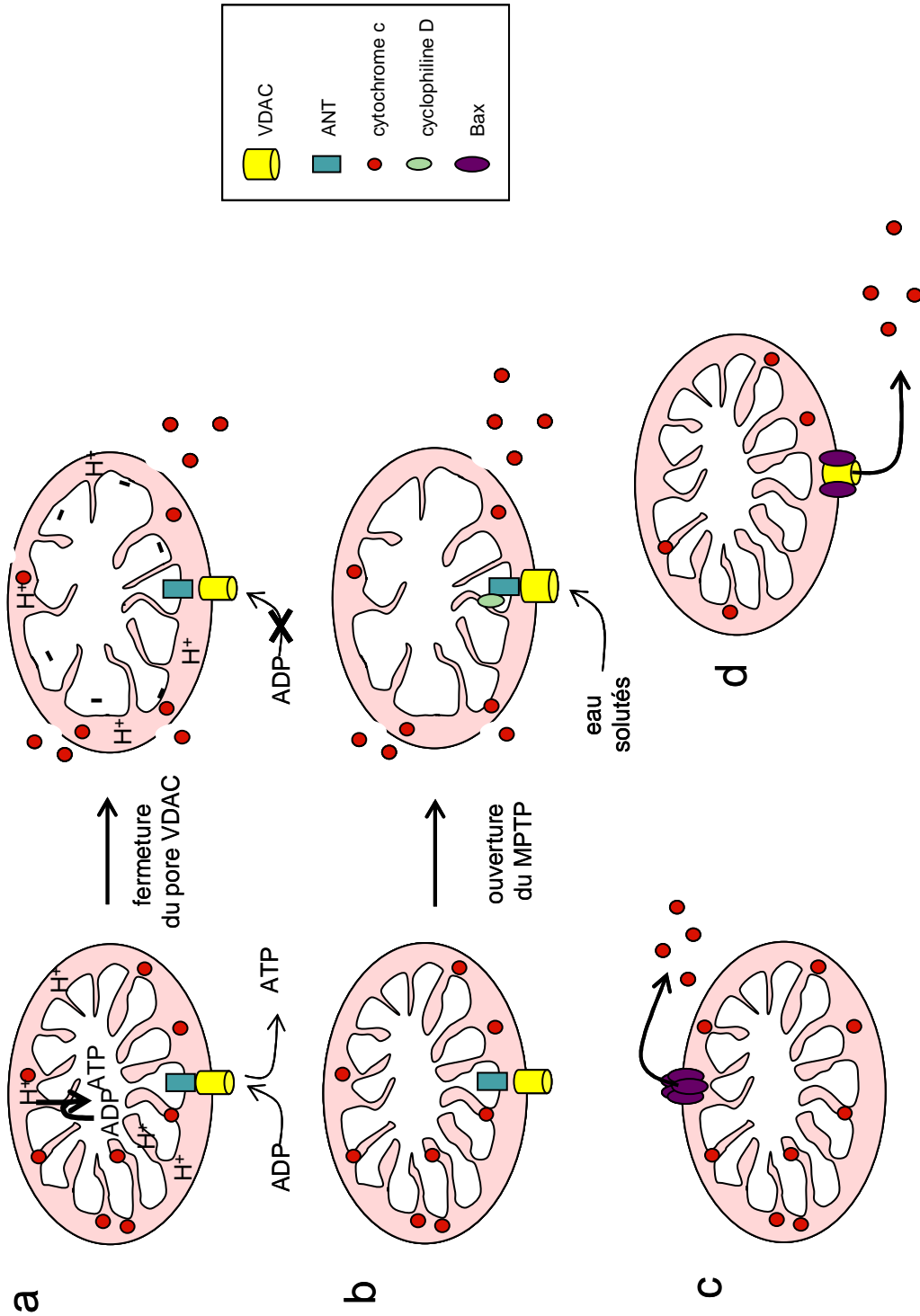


Fig. 3 : Mécanismes d'ouverture des canaux expliquant le relargage du cytochrome c (d'après Deshager et Martinou, 2000)

5. 2. 2. Le pore de transition de perméabilité membranaire

Le modèle décrit sur la Figure 3 est en opposition avec un deuxième modèle impliquant un méga-canal, le pore de transition de perméabilité membranaire ou MPTP. Ce MPTP est un canal non sélectif de « haute conductance » pouvant être formé par l'apposition de protéines transmembranaires résidant au niveau de la membrane interne et au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Crompton, 1999). Les différentes études réalisées montrent que ce pore est principalement formé par l'association de l'ANT, du VDAC et de la cyclophiline D, une protéine de la matrice (Figure 3b). L'ouverture du pore peut être induite par différents effecteurs physiologiques comme le calcium, la diminution de la concentration en adénine nucléotide ou en phosphate inorganique, la production de radicaux libres oxygénés ou le changement de pH (Crompton, 1999) ainsi que par la présence de la protéine Bax. L'ouverture du pore augmente la perméabilité de la membrane interne mitochondriale vis-à-vis de protéines de poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa. Ceci entraîne une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial (proton-dépendant), un déséquilibre chimique entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale, ainsi qu'un découplage de la phosphorylation oxydative, provoquant alors un gonflement osmotique pouvant conduire à la rupture de la membrane externe. Il a été suggéré que la quantité d'ATP accessible après l'ouverture du pore est un facteur déterminant dans l'induction de la mort par nécrose ou par apoptose. Cette hypothèse du méga-canal est confortée par l'effet anti-apoptotique d'inhibiteurs spécifiques du MPTP comme l'acide bongkréique (ligand antagoniste de l'ANT) ou comme la cyclosporine A (ligand de la cyclophiline D) et par l'effet apoptotique d'agent comme l'atractyloside (ligand de l'ANT). De plus, les membres de la famille Bcl-2 peuvent réguler l'ouverture du pore : Bcl-2 peut prévenir cette ouverture (Kroemer et *al.*, 1997 ; Shimizu et *al.*, 1998) alors que Bax provoque une chute du potentiel membranaire mitochondrial (Marzo et *al.*, 1998) et en favorise l'ouverture (Figure 3d).

5. 2. 3. La théorie du pore formé par les membres de la famille Bcl-2

Cependant, plusieurs études divergent quant à la chronologie des événements, à savoir si l'ouverture du pore est la cause ou la conséquence du relargage du cytochrome c. En effet, plusieurs travaux ont montré que le relargage du cytochrome c pouvait se produire en absence ou avant la chute du potentiel membranaire mitochondrial (Goldstein et *al.*, 2000 ; Bossy-Wetzel et *al.*, 1998). Une explication de ce phénomène pourrait être l'ouverture réversible (transitoire) du MPTP, affectant la perméabilité de la membrane externe mitochondriale mais permettant la

restauration du potentiel membranaire mitochondrial. De plus, l'ouverture du pore peut être la conséquence de l'inhibition du transport d'électrons due au relargage du cytochrome c entraînant une chute du potentiel membranaire mitochondrial et du taux d'ATP, ou la conséquence de l'activation des caspases (Marzo et *al.*, 1998). En effet, des inhibiteurs de caspases peuvent empêcher la chute du potentiel membranaire mitochondrial sans bloquer le relargage du cytochrome c (Bossy-Wetzel et *al.*, 1998).

L'ouverture caspase-dépendante du MPTP pourrait amplifier la boucle par laquelle le relargage précoce du cytochrome c induirait les modifications au niveau mitochondrial. Ce modèle permettrait de conforter les observations faites, c'est-à-dire le relargage du cytochrome c suivi d'une chute du potentiel membranaire mitochondrial.

La rupture de la membrane externe mitochondriale expliquerait la libération massive des facteurs pro-apoptotiques ou SIMP («soluble inter membrane mitochondrial proteins») contenus dans la mitochondrie (AIF, caspases...). Mais une telle rupture n'a pas souvent été décrite et de nombreuses études indiquent qu'il s'agirait plutôt d'une conséquence que d'une cause du relargage du cytochrome c.

Un autre mécanisme doit donc permettre le relargage du cytochrome c. L'hypothèse d'un canal pouvant laisser passer les protéines est étudiée. Il pourrait être formé par certains membres de la famille Bcl-2 compte-tenu de la forte homologie de Bcl-X_L avec la sous-unité de la toxine diphtérique, capable de former un pore membranaire. Il a été suggéré que les protéines de la famille Bcl-2 comme Bax pouvaient s'insérer, après changement conformationnel, au niveau de la membrane externe mitochondriale (Figure 3c). Ces protéines, constituées d'une zone hydrophobe et d'une hélice α entourée par 5 hélices amphipathiques (Schendel et *al.*, 1998), peuvent s'insérer dans la bicouche lipidique, s'oligomériser pour former un canal mais le fait qu'un tel canal puisse être assez gros pour laisser passer de petites protéines reste à démontrer. Il a été montré que ces protéines pouvaient former un canal ionique fonctionnel dans des vésicules lipidiques synthétiques. Ces canaux sont dépendants du pH, du voltage et révèlent une faible sélectivité ionique. Les propriétés des canaux formés par des protéines pro- ou anti-apoptotiques diffèrent significativement, ce qui expliquerait leurs effets opposés vis-à-vis du cytochrome c (Schlesinger et *al.*, 1997).

6. Les différentes voies de l'apoptose

La phase d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra- ou extra-cellulaire) est transmis à des caspases initiatrices par des molécules

adaptatrices.

Il existe deux principales voies caspases-dépendantes de signalisation de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque). Elles semblent être bien distinctes, cependant la voie des récepteurs de mort peut provoquer l'apoptose par la voie mitochondriale grâce à la protéine Bid, membre de la famille Bcl-2. Récemment, la voie du réticulum endoplasmique dépendante de la caspase-12 a été mise en évidence (Oyadomari et *al.*, 2002). Une autre voie apoptotique caspase-indépendante est initiée par la mitochondrie grâce à la libération de l'AIF pour «apoptosis-inducing factor».

6. 1. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque

Les ligands, membres de la famille du facteur nécrosant des tumeurs (TNF), jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la modulation de la réponse immunitaire et l'induction de l'inflammation (Pitti et *al.*, 1996). Seize ligands membres de la famille du TNF ont été identifiés : TNF α , FasL, TRAIL (Apo-2L), lymphotoxine α , lymphotoxine β , CD27L, CD30L, CD40L, CD137L, OX40L, RANKL, LIGHT, TWEAK, APRIL, TL1 et BAFF. La plupart des ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires avant que leurs domaines extracellulaires soient clivés par des métalloprotéases pour former des formes solubles. Les ligands sont produits sous forme de trimères et se lient à des récepteurs de la famille du récepteur au TNF qui sont des protéines transmembranaires caractérisées par un motif extracellulaire riche en cystéines et un domaine de mort (DD, «Death Domain») intracellulaire. Par conséquent, la mort cellulaire initiée par ces ligands requiert la trimérisation des récepteurs. De nouveaux ligands comme BAFF ont été mis en évidence récemment et semblent n'être exprimés que dans les cellules B du système immunitaire.

Tous ces ligands n'induisent pas la mort cellulaire. En effet, CD27L, CD30L et CD40L sont impliqués dans la survie cellulaire contrairement aux ligands TNF α , FasL ou TRAIL. En effet, l'interaction de CD40L avec son récepteur CD40 permet le recrutement de membres de la famille TRAF («TNF-R-associated factor») et conduit à l'activation de la voie de signalisation impliquant le facteur de transcription NF- κ B («nuclear factor-Kappa B»). Cette voie est le plus souvent induite dans les cellules du système immunitaire comme signal de survie.

La mort induite par les membres de la famille des récepteurs au TNF conduit à l'activation de caspases et en est dépendante (Longthorne et Williams, 1997).

Remarque : La perforine libérée à l'interface entre le lymphocyte T cytotoxique et la cellule

cible forme un canal qui permet au Granzyme B, une protéase à sérine possédant une spécificité de clivage identique à celle des caspases, de pénétrer dans la cellule cible afin d'activer directement les caspases effectrices et d'induire l'apoptose (Heusel et *al.*, 1994).

6. 1. 1. La voie FasL/Fas (CD95 ou Apo-1)

La glycoprotéine Fas (CD95, Apo-1) est un récepteur transmembranaire constitutivement exprimé dans les lymphocytes tandis que la protéine ligand transmembranaire, FasL (CD95L, Apo-1L), est induite après activation de ceux-ci. Le récepteur Fas est également exprimé à la surface de nombreux types cellulaires. La protéine ligand peut être libérée de la surface cellulaire par des métalloprotéases et, ainsi soluble, elle peut se lier au récepteur (Tanaka et *al.*, 1995). Les étapes de la voie apoptotique médiée par Fas sont représentées Figure 4. La liaison du ligand à son récepteur entraîne une trimérisation des récepteurs. Le domaine cytoplasmique de Fas ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque mais contient un domaine de mort de 80 acides aminés (DD) permettant à une protéine adaptatrice, Fas-associated death domain (FADD), d'interagir. FADD possède également en plus de son «DD» un domaine effecteur de mort (ou «Death Effector Domain», DED) lui permettant de lier la procaspase-8 (ou Flice pour «FADD-like ICE») ou la procaspase-10. La formation de ce complexe appelé DISC pour «Death-inducing Signaling Complex» initie l'activation enzymatique de l'apoptose. La caspase active est libérée du complexe et va activer d'autres procaspases comme la procaspase-3, caspase effectrice de l'apoptose induisant l'activation de différents substrats à l'origine des modifications cellulaires caractéristiques de l'apoptose (Gupta, 2003).

6. 1. 2. La voie TNF-TNF-R

☞ *La voie des récepteurs TNF-R1 et -2*

Le TNF- α est sécrété principalement par les macrophages et les lymphocytes activés en réponse à une infection. Ce facteur agit en se liant aux récepteurs de type 1 et 2 (TNF-R1 et TNF-R2) et active plusieurs voies de signalisation. Les deux récepteurs sont des récepteurs transmembranaire qui diffèrent par leur partie cytoplasmique, TNF-R1 possédant un domaine DD contrairement à TNF-R2. Ces deux récepteurs peuvent induire un signal de survie cellulaire mais TNF-R1 peut également provoquer un signal de mort par son domaine DD. TNF-R1 peut être synthétisé en réponse à une stimulation par les cellules T activées et les macrophages. La liaison du TNF à son récepteur peut aussi bien conduire à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (anti-apoptotiques) qu'à l'apoptose (Hsu et *al.*, 1995) (Figure 4).

La fixation du TNF α provoque une trimérisation de TNF-R1 permettant la liaison de la protéine

adaptatrice TRADD pour « TNF-R associated death domain ». Celle-ci va à son tour recruter FADD par son domaine DD. De la même façon que lors de l'apoptose induite par le récepteur Fas, la caspase-8 ou -10 va être activée par l'apoptosome TNF-R1/TRADD/FADD afin d'agir sur les caspases effectrices -3, -6 et -7 (Figure 4).

Mais, TNF-R1 peut également activer une voie indépendante de FADD via la protéine RIP (« receptor interacting protein »), cette voie étant moins fréquente que la voie dépendante de FADD. TRADD possède un domaine DD qui peut s'associer à la protéine RIP. Cette dernière s'associe à la protéine RAIDD (« RIPK1 Domain containing Adapter with DD») qui possède un domaine CARD («caspase recruitment domain»), domaine également présent sur les caspases-3, -9 et -2. Bien que l'activation des caspases-8 et -10 soit dépendante de FADD, l'activation de la caspase-2 est indépendante de FADD et se fait grâce à l'apoptosome TNF-R1/TRADD/RIP/RAIDD (Karin et Lin, 2002) (Figure 4).

Le TNF α peut également induire un signal de survie cellulaire grâce à deux types de protéines adaptatrices, TRAF-2 («TNF-R-associated factor-2») et RIP. TRAF-2 et RIP induisent la survie cellulaire par l'activation de la voie MAP kinase et par la voie NF- κ B respectivement. NF- κ B est souvent décrit comme un facteur répresseur de l'apoptose alors que la MAPK peut aussi bien inhiber qu'induire l'apoptose. L'activation de NF- κ B se fait par l'induction de la kinase NIK pour «NF- κ B-inducing kinase». Cette kinase va activer la kinase IKK «inhibitor of κ B (I- κ B) kinase» en la phosphorylant ce qui va permettre la dissociation du complexe NF- κ B/I- κ B et la dégradation de I- κ B favorisant l'activation transcriptionnelle de NF- κ B (Figure 4).

Le récepteur TNF-R2 ne possède pas de domaine DD cytoplasmique mais la liaison du TNF α à TNF-R2 conduit à l'interaction de TRAF-1 et -2 au domaine de TNF-R2 cytoplasmique. Il a été rapporté que TNF-R2 jouait un rôle important dans la régulation de l'apoptose médiée par TNF-R1 (Declercq et *al.*, 1998).

Le récepteur DR3 ressemble au récepteur TNF-R1, et induit l'apoptose de la même façon grâce aux protéines TRADD, FADD et caspase-8. Le ligand de ce récepteur, Apo3L est proche du TNF mais est synthétisé de façon constitutive dans tous les tissus contrairement au TNF qui est synthétisé après activation de macrophages et de lymphocytes.

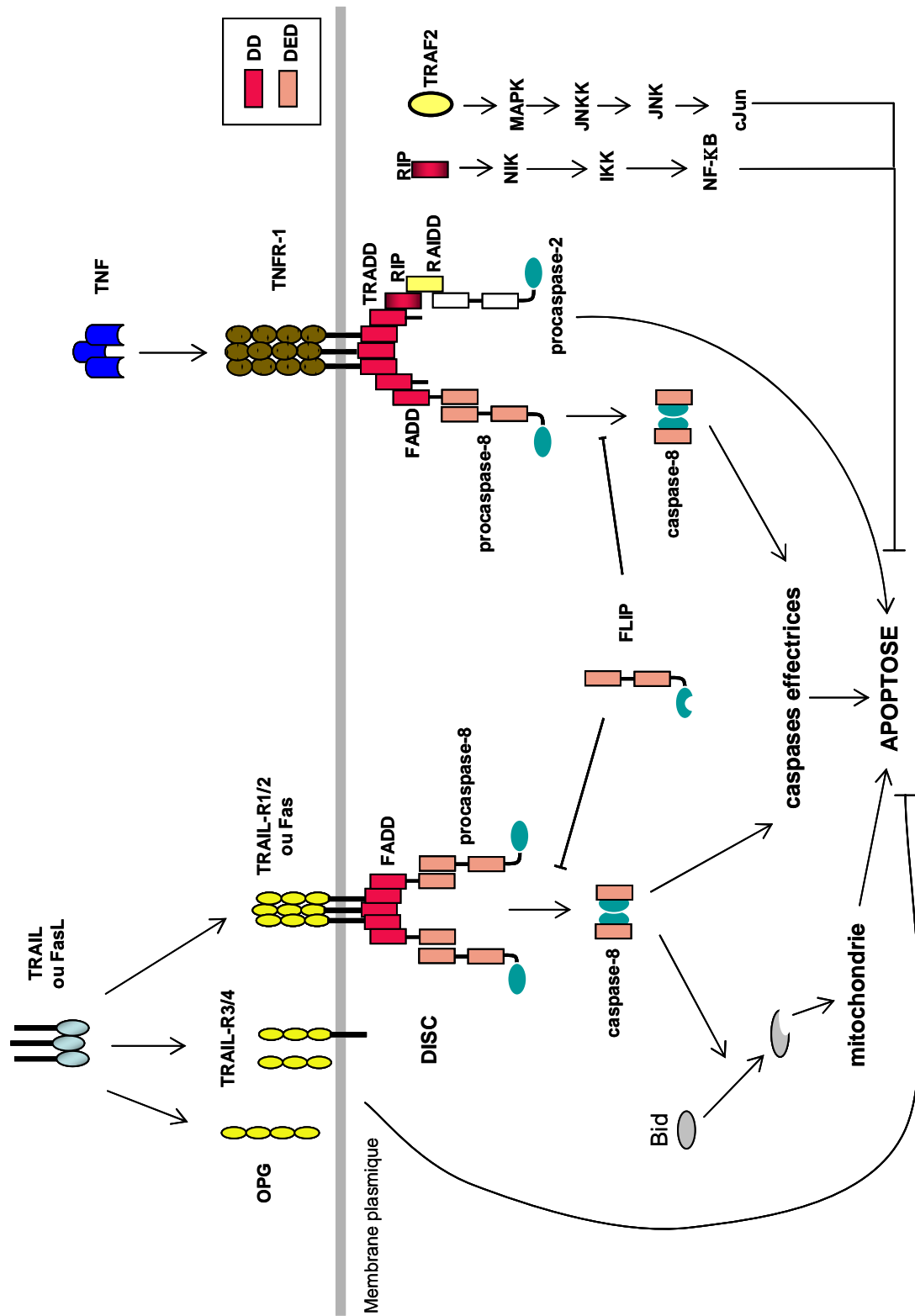


Fig. 4 : La voie des récepteurs de mort (d'après Gupta, 2003)

☞ La voie des récepteurs TRAIL (Apo-2L)

Les ligands similaires au TNF induisant l'apoptose (TRAIL, «tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand» ou Apo2L) sont des protéines transmembranaires d'environ 34 kDa, pouvant former des trimères et qui sont des membres de la famille du TNF. L'interaction entre TRAIL et les récepteurs TRAIL-R1 (DR4) et/ou TRAIL/R2 (DR5, Apo-2, TRICK2, Killer) induit rapidement la mort cellulaire dans les cellules cibles qui sont principalement des cellules tumorales (Pitti et *al.*, 1996, Mariani et *al.*, 1997). Les ligands TRAIL et leurs récepteurs sont exprimés de façon constitutive dans beaucoup de tissus (Pitti et *al.*, 1996), ce qui suppose l'existence d'un mécanisme de contrôle de l'apoptose induite par TRAIL. La liaison du ligand au récepteur permet l'interaction de ce complexe avec des protéines adaptatrices comme FADD décrite auparavant ou TRADD. Le déroulement de la signalisation induite par les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 se rapproche de celle induite par la voie FasL/Fas (Figure 4). En effet, la procaspase-8 est activée par interaction des DED présents sur les protéines adaptatrices ainsi que sur la procaspase-8.

Trois autres récepteurs appartenant à la famille des récepteurs de TRAIL ont été identifiés : TRAIL-R3 (DcR1, TRID, LIT), TRAIL-R4 (DcR2, TRUND) et l'ostéoprotégérine (OPG). Ils fonctionnent comme modulateurs interférant avec l'activité des récepteurs de mort car ils ne possèdent pas de domaine propre intracytoplasmique ; pour cette raison, ils sont considérés comme étant non-apoptotiques et représentent un mécanisme de contrôle de l'apoptose induite par TRAIL (Figure 4). L'ostéoprotégérine a été récemment décrit comme étant un récepteur soluble pouvant se lier à TRAIL et inhiber son action (Emery et *al.*, 1998).

6. 1. 3. Régulation de la voie apoptotique médiée par les récepteurs

L'apoptose médiée par cette voie est régulée notamment au niveau de l'assemblage du complexe DISC ou au niveau de son activité. La protéine FLIP ou «Flice-inhibitory protein» est une isoforme de la caspase-8 contenant 2 domaines DED mais pas de site catalytique. Elle agit en entrant en compétition avec les caspases-8 et -10 et en empêchant leur recrutement au niveau du DISC (Figure 4). Deux isoformes de FLIP ont été identifiées, la forme cellulaire longue et la forme cellulaire courte. Toutes deux sont capables de bloquer l'induction de l'apoptose mais il semblerait qu'elles agissent différemment au niveau du clivage de la caspase-8 (Krueger et *al.*, 2001). La surexpression de FLIP induit une résistance à l'apoptose médiée par les récepteurs. De plus, il a été montré que FLIP pouvait induire l'activation du facteur de transcription NF- κ B ainsi que la voie de signalisation impliquant ERK (« extracellular signal-regulated protein kinase ») (Kataoka et *al.*, 2000). Par conséquent ces protéines agissent comme des protéines anti-apoptotiques.

Un autre type de régulation se fait au niveau du récepteur lui-même. En effet, la plupart des récepteurs du TNF existent également sous forme soluble suite à un épissage alternatif ou à une protéolyse. Ces formes solubles entrent donc en compétition vis-à-vis de la forme transmembranaire du récepteur avec le ligand, bloquant ainsi le recrutement de protéines adaptatrices et par conséquent l'activation des procaspases initiatrices. De plus, ces formes solubles possèdent un domaine PLAD pour «preligand assembly domain», domaine nécessaire à la trimérisation de ces récepteurs mais bien distinct du domaine de liaison au ligand. Ceci suggère alors une éventuelle activité des récepteurs indépendante de la fixation du ligand. La découverte de ce domaine PLAD par Papoff *et al.* (1999) et Siegel *et al.* (2000) remet en cause le modèle d'assemblage des récepteurs sous forme trimérique suite à l'homotrimérisation du ligand décrit par Orlinick *et al.* en 1997. Papoff *et al.* (1999) et Siegel *et al.* (2000) ont montré que Fas pouvait s'assembler en trimère indépendamment de la fixation de son ligand, mais que cet assemblage était nécessaire à la liaison du ligand.

6. 1. 4. Amplification de la voie des récepteurs de mort

La voie classique des récepteurs de mort se produit dans les cellules exprimant la procaspase-8 de façon importante, mais dans les autres types cellulaires, cette voie doit être amplifiée par la voie mitochondriale grâce au recrutement de la protéine Bid par la caspase-8 (Figure 4). En effet, la caspase-8 clive Bid, un membre de la famille Bcl-2, au niveau N-terminal permettant l'exposition de son domaine BH3. La translocation rapide de la forme tronquée de Bid du cytosol vers la membrane mitochondriale suggère un mécanisme spécifique similaire à celui de l'association de ligand à un récepteur (Wang *et al.*, 1996b). Les protéines assimilées à des récepteurs pourraient être les protéines Bax ou Bcl-2. L'exposition du domaine BH3 permet à Bid de s'insérer dans la membrane mitochondriale et de se lier à Bax ou à d'autres protéines pro-apoptotiques. Bid provoque ainsi la libération du cytochrome c induisant l'activation de la caspase-9 puis de la caspase-3.

Une autre protéine faisant la jonction entre les deux voies a été identifiée. Il s'agit de la protéine BAR (« bifunctional apoptosis regulator »), protéine régulatrice capable de s'associer aux molécules anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-X_L par un domaine SAM (« sterile alpha motif ») ainsi qu'à la caspase-8 par le domaine DED (Zhang *et al.*, 2000). Une autre voie de signalisation de Fas indépendante de la caspase-8 a été suggérée mettant en évidence l'implication de la sérine-thréonine kinase RIP («receptor-interacting protein») (Pitti *et al.*, 1996).

6. 2. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

6. 2. 1. La voie mitochondriale dépendante des caspases

De nombreux stimuli, comme les agents thérapeutiques, les radiations UV, les molécules du stress, le manque de facteurs de croissance, semblent induire l'apoptose par la voie mitochondriale ou voie indépendante des récepteurs de mort.

La mitochondrie est un organite constitué d'une membrane externe, d'un espace transmembranaire, d'une membrane interne et d'une matrice. La membrane interne possède de nombreuses protéines comme l'ATP synthase, la chaîne de transport des électrons et le transporteur de nucléotide adénylique (ou «Adenine Nucleotide Translocator», ANT). Dans des conditions physiologiques normales, ces trois protéines permettent la formation d'un gradient électrochimique (ou potentiel membranaire, $\Delta\Psi_m$) par la chaîne respiratoire. L'espace intermembranaire contient le cytochrome c, certaines procaspases (-2, -3 et -9), les protéines Smac/Diablo, AIF («Apoptosis-Inducing Factor») et endonucléase G. La membrane externe possède un canal anionique voltage-dépendant (VDAC). La perméabilisation de celle-ci par le ou les processus décrit(s) au paragraphe 5.2. provoque alors le relargage de toutes ces protéines dans le cytoplasme et la perméabilisation de la membrane interne conduit à un changement du potentiel membranaire mitochondrial. La libération de cytochrome c est l'une des étapes majeures dans l'induction de l'apoptose par la mitochondrie (Figure 5).

☞ *Le cytochrome c*

Le cytochrome c est codé par un gène nucléaire et est synthétisé sous forme de précurseur qui est incapable de participer à l'induction de l'apoptose. Le précurseur est importé dans la mitochondrie où il subit une maturation. La protéine devenue globulaire se lie à un hème grâce à la cytochrome c lyase. Le cytochrome c est séquestré au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial où il exerce sa fonction physiologique de transporteur d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire (Ravagnan et *al.*, 2002). En 1996, Liu et *al.* ont montré que le cytochrome c était nécessaire à l'activation de la caspase-3. D'autres études ont confirmé cela en précisant que le relargage du cytochrome c et l'activation des caspases étaient bloqués par la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Kluck et *al.*, 1997 ; Yang et *al.*, 1997). Il est désormais établi que le cytochrome c relargué dans le cytosol est à l'origine de la formation de l'apoptosome. Tout récemment, l'invalidation du gène codant pour le cytochrome c a confirmé l'importance cruciale de cette protéine dans l'apoptose. Ces études montrent qu'aucune autre protéine cellulaire ne peut remplacer le cytochrome c pour l'oligomérisation d'Apaf-1 (ou «Apoptotic protease-activating factor») et pour l'activation de la caspase-3, induite par un stress cellulaire ou par un agent ciblant

la mitochondrie (Li et *al.*, 2000b).

Dans la majorité des cas, la libération du cytochrome c est dépendante de l'activité des caspases (Bossy-Wetzel et *al.*, 1998). Le mécanisme par lequel le cytochrome c est relargué, ainsi que sa cinétique de libération a été le sujet de nombreuses controverses. Le relargage du cytochrome c semble être dépendant de la présence de Bax ou Bak dans la membrane externe mitochondriale. Concernant la cinétique de libération du cytochrome c, l'équipe de Doug Green a démontré que celle-ci se faisait rapidement et en une seule fois (Goldstein et *al.*, 2000). Il semble que la mitochondrie joue le rôle d'intégrateur des différents signaux et qu'une fois le seuil atteint, la totalité du cytochrome c est libérée en une seule étape. Cependant, cette observation ne peut pas être généralisée. En effet, selon le stimulus apoptotique, selon le type cellulaire utilisé et selon le niveau de polarisation de la membrane mitochondriale, seulement quelques mitochondries libèrent le cytochrome c en quantité suffisante pour induire l'activation des caspases. Cette observation laisse supposer qu'il existe un lien entre le relargage du cytochrome c et la chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Goldstein et *al.* (2000) ont montré que le relargage du cytochrome c se faisait avant la chute du $\Delta\Psi_m$ alors que Heiskanen et *al.* (1999) montrent que ces deux évènements se font simultanément. Cependant, si le relargage du cytochrome c se fait avant la chute du $\Delta\Psi_m$, cela suppose que la mitochondrie maintienne son $\Delta\Psi_m$ grâce à un pool de cytochrome c resté lié à la chaîne respiratoire. Il existerait donc deux pools de cytochrome c dans la mitochondrie, une grande quantité de cytochrome c se trouverait sous forme libre dans l'espace intermembranaire et une petite quantité permettrait d'assurer la respiration mitochondriale lors du relargage du premier pool afin de maintenir la production d'ATP nécessaire à la formation de l'apoptosome (Martinou et *al.*, 2000).

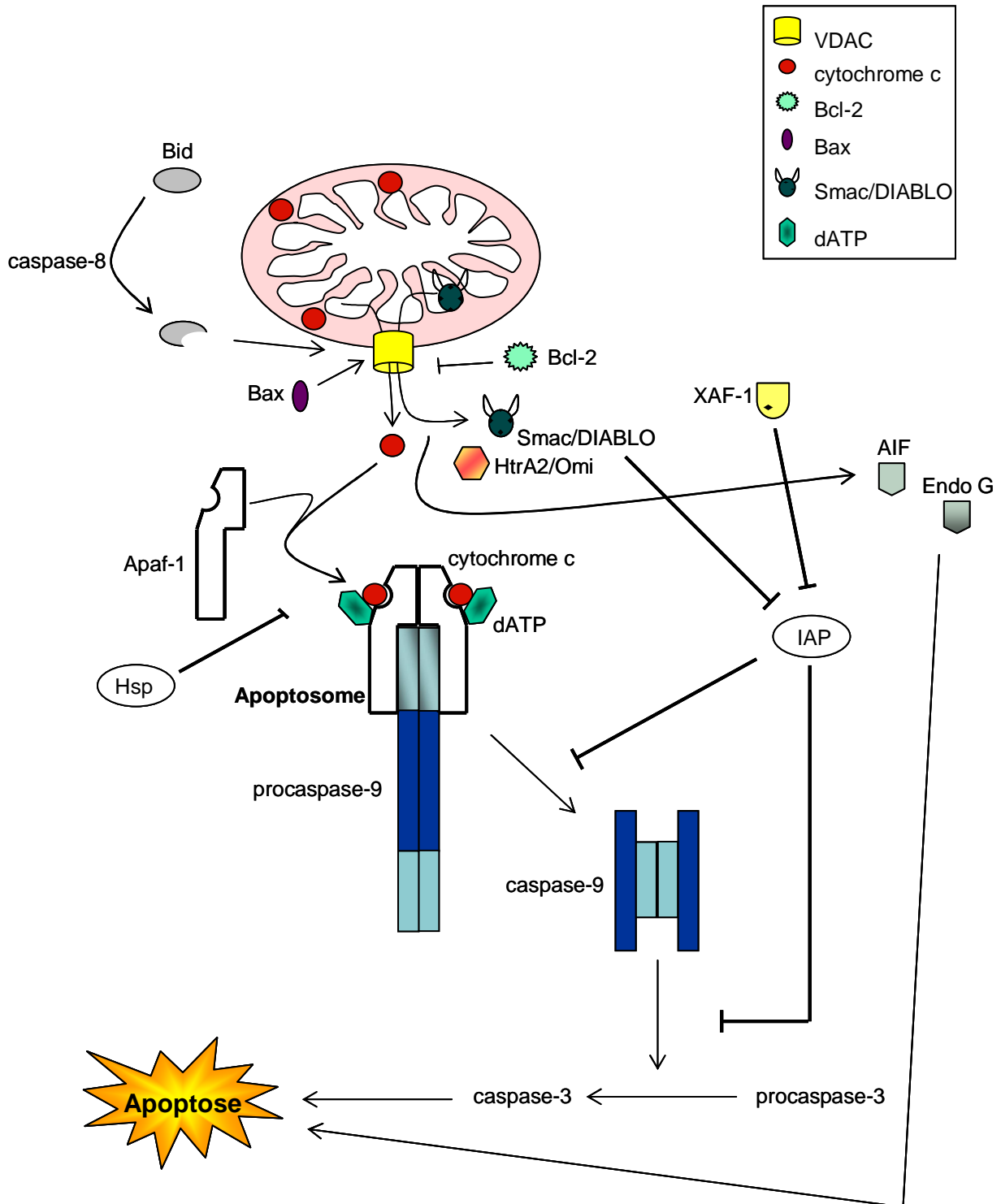


Fig. 5 : La voie mitochondriale (d'après Ravagnan et al., 2002)

☞ *La protéine Apaf-1*

Apaf-1 est une protéine d'environ 130 kDa comprenant un domaine CARD dans la partie aminoterminal, une région ayant une forte homologie avec *Ced-4* et un domaine C-terminal contenant plusieurs répétitions WD-40 impliquées dans les interactions protéines-protéines (Cain et *al.*, 2002). Les répétitions WD-40 sont nécessaires à la liaison au cytochrome c mais ne sont pas suffisantes. Le domaine WD joue également un rôle important dans le recrutement de la procaspase-3. Le domaine CARD d'Apaf-1 n'est pas exposé dans des conditions normales et ne peut donc pas interagir avec la caspase-9 ; en revanche en présence d'ATP et de cytochrome c, Apaf-1 change de conformation et peut interagir avec la caspase-9 grâce à l'exposition de CARD (Li et *al.*, 1997) (Figure 5). La partie centrale homologue à *Ced-4* possède un domaine semblable à un domaine ATPase et l'hydrolyse de l'ATP paraît être nécessaire à la formation de l'apoptosome (Hu et *al.*, 1999). Quatre isoformes de Apaf-1 ont été décrites : Apaf-1 (Apaf-1S), Apaf-1XL/Apaf-1L-WD13, Apaf-1LN/Apaf-1L et Apaf-1LC/Apaf-1L. Les isoformes diffèrent par l'insertion d'une séquence de 43 acides aminés dans le domaine WD (Apaf-1LC/Apaf-1L) ou par l'insertion de 11 acides aminés après le domaine CARD (Apaf-1LN/Apaf-1L) ou par l'insertion des deux séquences (Apaf-1XL/Apaf-1L-WD13). L'insertion des 43 acides aminés semble nécessaire à l'activation de Apaf-1 (Benedict et *al.*, 2000).

☞ *Rôle de l'ATP dans l'apoptose*

L'intégrité de la membrane mitochondriale est souvent altérée lors de l'apoptose induite par la mitochondrie ce qui provoque une réduction de la production d'ATP accompagnée d'une libération de facteurs apoptotiques dans le cytosol. De plus, l'apoptose est un processus nécessitant de l'énergie notamment pour la formation de l'apoptosome (Figure 5), pour la condensation de la chromatine, pour la fragmentation de l'ADN mais aussi pour le transport de molécules vers le noyau (Kass et *al.*, 1996 ; Richter et *al.*, 1996). L'ATP peut alors être produit par la glycolyse anaérobie lorsque le potentiel mitochondrial de la cellule est altéré. La déplétion en ATP peut résulter d'une libération importante de calcium induite par des radicaux libres oxygénés (Chakraborti et *al.*, 1999).

☞ *La formation de l'apoptosome*

L'apoptosome impliqué dans l'apoptose induite par la mitochondrie est constitué d'Apaf-1, du cytochrome c et de la procaspase-9, c'est donc un complexe protéique d'une taille importante (700 kDa) (Figure 5). Apaf-1 s'associe à la procaspase-9 et à deux molécules de cytochrome c (Cain et *al.*, 2001). La concentration de K^+ intracellulaire (physiologique) abolit l'activation des

caspace en inhibant la formation de l'apoptosome mais cette inhibition peut être levée en présence d'une grande quantité de cytochrome c ; le taux de K^+ intracellulaire semble contrôler l'activation des caspases afin qu'elles ne soient pas activées lors d'un relargage accidentel de cytochrome c (Cain et *al.*, 2001). Le cytochrome c facilite la liaison de l'ATP à Apaf-1 probablement en favorisant l'exposition du domaine de liaison par changement de la conformation de Apaf-1. L'oligomérisation d'Apaf-1 est un événement rapide et l'apoptosome formé semble stable. Il a été décrit que la caspase-9 clivée était présente aussi bien dans l'apoptosome que dans le cytoplasme, mais la caspase-9 réellement active est celle liée à l'apoptosome (Rodriguez et Lazebnik, 1999).

6. 2. 2. Régulation des voies dépendantes des caspases

☞ *Les protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAPs*

Les IAPs sont des protéines qui inhibent la mort cellulaire en empêchant le clivage des caspases et donc leur activité par simple liaison à ces caspases (Fesik et Shi, 2001) (Figure 5). Elles ont initialement été décrites comme des inhibiteurs viraux mais à la différence des deux autres protéines virales que sont la CrmA du virus bovin de la variole et la protéine p35 de baculovirus, les IAPs sont les seules protéines ayant des homologues chez les mammifères. Les IAPs sont constituées d'un ou plusieurs domaines BIR pour «baculoviral IAP repeat» indispensables à leur activité anti-apoptotique puisqu'ils permettent la liaison aux caspases. Chaque domaine BIR possède des fonctions distinctes et une spécificité de liaison aux caspases (Verhagen et *al.*, 2001). Le domaine BIR2 inhibe les caspases-3 et -7 alors que le domaine BIR3 inhibe l'activité de la caspase-9 (Ekert et *al.*, 2001). XIAP («X-linked inhibitor-of-apoptosis protein») est une des molécules les mieux connues de cette famille ; elle peut inhiber l'activation de la caspase-9 initiateur ainsi que celle des caspases effectrices -3 et -7. En effet, elle peut se lier à la caspase-9 active et l'empêcher d'agir sur la procaspase-3 ou encore séquestrer la procaspase-3 au niveau de l'apoptosome par simple liaison, ce qui bloque la voie apoptotique. Les IAPs peuvent elles-mêmes être régulées de manière négative.

☞ *Les inhibiteurs des IAPs*

Smac («Second Mitochondria-derived Activator of Caspase») et son homologue DIABLO («Direct IAP Binding protein with Low pI») sont des protéines identifiées récemment et ayant des similitudes avec les protéines Grim, Reaper et HID connues chez la drosophile. Ces dernières bloquent l'activité anti-apoptotique des IAPs, tout comme Smac/DIABLO chez les mammifères (Du et *al.*, 2000 ; Verhagen et *al.*, 2000) (Figure 5). La protéine Smac/DIABLO est fortement exprimée dans le coeur, le foie, les reins, la rate et dans plusieurs lignées cancéreuses. Elle est

synthétisée dans le cytoplasme sous forme d'un précurseur de 239 acides aminés et est exportée dans la mitochondrie grâce à un signal de localisation mitochondrial (MLS) situé côté N-terminal (55 acides aminés). Une fois dans ce nouveau compartiment, le signal de localisation est clivé et la protéine acquiert son activité pro-apoptotique en s'homodimérisant (Chai et *al.*, 2000). Sa libération de la mitochondrie est induite par de nombreux stimuli apoptotiques et contrôlée par les membres de la famille Bcl-2 (Adrain et *al.*, 2001) ; elle permet l'activation des caspases par inhibition des IAPs. Smac/DIABLO est la première protéine identifiée inhibant les fonctions des IAPs, elle est également liée à la voie des récepteurs de mort (Srinivasula et *al.*, 2000). Smac/DIABLO interagit avec les IAPs par liaison au troisième domaine BIR (BIR3) de la protéine XIAP, de cette façon elle empêche la liaison des IAPs aux caspases-3, -7 et -9 (Srinivasula et *al.*, 2001).

XAF-1 («XIAP associated factor 1») est une autre protéine capable d'activer les caspases en inhibant les IAPs (Figure 5). Contrairement à Smac/DIABLO, c'est une protéine nucléaire active continuellement qui possède un domaine en doigts de zinc lui permettant d'interagir directement avec XIAP. De cette façon, XIAP est séquestrée dans le noyau, la cellule devient alors plus sensible à un signal de mort. Son expression semble être réduite dans certaines lignées cancéreuses (Liston et *al.*, 2001).

Smac et XAF-1 ne sont pas les seules protéines inhibitrices connues des IAPs. Récemment, la protéine Omi/HtrA2 (« high temperature requirement protein A2 ») a été identifiée comme étant une nouvelle protéine inhibitrice (Verhagen et *al.*, 2001 ; Martins et *al.*, 2002) (Figure 5). Le précurseur de HtrA2 est une protéine de 50 kDa dont la partie N-terminale contient le MLS. Celui-ci est clivé après importation dans la mitochondrie, générant alors une protéine de 36 kDa. HtrA2 appartient à la famille des sérine protéases qui est bien conservée au cours de l'évolution. Il a été montré récemment que la protéine bactérienne HtrA possédait un rôle de molécule chaperonne à des températures normales et un rôle de protéase à fortes températures (Spiess et *al.*, 1999). Dans les cellules normales humaines, HtrA2 est confinée dans l'espace intermembranaire mitochondrial mais, sous induction apoptotique avec différents agents comme la staurosporine, TRAIL, ou des irradiations UV, elle est relarguée dans le cytosol. Dans le cytosol, HtrA2 se lie aux IAPs comme XIAP de la même façon que Smac/DIABLO facilitant ainsi l'activation des caspases. HtrA2 induit l'apoptose par deux mécanismes différents, le premier par inhibition des IAPs permettant l'activation des caspases, le second par l'activité sérine protéase indépendante de l'activité caspase (Suzuki et *al.* 2001 ; Hegde et *al.* 2002).

☞ *Autres protéines régulatrices*

D'autres complexes protéiques impliqués dans la régulation du signal apoptotique existent dans d'autres « lieux stratégiques » de la cellule, comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, le noyau ou les lysosomes (Ferri et Kroemer, 2001). Comme le montre l'activité de la protéine XAF-1 récemment décrite, le noyau joue également un rôle dans la régulation de l'apoptose et ne fait pas que subir les événements mis en oeuvre pour éliminer la cellule. Une autre protéine nucléaire DEDD («DED-containing DNA-binding protein») exerce son activité anti-apoptotique en inhibant l'activation de la caspase-6 ou en bloquant la transcription. Cette protéine semble être modulée par une autre protéine nommée DEDAF pour «DED-associated factor», cette dernière possédant également la particularité de se lier à FADD, à la caspase-8 ou -10 favorisant la formation du DISC (Zheng et *al.*, 2001).

Les membres de la famille Bcl-2 peuvent également réguler la voie mitochondriale en agissant sur le relargage du cytochrome c (Bcl-2, Bax, Bid, Bak) (Figure 5) mais aussi en se liant à Apaf-1 (Bcl-X_L) (Hu et *al.*, 1998).

Les protéines de choc thermique ou Hsp sont aussi des inhibiteurs de l'apoptose. Différentes études montrent qu'Hsp-70 et Hsp-90 peuvent se lier au domaine CARD de Apaf-1, l'empêchant ainsi de s'oligomériser et d'activer la procaspase-9 (Saleh et *al.*, 2000 ; Pandey et *al.*, 2000). Hsp-27 bloque l'oligomérisation de Apaf-1 en se liant au cytochrome c (Bruey et *al.*, 2000) (Figure 5).

6. 2. 3. La voie mitochondriale indépendante des caspases

Plusieurs protéines contenues dans l'espace intermembranaire peuvent induire l'apoptose directement sans activation des caspases. C'est le cas du facteur d'induction apoptotique (AIF) et de l'endonucléase G (endo G) qui, une fois libérés de la mitochondrie, sont transloqués dans le noyau provoquant une condensation de la chromatine et une coupure de l'ADN générant de larges fragments d'ADN (Figure 5).

☞ *La protéine AIF*

Le facteur AIF a été identifié il y a plusieurs années par l'équipe de Kroemer mais son clonage est récent (Susin et *al.*, 1999). Le gène de l'AIF est localisé sur le chromosome X et code pour une protéine de 57 kDa. L'AIF est une flavoprotéine constituée de trois domaines : la

séquence MLS située du côté amino-terminal, une séquence de 27 acides aminés et un domaine à activité oxydoréductase carboxy-terminal de 485 acides aminés (Lorenzo et *al.*, 1999). Le précurseur de l'AIF (67 kDa) est synthétisé dans le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie (Susin et *al.*, 1999). Une fois dans l'espace intermembranaire, la séquence MLS est clivée, la protéine change de conformation tout en incorporant le groupement prosthétique FAD («Flavin Adenin Dinucleotide»). C'est une protéine bifonctionnelle ayant probablement une activité oxydoréductase et un rôle pro-apoptotique (Ye et *al.*, 2002). Après exposition de la cellule à un stimulus pro-apoptotique, l'AIF se transloque de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau. Ce phénomène précède généralement le relargage du cytochrome c. Le phénomène par lequel l'AIF se transloque vers le cytosol est encore inconnu. Le transport vers le noyau pourrait se faire grâce à une séquence de localisation nucléaire.

Les effets de l'AIF en tant que molécule apoptogène ont été étudiés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. *In vitro*, il a été montré que l'AIF génère une condensation périphérique de la chromatine ainsi qu'une fragmentation de l'ADN en larges fragments de 50 kpb, ceci par interaction directe avec l'ADN sans spécificité de séquence (Ye et *al.*, 2002). Cette interaction se fait surtout par son domaine carboxy-terminal ; elle peut être modulée par le niveau de translocation dans le noyau et est plus importante lors de la phase de condensation que lors de la phase tardive de formation des corps apoptotiques. De plus, l'AIF provoque en présence d'extraits cytosoliques une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et par conséquent la libération du cytochrome c et de la procaspase-9 ceci grâce à un cofacteur cytosolique (Susin et *al.*, 1999). *In vivo*, les mêmes observations (condensation, fragmentation, libération de protéines mitochondriales) ont été observées. De plus, l'AIF amplifierait son propre phénomène de libération une fois dans le cytosol. En outre, les effets de l'AIF sont abolis par la surexpression de Bcl-2 et sont les mêmes dans des cellules ayant ou non des activités caspases : l'AIF agit donc indépendamment des caspases.

L'AIF est inhibé par une protéine endogène, Hsp70 (Ravagnan et *al.*, 2001). Ceci a été montré *in vitro* sur la condensation chromatinienne et *in vivo* au niveau nucléaire et mitochondrial par surexpression de Hsp70. L'action d'Hsp70 sur l'apoptose s'explique premièrement par l'inhibition de la formation de l'apoptosome puisque Hsp70 se lie à Apaf-1. Mais une surexpression de Hsp70 dans des cellules n'exprimant pas de caspases prévient également de la mort cellulaire ; ceci suggère donc que Hsp70 peut se lier à d'autres protéines comme l'AIF. La liaison de Hsp70 à Apaf-1 ou à AIF semble se faire par le domaine de liaison à l'ATP présent sur Hsp70, sans intervention de l'activité chaperonne de Hsp70.

Beaucoup d'évènements concernant l'AIF sont encore inconnus, notamment son mode d'action sur l'ADN, son activité d'oxydoréductase, la transduction du signal permettant sa libération. La condensation de l'ADN observée lors de l'apoptose pourrait être expliquée par l'interaction directe de l'AIF sur l'ADN. En effet, cette interaction pourrait modifier la structure de la chromatine et favoriser l'action des nucléases comme la topoisomérase II ou la cyclophiline qui génèrent elles aussi des fragments de 50 kpb similaires à ceux obtenus après induction de l'AIF. Ces fragments correspondent à des structures de type boucle au niveau de la chromatine.

☞ *L'endonucléase G*

L'endonucléase G est une nucléase mitochondriale non-spécifique très conservée chez les eucaryotes (Li et *al.*, 2001). Elle est codée par un gène nucléaire et probablement impliquée dans la réplication du génome mitochondrial. Pendant l'apoptose, l'endonucléase G est relarguée de la mitochondrie et transloquée dans le noyau. Elle digère l'ADN en absence d'activité caspase et en absence de la nucléase caspase-dépendante DFF/CAD (van Loo et *al.*, 2001). L'endonucléase G pourrait agir avec l'exonucléase et la DNase I dans le noyau pour générer les fragments d'ADN de haut poids moléculaire (Widlak et *al.*, 2001) mais elle peut également générer des fragments oligonucléosomiques (Samejima et *al.*, 2001).

6. 3. La voie du réticulum endoplasmique

Différentes fonctions importantes pour la cellule comme les modifications post-traductionnelles, l'assemblage et la conformation des protéines nouvellement synthétisées, se font dans le réticulum endoplasmique (RE) mais celui-ci sert également de réserve de calcium cellulaire. Ces fonctions sont vitales pour la survie de la cellule et la moindre modification altérant une de ses fonctions entraîne des dommages cellulaires irréversibles et conduit à l'apoptose. Plusieurs conditions peuvent conduire à un « stress du RE », comme l'inhibition de la glycosylation des protéines, la diminution de la formation des liaisons disulfides, la déplétion du calcium contenu dans le lumen du RE, les altérations du transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi, l'expression de protéines anormalement conformées. Une voie de signalisation contrôle l'accumulation de ces dernières au niveau du RE (Oyadomari et *al.*, 2002).

La cellule lutte contre le stress au niveau du RE de plusieurs façons, quatre réponses au stress ont été identifiées jusqu'à présent. La première implique la régulation positive de gènes codant pour des protéines chaperonnes au niveau du RE afin d'augmenter l'activité de repliement des protéines et d'éviter l'agrégation des protéines. La deuxième réponse consiste à diminuer la traduction des protéines afin de diminuer le taux de protéines dans le RE et par conséquent

empêcher l'accumulation de protéines non conformées dans le RE. La troisième réponse de la cellule est de dégrader les protéines anormalement conformées par le mécanisme appelé ERAD pour «ER-associated degradation». La dernière réponse de la cellule face à un fort stress du RE est d'induire l'apoptose. Nous n'aborderons, ici, que cette dernière réponse.

Plusieurs voies apoptotiques peuvent être induites après un stress du RE. La première est l'induction transcriptionnelle de CHOP (pour «C/EBP homologous protein», nommée également Gadd153), un membre de la famille des facteurs de transcription C/EBP (Ron et Habener, 1992). CHOP est peu ou pas exprimé dans des conditions physiologiques normales et est fortement induit en réponse à un stress du réticulum. Sa surexpression conduit à un arrêt de la croissance cellulaire et à l'apoptose (Gotoh et *al.*, 2002). La transcription du gène CHOP est induite par les voies de l'endonucléase IRE1 (« high inositol-requiring ») (Wang et *al.*, 1998) et du facteur de transcription ATF6 (« activating transcription factor ») (Gotoh et *al.*, 2002) (Figure 6). Dans des conditions normales, la protéine chaperonne BiP (« heavy-chain-binding protein ») se lie à IRE1 et maintient cette protéine sous forme inactive. Après un stress au niveau du RE, BiP se lie aux protéines mal formées et se dissocie donc de IRE1. De cette façon, IRE peut s'oligomériser, s'auto-phosphoryler et donc s'activer (Bertolotti et *al.*, 2000) (Figure 6). Récemment, ATF6 a été décrit comme un facteur de transcription spécifique du mécanisme de transduction. C'est une protéine transmembranaire localisée dans le RE et activée par protéolyse (Yoshida et *al.*, 2000). Le stress au niveau du RE induit la translocation de ATF6 vers l'appareil de Golgi (Chen et *al.*, 2002) où elle est clivée. Le fragment N-terminal cytosolique contenant un domaine ZIP est transporté vers le noyau où il se lie à l'élément de réponse ERSE (« ER stress response element ») associé au facteur de transcription NF-Y (Figure 6). De plus, CHOP peut être induit par la voie de la sérine/thréonine kinase PERK (« PKR-like ER kinase ») grâce au facteur de transcription ATF4 (Oyadomari et *al.*, 2002). CHOP module des gènes impliqués dans l'induction du stress du RE en se liant à ATF3 (Chen et *al.*, 1996) ou au complexe AP-1 (Ubeda et *al.*, 1999). Le gène de l'anhydrase carbonique VI fait partie des gènes de réponse à CHOP et semble augmenter la concentration intracellulaire de protons ce qui diminue le pH intracellulaire (Sok et *al.*, 1999). Il a été décrit que CHOP diminuait l'expression de la protéine Bcl-2 et augmentait la production de radicaux libres (McCullough et *al.*, 2001). D'autres gènes impliqués directement ou non dans l'induction de l'apoptose sont en cours d'étude.

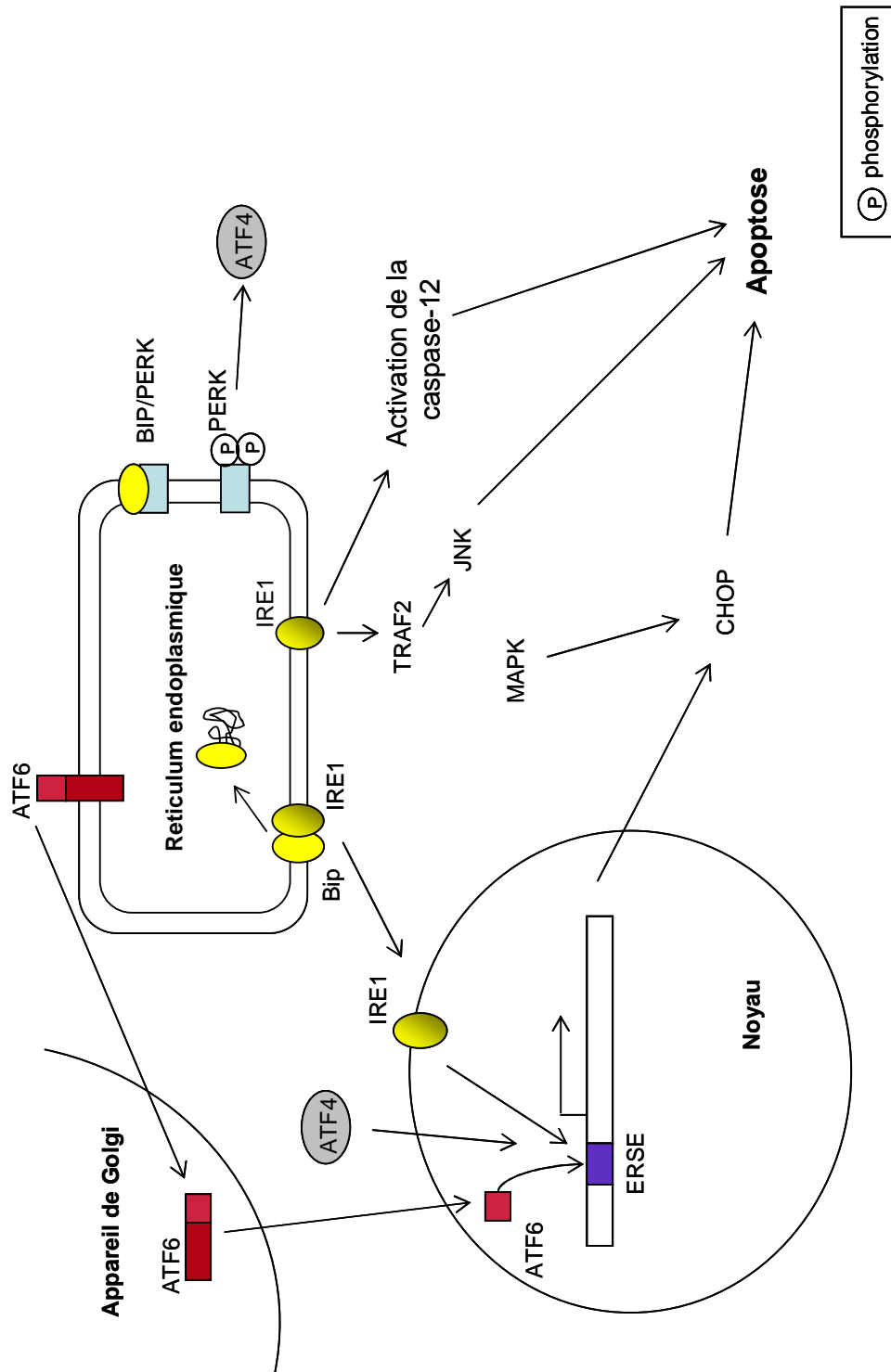


Fig. 6 : Apoptose induite par un stress du RE (d'après Oyadomari et *al.*, 2002)

La seconde voie d'induction de l'apoptose met en jeu la voie de transduction JUN-kinase (JNK). JNK constitue une famille de protéines qui régulent l'expression de certains gènes et qui participent au choix entre apoptose et survie cellulaire après un stress. Le stress du RE induit JNK par la protéine IRE1 (Urano *et al.*, 2000) (Figure 6). Le domaine cytosolique kinase de IRE1 se lie à TRAF2 qui est une protéine adaptatrice, ce qui lie les récepteurs membranaires au stress du RE pour l'activation de JNK.

L'activation de la caspase-12 est la troisième voie apoptotique induite par un stress du RE. La caspase-12 est localisée au niveau de la membrane du RE côté cytosolique et est activée par un stress au niveau du RE (Figure 6). Elle ne semble pas être activée par la voie des récepteurs de mort ou par la voie mitochondriale. Il a été décrit que la caspase-12 était induite par l'activation de la m-calpaïne. C'est une endopeptidase cytosolique activée par le calcium qui induit le clivage de la procaspase-12 ainsi que le clivage de Bcl-X_L conduisant à l'activation de la caspase-12 et à l'inactivation de Bcl-X_L (Nakagawa et Yuan, 2000). Pendant un stress du RE, la translocation de la caspase-7 cytosolique a été décrite par Rao *et al.* (2001) ; celle-ci clive alors la procaspase-12 au niveau de son pro-domaine. De plus, il a été décrit que IRE1 actif recrutait TRAF2 qui interagit alors avec la procaspase-12 et permet son activation (Yoneda *et al.*, 2001). Il semblerait que JNK agisse comme partenaire dans l'activation de la caspase-12 par IRE1/TRAF2.

7. Rôle du facteur de transcription NF-κB

Le facteur de transcription NF-κB («Nuclear Factor-κB») est présent dans le cytoplasme de nombreuses cellules ; il est un régulateur de la réponse immunitaire, de la prolifération cellulaire et du signal de survie pendant un stress. NF-κB intervient le plus souvent en s'opposant à l'apoptose en stimulant, par exemple, l'expression des protéines inhibitrices des caspases, les IAPs ou les homologues de Bcl-2.

7. 1. Activation de NF-κB

NF-κB agit comme facteur de transcription sous forme de dimère. Les dimères peuvent être constitués de différentes sous-unités p50, p52, c-Rel, RelB, p65 (RelA) mais le dimère le plus fréquent est constitué de p50/p65 (Baldwin, 1996). Dans les cellules non stimulées, NF-κB est conservé sous forme inactive dans le cytoplasme par interaction avec des protéines inhibitrices de la famille I-κB. Cette famille est composée de plusieurs protéines comme I-κBα, I-κBβ, I-κBε, I-κBγ (p105), I-κBδ (p100) : I-κBα étant la plus connue (Baldwin, 1996).

L'activation de nombreux récepteurs de surface comme les récepteurs du TNF ou de l'IL-1 ou la production de différents stress cellulaires (drogues, radiations, radicaux libres) provoquent la phosphorylation de I- κ B α sur les sérines 32 et 36 (Brown *et al.*, 1995) puis l'ubiquitinylation et la dégradation de I- κ B α par le protéasome 26S. De cette façon, NF- κ B est libéré et le dimère se transloque dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles (Karin, 1999 ; Pahl, 1999) (Figure 7). Le complexe de protéines kinases IKK (I- κ B Kinase) qui phosphoryle I- κ B α contient deux sous-unités catalytiques qui sont des sérine kinases spécifiques d'I- κ B, IKK α (IKK1) et IKK β (IKK2), et une sous-unité régulatrice IKK γ /NEMO («NF- κ B Essential Modulator») (Karin et Lin, 2002) (Figure 7). Les activités de ces kinases sont elles-mêmes régulées par des kinases comme NIK («NF- κ B-inducing Kinase») et MEKK1 («MAP Kinase Kinase Kinase1»).

D'autres activateurs de NF- κ B ont été identifiés comme la sérine/thréonine kinase RIP contenant un domaine DED et les membres de la famille TRAF qui médient la réponse cellulaire induite par quelques récepteurs du TNF (TNF-R1, TNF-R2, CD27, CD30, CD40, CD95 et la lymphotoxine β). En effet, le récepteur de l'IL-1 utilise de nombreux adaptateurs, dont l'ubiquitine ligase TRAF6. TRAF6 interagit avec des protéines du protéasome qui catalysent sa poly-ubiquitinylation. Cette ubiquitinylation est nécessaire à l'activation des IKK et conduit par conséquent à la translocation de NF- κ B dans le noyau ; l'ubiquitinylation d'une protéine n'entraîne donc pas automatiquement sa dégradation mais peut, au contraire, l'activer (Deng *et al.*, 2000).

7. 2. Les principaux rôles de NF- κ B

7. 2. 1. Rôle dans le système immunitaire et l'inflammation

NF- κ B régule la réponse inflammatoire, la réaction immunitaire et la croissance cellulaire en induisant l'expression de gènes spécifiques. Les gènes régulés par ce facteur de transcription sont ceux codant pour les cytokines, les chimiokines, les récepteurs impliqués dans la réaction immunitaire (Figure 7). Les cytokines induites par NF- κ B comme l'IL-1 β et le TNF α peuvent également activer NF- κ B, ainsi par une boucle d'auto-régulation positive elles amplifient la réponse inflammatoire et augmentent la durée de l'inflammation chronique. La voie NF- κ B est importante pour le contrôle de la réponse immunitaire puisqu'elle permet la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes ainsi que la différenciation des lymphocytes T par la régulation de la production de l'IL-2 (Gerondakis *et al.*, 1998). Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans la pathogénèse de maladies inflammatoires chroniques comme l'asthme ou l'arthrite rhumatoïde mais aussi dans l'athérosclérose et la maladie de Crohn par l'induction de gènes codant pour des cytokines.

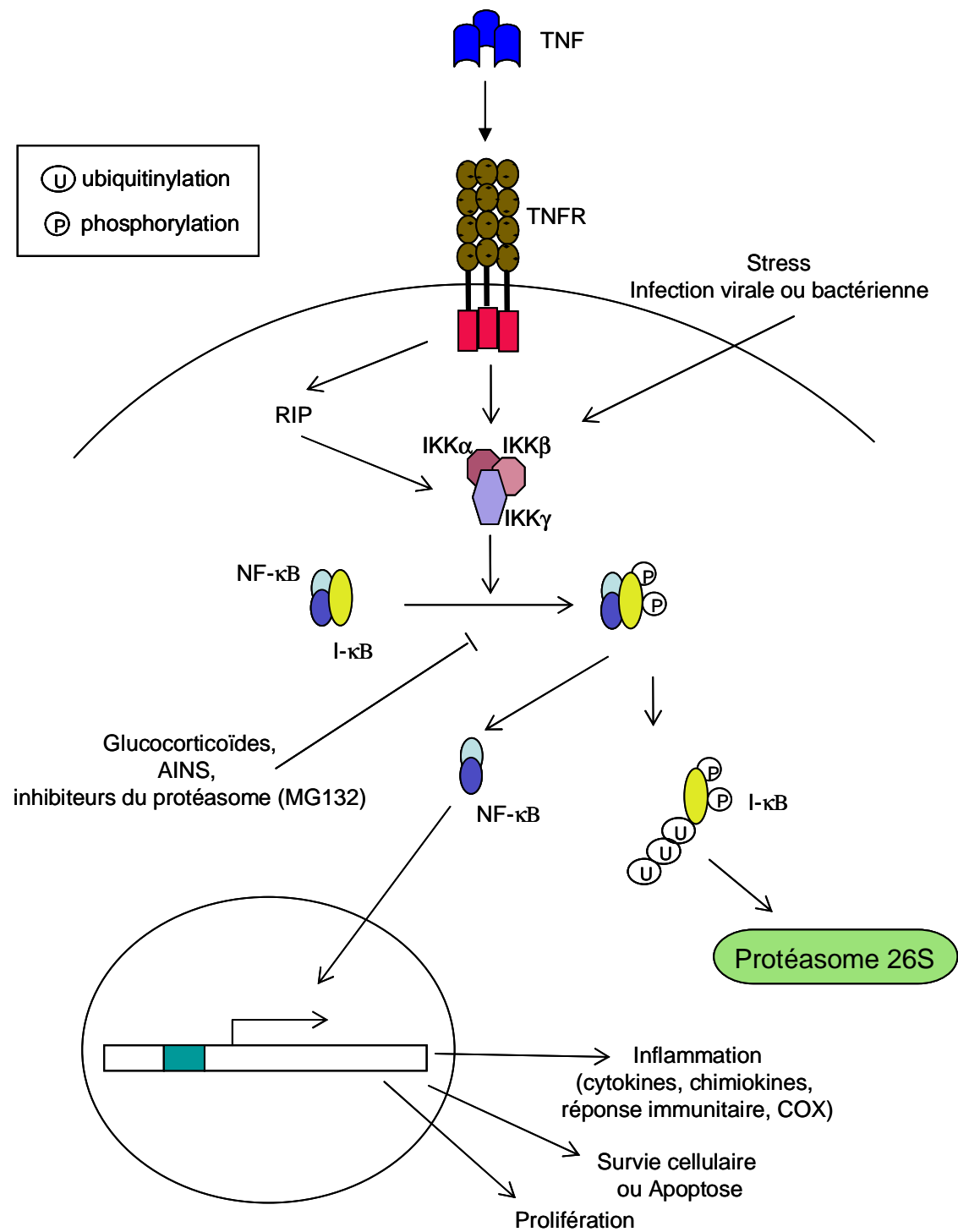


Fig. 7 : Activation et rôles de NF-κB

NF- κ B stimule également l'expression d'enzymes dont les métabolites sont impliqués dans la réaction inflammatoire aiguë comme la NO-synthase et la cyclooxygénase-2 qui génère les prostanoïdes (Pahl, 1999) (Figure 7).

7. 2. 2. Rôle dans la régulation de l'apoptose et de la prolifération

Le facteur NF- κ B est également un médiateur clé de l'induction de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (Barkett et Gilmore, 1999) (Figure 7). NF- κ B a été décrit comme un inhibiteur de l'apoptose principalement induite par le TNF α (Baldwin, 1996). De plus, il a été montré qu'IKK β était indispensable pour la survie cellulaire (Li et *al.*, 1999). Les gènes codant pour les IAPs (c-IAP1, c-IAP, et XIAP), pour FLAP, TRAF-1 et TRAF-2 et pour des homologues de Bcl-2 sont des gènes anti-apoptotiques directement activés par NF- κ B. En activant les IAPs, NF- κ B empêche l'activation des caspases mais il peut aussi induire l'expression de membres de la famille Bcl-2 comme Bcl-X_L qui est anti-apoptotique ou inhiber l'expression de Bax pro-apoptotique (Bentires-Alj et *al.*, 2001). NF- κ B est également fortement activé dans certains cancers (cancers du sein, des ovaires, de la prostate, du côlon) ainsi que dans l'initiation de l'apoptose des neurones dans la maladie d'Alzheimer (Yamamoto et Gaynor, 2001).

Une activation de Hsp70 par l'arsenite diminue l'apoptose dans les cellules endothéliales, cette activation de Hsp70 semble être liée à une diminution de l'activation de NF- κ B. Ceci suggère que NF- κ B activé puisse être pro-apoptotique (DeMeester et *al.*, 1997). Ryan et *al.* (2000) ont montré que l'activation de NF- κ B était essentielle pour que p53 induise l'apoptose. En effet, l'inhibition de l'activité de NF- κ B est corrélée à une absence d'apoptose normalement induite par p53. La daunomycine est un puissant inducteur des facteurs de transcription p53 et NF- κ B. L'accumulation de la protéine p53 dans le noyau est due à une augmentation de sa stabilité et à une induction de son expression. L'augmentation d'expression de p53 est partiellement régulée par NF- κ B lors d'un traitement par la daunomycine puisqu'une inhibition de NF- κ B diminue la transcription de p53 mais ne la bloque pas totalement (Hellin et *al.*, 2000). Lors d'un traitement par le benzo(a)pyrène, p53 est activée transcriptionnellement par l'induction de l'activité de NF- κ B (Pei et *al.*, 1999).

NF- κ B agit également au niveau du cycle cellulaire en activant par exemple la cycline D, régulateur principal de la transition G₁/S, en se fixant directement sur différents sites de son promoteur (Guttridge et *al.*, 1999).

7. 2. 3. Inhibition de la voie NF- κ B

L'activation de NF- κ B dépend essentiellement de la phosphorylation de I- κ B par les kinases IKK, phosphorylation nécessaire pour la dégradation de la sous-unité inhibitrice. Par conséquent, des mutants I- κ B résistants à la dégradation par le protéasome empêchent l'action anti-apoptotique de NF- κ B et augmentent donc l'apoptose lorsqu'elle est induite par le TNF- α , la daunorubicine ou les radiations ionisantes (Wang *et al.*, 1996a).

D'autres molécules comme les glucocorticoïdes agissent grâce à leurs récepteurs spécifiques et diminuent l'expression de gènes impliqués dans la régulation du système inflammatoire (Figure 7). Les glucocorticoïdes peuvent induire l'expression de I- κ B α et favoriser la rétention cytoplasmique de NF- κ B mais ils peuvent également moduler l'activation de ce facteur par interaction directe avec NF- κ B. Une autre hypothèse de régulation pourrait s'expliquer par une compétition entre glucocorticoïdes et NF- κ B vis-à-vis de coactivateurs comme les protéines de liaison à CREB («AMPc regulatory binding protein) (Yamamoto et Gaynor, 2001).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont utilisés dans le traitement de maladies inflammatoires et exercent leur action en inhibant la production de prostaglandines synthétisées par les cyclooxygénases (COX). L'aspirine et le salicylate de sodium inhibent l'activation de NF- κ B en altérant la phosphorylation de I- κ B β (Yin *et al.*, 1998) alors que le sulindac et ses dérivés (sulfide et sulfone de sulindac) agissent sur IKK pour inhiber NF- κ B (Yamamoto *et al.*, 1999) (Figure 7).

Les agents immuno-suppressifs comme la cyclosporine et le tacrolimus agissent différemment dans l'inhibition de NF- κ B. La cyclosporine est un inhibiteur de la calcineurine (sérine/thréonine phosphatase dépendante du calcium et de la calmoduline) qui normalement active NF- κ B. Il semblerait que la cyclosporine agisse également par compétition avec le protéasome 20S empêchant la dégradation de I- κ B. Le tacrolimus bloque la translocation du cytoplasme vers le noyau de la sous-unité c-Rel de NF- κ B (Yamamoto et Gaynor, 2001).

La dégradation de I- κ B par le protéasome est nécessaire à l'activation de NF- κ B, par conséquent l'inhibition du protéasome par des molécules comme les peptides aldéhydiques (MG132, MG101) ou la lactacystine représente une voie d'inhibition de l'activation de NF- κ B importante (Yamamoto et Gaynor, 2001).

Des produits naturels comme les flavonoïdes (quercétine, resvératrol, myricétine) impliqués dans la suppression de l'inflammation ainsi que dans la prévention des cancers exercent leurs effets en inhibant probablement l'activation de NF- κ B et en réduisant l'activation de IKK (Holmes-McNary et Baldwin, 2000). Cependant, la diosgénine, un stéroïde végétal, induit

l'apoptose sur les cellules d'ostéosarcome et active NF- κ B (Moalic *et al.*, 2001a).

7. 3. Le protéasome

L'activation de NF- κ B est fortement régulée par le protéasome puisque celui-ci dégrade I- κ B. Le protéasome est une protéase multimérique qui catalyse la dernière étape de la dégradation des protéines intracellulaires. Il existe sous de multiples formes dans les cellules eucaryotes mais la sous-unité commune à tous les protéasomes est le protéasome 20S. Le principal protéasome étudié est le 26S. La reconnaissance du substrat peut être directe par la séquence primaire de la protéine, ou induite après phosphorylation de la protéine ou interaction avec une molécule chaperonne. Une chaîne de poly-ubiquitinylation est réalisée par l'addition successive de molécules d'ubiquitine. La protéine poly-ubiquitinylée est ensuite dégradée par le protéasome, l'ubiquitine libérée étant recyclée (Ciechanover, 1998).

L'ubiquitinylation est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, dans l'endocytose, dans la transduction du signal, dans la réparation de l'ADN et dans l'apoptose. Les protéines PARP, Bax, Bcl-2, p53 et les complexes NF- κ B/I- κ B sont les principaux substrats de protéolyse médiée par l'ubiquitine.

L'ubiquitinylation est une étape importante de la voie d'activation des facteurs de transcription de la famille NF- κ B car elle permet la dégradation de la sous-unité inhibitrice I- κ B décrite précédemment mais elle permet également la maturation des sous-unité p50 et p52. En effet, p105 et p100, les précurseurs de p50 et p52 contiennent en position carboxy-terminale une région auto-inhibitrice homologue à I- κ B. La phosphorylation puis l'ubiquitinylation conduisent à une dégradation partielle de p100 et de p105, éliminant ainsi la région inhibitrice et donnant naissance aux facteurs de transcription p50 et p52 (Yamamoto et Gaynor, 2001). Le protéasome participe également au contrôle du cycle cellulaire dans lequel la destruction de certaines cyclines est requise pour la progression dans le cycle (cycline A et B, p27) (Koepp *et al.*, 1999).

8. Rôle des protéines de choc thermique ou HSP

Les protéines de stress thermique ou Hsps (« heat shock protein ») sont codées par des gènes dont l'expression est induite lors de stress thermique, par des inhibiteurs du métabolisme énergétique, par des métaux lourds, par un stress oxydatif ou par l'inflammation. Lors de tels stimuli, ces protéines protègent les cellules en agissant sur les protéines altérées afin d'éviter leur agrégation (Skowyra et *al.*, 1990). En conditions normales, les protéines Hsps sont chargées du bon repliement des protéines, de leur translocation, de l'activation de protéines régulatrices comme les facteurs de transcription, de la dégradation des protéines et de la présentation de l'antigène (Helmbrecht et *al.*, 2000 ; Jolly et Morimoto 2000). Elles sont, pour ces raisons, appelées protéines chaperonnes. Ces protéines conservées au cours de l'évolution ont été classées en fonction de leur poids moléculaire. La plus connue faisant 70 kDa est appelée Hsp70. La transcription des gènes hsp est permise par le facteur de stress thermique (HSF) (Morimoto, 1998). La liaison des Hsps à des protéines co-chaperonnes module l'activation des Hsps et favorise l'interaction avec les substrats (Zylicz et Wawrzynow, 2001).

Hsp70 et d'autres protéines chaperonnes ont également un rôle déterminant au cours de l'apoptose et de la transformation cellulaire. Une expression élevée d'Hsp70 et d'Hsp90 est détectée dans plusieurs types de cancers (Jolly et Morimoto, 2000) ; en effet, la surexpression de Hsp70 induit la transformation cellulaire dans quelques types de cancers (Jaattela, 1995). Cette induction de la tumorigénicité est permise par l'action des Hsps sur la machinerie du cycle cellulaire. En effet, Hsp70 et Hsp90 interagissent avec des protéines contrôlant le cycle cellulaire comme p53, pRb ou p27. Hsp90 peut se lier à p53 sauvage et stabilise la liaison de p53 à l'ADN (King et *al.*, 2001). Certaines Hsps empêchent p53 mutée de se transloquer dans le noyau en masquant le signal de localisation nucléaire (Akakura et *al.*, 2001) et jouent également un rôle dans la régulation de l'équilibre de p53 cytoplasmique et nucléaire. Ces protéines agissent également sur des kinases impliquées dans la cascade de signalisation d'activation de mitogènes comme les Raf ou MAP Kinases. Récemment, il a été décrit qu'Hsp70 pouvait réguler négativement différentes étapes de la voie apoptotique dépendante ou indépendante de p53 (Beere et *al.*, 2000 ; Li et *al.*, 2000a). Il a été décrit que l'effet anti-apoptotique de Hsp70 ne modifiait ni la libération du cytochrome c ni la quantité de caspase activée en dépit d'une augmentation du nombre de cellules non apoptotiques, suggérant que l'action protectrice de Hsp70 est postérieure à l'activation des caspases (Jaattela et *al.*, 1998). En revanche, une autre étude relate une surexpression de l'activation de la caspase-3 par Hsp70 sans que les fonctions mitochondriales soient affectées (Mosser et *al.*, 1997). Beere et *al.* (2000) ont montré qu'Hsp70 supprimait l'apoptose en

s'associant directement avec Apaf-1, empêchant ainsi le recrutement puis l'activation de la procaspase-9 et par conséquent l'assemblage d'un apoptosome fonctionnel.

Toutefois, le rôle protecteur des Hsps n'est pas systématique. En effet, il a été montré dans certaines conditions, qu'Hsp70 et Hsp90 pouvaient induire l'apoptose (Liou et *al.*, 1997 ; Galea-Lauri et *al.*, 1996). Récemment, il a été décrit qu'Hsp60 localisée sous forme de complexe dans la mitochondrie pouvait être libérée dans le cytosol et pouvait favoriser l'activation de la caspase-3 de manière ATP-dépendante après un stimulus pro-apoptotique (Xanthoudakis et *al.*, 1999).

II- Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un mécanisme conservé par lequel les cellules eucaryotes se dupliquent. Dans l'organisme, l'homéostasie des tissus résulte de l'équilibre entre les cellules qui vont mourir et les cellules nouvellement formées. Ce contrôle de l'homéostasie est permis par la connexion entre le cycle cellulaire et la mort cellulaire programmée. La réparation de l'ADN se fait en même temps que le cycle cellulaire ou que l'apoptose pour maintenir l'intégrité génomique des cellules, essentiel pour leur fonctionnement et leur survie. Des lésions sur l'ADN ou une mauvaise réplication de celui-ci peuvent activer des voies spécifiques de transduction. L'activation de points de contrôle peut induire un arrêt temporaire du cycle cellulaire et parfois une réparation de l'ADN.

1. Les différentes phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est une série d'évènements permettant à la cellule de se dupliquer. La transmission de l'information génétique d'une cellule à une cellule fille nécessite la réplication du génome pendant la phase S et sa séparation en deux nouvelles cellules filles pendant la mitose ou phase M. Les phases S et M sont des évènements cruciaux rigoureusement ordonnés pour permettre une duplication correcte de la cellule sans accumulation d'anomalies génétiques.

La majorité des cellules animales et végétales en croissance ne se divisent que toutes les 10 à 24 heures et d'autres encore bien plus rarement. Dans l'organisme adulte, beaucoup de cellules comme les cellules nerveuses et les cellules du muscle strié ne se divisent plus alors que les fibroblastes qui assurent la guérison des blessures ne se divisent qu'à la suite de lésions. Lors d'un cycle cellulaire normal, on observe une pause entre la synthèse d'ADN ou phase S et la division cellulaire ou phase M (mitose), une autre après la mitose et avant la phase S suivante. Le cycle cellulaire comprend donc la phase M, une phase G₁ (G pour Gap ou intervalle), la phase S (synthèse d'ADN), et une phase G₂ (second intervalle) avant le retour à la phase M. L'ensemble des périodes G₁, S et G₂ séparant deux mitoses est nommé interphase (Pucci et *al.*, 2000) (Figure 8). Dans les tissus, certaines cellules comme les fibroblastes suspendent leur cycle cellulaire après la mitose, sortent de la phase G₁ pour entrer en phase quiescente G₀. La durée de la phase G₁ est caractéristique du type cellulaire alors que la durée des autres phases est similaire quel que soit le type cellulaire.

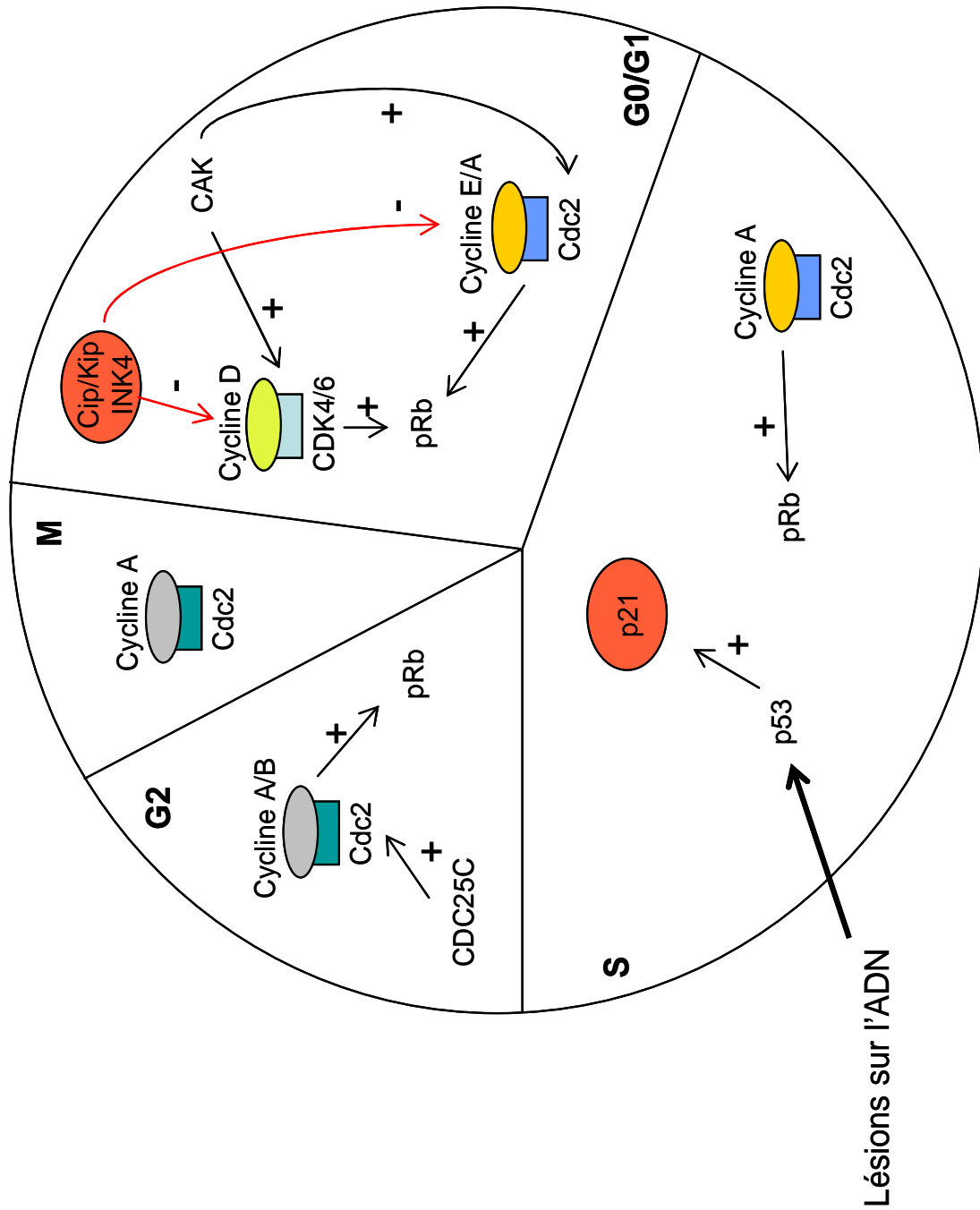


Fig. 8 : Cycle cellulaire et régulation par les complexes cyclines/CDK
(d'après Pucci et al., 2000)

La mitose dure environ 30 minutes dans les cellules à prolifération rapide, la phase S 10 heures et la phase G₂ 4 heures.

Le contenu relatif en ADN des cellules au cours du cycle cellulaire varie d'une quantité donnée n en phase G₁ à une quantité $2n$ en phase S après réplication. Cette quantité $2n$ est maintenue pendant les phases G₂ et M. Il est donc facile de reconnaître les stades dans lesquels les cellules se trouvent lors du cycle cellulaire par simple analyse du contenu en ADN à l'aide d'un trieur de cellules (FACS). Pendant l'interphase, les ARNs et les protéines sont synthétisés, la cellule répare également les anomalies dans l'ADN qui ont pu apparaître au cours de la phase S (erreurs de copie de l'ADN). Pendant la phase M, les synthèses d'ARNs et de protéines sont interrompues en raison de la condensation extrême de l'ADN dans les chromosomes mitotiques.

Les drogues anti-cancéreuses actuellement connues agissent essentiellement sur les phases S et M du cycle cellulaire. Certaines des drogues agissant pendant la phase S sont des dérivés de nucléotides (antimétabolites) alors que les drogues agissant pendant la phase M sont des poisons des microtubules qui perturbent l'organisation du fuseau mitotique.

2. Régulation du cycle cellulaire

La durée du cycle cellulaire ainsi que son déroulement sont contrôlés aux différents points de transition G₁/S et G₂/M mais aussi dans la phase S par des complexes protéiques appelés cyclines/kinases dépendantes des cyclines (CDK) (MacLachlan et *al.*, 1995). Lors de lésions sur l'ADN ou d'un mauvais alignement des chromosomes au niveau du fuseau mitotique, le cycle est arrêté au niveau de ces points de contrôle pour permettre la réparation des dommages. Après réparation, la cellule poursuit son cycle cellulaire mais si les lésions sont trop importantes pour être réparées, la cellule entre en apoptose.

2.1. Les complexes cyclines/CDK

2.1.1. Rôle des complexes cyclines/CDK dans le cycle cellulaire

La progression de la cellule dans les différentes phases du cycle cellulaire est médiée par l'activation transitoire de complexes cyclines/CDK. Les CDK appartiennent à la famille des sérine/thréonine kinases et leur activité kinase est dépendante de la présence des cyclines. Les cyclines requises pour le déroulement de chacune des phases du cycle cellulaire sont fortement induites lors de la phase concernée puis leur expression est diminuée pendant les phases au cours desquelles elles n'interviennent pas.

☞ *Déroulement du cycle cellulaire et expression des complexes cyclines/CDK*

Lorsque les cellules quiescentes entrent dans leur cycle cellulaire, le gène de la cycline D est induit et la cycline peut alors se complexer aux CDK4 ou 6 permettant à la cellule de progresser en phase G₁ (Sherr, 1993) (Figure 8). Les complexes cycline E/Cdc2 (ou CDK2) et cycline A/Cdc2 contrôlent la progression des cellules de la phase G₁ à la phase S (Sherr et Roberts, 1999). L'activité des complexes cycline/CDK est régulée par des mécanismes agissant au niveau de la formation des complexes ou au niveau de la phosphorylation des CDK qui est nécessaire à leur activité. La phosphorylation des CDK par des kinases activatrices ou CAK pour «CDK-activating kinase» favorise leur activité. A la fin de la phase G₁, après le point de restriction, la cellule peut entrer en phase S et les complexes cyclines D/CDK sont alors inactivés alors que la cycline A se lie à Cdc2 pour permettre la transition G₁/S. L'un des principaux substrats du complexe cycline D/CDK est la protéine du rétinoblastome (pRb). La phosphorylation de pRb initiée par ce complexe au cours de la phase G₁ est amplifiée par le complexe cycline E-Cdc2 après activation (Figure 8).

La transition G₂/M est permise par la présence de complexes cycline A/Cdc2 ou cycline B/Cdc2. Les complexes cycline B/Cdc2 s'accumulent pendant la phase G₂ du cycle cellulaire mais sont rendus inactifs par des kinases qui phosphorylent Cdc2. L'entrée en mitose nécessite la déphosphorylation de Cdc2 par la phosphatase CDC25C (Smits et Medema, 2001) (Figure 8). Les complexes cyclines A/Cdc2 et B/Cdc2 activés maintiennent pRb hyperphosphorylée jusqu'au début de la mitose avant qu'elle ne soit hypophosphorylée pour la prochaine phase G₁. La fin de la mitose se produit lorsque la cycline B est ubiquitinylée et dégradée par le complexe d'induction de l'anaphase (APC pour « Anaphase-Promoting Complex »).

☞ *Régulation du point de transition G₁/S*

L'inhibition des complexes est importante pour l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire. Les CDK sont régulées négativement par les sous-unités inhibitrices de CDK ou CKI pour «CDK inhibitor». Dans les cellules de mammifères, deux classes de CKI, les familles Cip/Kip et les INK4 (« inhibitors of CDK4 »), ayant des spécificités tissulaires différentes, permettent le contrôle du cycle cellulaire en réponse à des signaux intra- ou extra-cellulaires (Harper et Elledge, 1996) (Figure 8). La famille Cip/Kip inclut les protéines p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2} ; les INK4 comprennent quatre membres qui sont très souvent mutés dans les cancers, p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p18^{Ink4c} et p19^{Ink4d} (Sherr et Roberts, 1999). Les protéines régulatrices de la famille INK4 inhibent spécifiquement les CDK4 et CDK6 pendant la phase G₁ alors que les protéines régulatrices de la

famille Cip/Kip peuvent inhiber l'activité des CDK pendant toute la durée du cycle cellulaire.

L'arrêt du cycle cellulaire par les protéines de la famille des INK4 dépend de la présence de la protéine du rétinoblastome pRb sous sa forme hypophosphorylée. Les INK4 inhibent l'activation des complexes cycline D/CDK ce qui maintient pRb hypophosphorylée et active afin d'induire l'arrêt du cycle cellulaire en G₁. La protéine p16^{Ink4a} provoque un arrêt en G₁ en réponse à des lésions sur l'ADN de façon indépendante de p53 en empêchant la phosphorylation de pRb par les complexes cycline D/CDK (Shapiro et *al.*, 2000). Lorsque les cellules normales sont exposées à un agent génotoxique, la protéine p53 active la transcription du gène p21^{Waf1/Cip1}. La protéine p21^{Waf1/Cip1} va se lier aux complexes cycline E/Cdc2 et les inactiver conduisant à une déphosphorylation de la protéine pRb et à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ (Brugarolas et *al.*, 1999 ; Stewart et Pietsenpol, 2001).

La phosphorylation de pRb semble être facilitée lorsqu'elle est associée à des protéines de la famille Cip/Kip mais aucune expérimentation n'a permis de définir exactement cette interaction. L'accumulation des complexes cyclines D/CDK favorise la phosphorylation de pRb et permet l'activation du complexe cycline E/Cdc2. Une fois activée, ce complexe phosphoryle p27^{Kip1} et entraîne sa dégradation, ce qui permet le passage du point de restriction (Sherr et Roberts, 1999).

☞ Régulation du point de transition G₂/M

Un stress génotoxique peut également entraîner un arrêt du cycle en phase G₂ par l'induction des protéines ATM («ataxia telangiectica mutated») et ATR («ATM and Rad3-related») qui inhibent Cdc2 (Pietsenpol et Stewart, 2002). ATM active la kinase du point de transition 2, Chk2 («checkpoint kinase 2») après effet des radiations ionisantes alors que ATR active la kinase Chk1 après effet des radiations UV. Les deux kinases phosphorylent la phosphatase CDC25C sur la sérine 216 permettant à la protéine 14-3-3 d'interagir. Cette interaction entraîne la translocation de CDC25C du noyau vers le cytoplasme et sa séquestration dans ce dernier compartiment. Cdc2 est inactive puisqu'elle reste phosphorylée et la cellule ne peut donc pas progresser en mitose (Abraham, 2001). Quelques travaux laissent supposer que p53 joue un rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire en G₂. En effet, p53 régule positivement la transcription des protéines p21 et 14-3-3 (Hermeking et *al.*, 1997 ; Bunz et *al.*, 1998). L'activation de p21 par p53 provoque une diminution d'expression de la cycline B et de Cdc2 (Innocente et *al.*, 1999).

☞ Régulation de la mise en place du fuseau mitotique

Les protéines MAD2 (« mitotic arrest deficient ») et BUB1 (« budding uninhibited by benomyl ») régulent la progression de la mitose en interagissant avec le complexe APC et en l'inhibant, ce qui empêche l'entrée en anaphase lorsque le fuseau mitotique est altéré (Musacchio et Hardwick, 2002).

2.1.2. Rôle des complexes cyclines/CDK dans l'apoptose

Plusieurs données révèlent l'influence qu'ont les complexes cyclines/CDK sur l'exécution ou non de la mort cellulaire. Harvey et *al.* (1998) ont décrit l'activation caspase-dépendante des complexes cycline A/CDK pendant la phase effectrice de la mort cellulaire. Dans des thymocytes en apoptose, Cdc2 est activée mais seulement lorsque Bax, protéine pro-apoptotique, est activée ou lorsque Bcl-2, protéine anti-apoptotique, est inhibée (Gil-Gomez et *al.*, 1998). Cependant, l'implication de Cdc2 est dépendante du système cellulaire et du stimulus utilisé puisqu'elle n'a pas lieu lors de l'apoptose induite par l'étoposide, la dexaméthasone, les irradiations par les UV, la déprivation de sérum ou Fas (Kasten et Giordano, 1998). La cycline D semble être une autre protéine régulatrice du cycle cellulaire également impliquée dans l'apoptose. En effet, une surexpression de cette protéine induit l'apoptose dans les cellules neuronales ou dans les fibroblastes (Kasten et Giordano, 1998). Mais cette activation des cyclines pendant l'apoptose peut être la conséquence des phénomènes apoptotiques et non la cause.

2.2. La protéine p21

2.2.1. Rôle de p21 dans le cycle cellulaire

p21 fait partie des Cip/Kip, inhibiteurs de CDK agissant dans n'importe quelle phase du cycle cellulaire. El-Deiry et *al.* (1993) ont montré que l'activité anti-tumorale de p53 était médiée par de nombreux gènes possédant des éléments de réponse à p53 au sein de leur promoteur. L'un d'entre eux a été nommé WAF1 puis p21^{Waf1/Cip1}. Ce gène est induit en présence de la protéine p53 sauvage et non en présence d'une p53 mutée. L'expression de WAF1 dans plusieurs lignées cellulaires en culture inhibe leur prolifération. La transcription de p21 est sous la dépendance de p53 qui agit alors comme facteur de transcription (Kim, 1997). Une fois exprimée, p21 va se lier aux complexes cycline D/CDK4, cycline D/CDK6 ou cycline E/Cdc2 et les inactiver, conduisant alors à une hypophosphorylation de pRb et à un arrêt du cycle cellulaire (Stewart et Pietenpol, 2001). De plus, la transfection de p53 ou de p21 dans des cellules ne les exprimant pas conduit à une réduction de l'expression de la cycline A et à une accumulation des cellules en phase G₁

(Huang *et al.*, 2001). Brugarolas *et al.* (1995) ont montré que lorsque le gène de p21 était réprimé, aucun arrêt du cycle cellulaire n'était induit après irradiation alors qu'en sa présence le cycle cellulaire est arrêté en phase G₁. Dans les cellules quiescentes, p27 est fortement exprimée contrairement à p21 dont l'expression est augmentée en réponse à des signaux mitotiques pendant la phase G₁ (Sherr et Roberts, 1999). Le butyrate de sodium induit l'expression des CKI, p21, p27 et p16 dans les cellules exprimant p53. Curieusement, dans des cellules exprimant une p53 mutée, l'expression de p21 est induite de façon plus importante. Le butyrate de sodium induit donc l'expression de p21 de façon dépendante ou indépendante de p53. La transfection de p53 dans des cellules de muscles lisses induit l'expression de p21, entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ et en phase G₂/M et induit l'apparition d'un pic sub-G₁ souvent associé aux cellules apoptotiques (Katayose *et al.*, 1995). De plus, p21 est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en G₂ lorsqu'elle est induite par p53 car, lors d'une invalidation de p53 ou de p21, les cellules ne s'arrêtent pas en G₂ mais entrent en mitose (Bunz *et al.*, 1998).

2.2.2. Rôle de p21 et p27 dans l'apoptose

L'inhibiteur de CDK, p21^{Waf1} peut également inhiber l'apoptose comme l'ont montré Lu *et al.* (1998b), cette inhibition semblant être dépendante de Cdc2. Contrairement à p21, le rôle de p27 dans l'apoptose n'est pas encore bien défini et reste controversé. Une surexpression de p27 peut entraîner l'apoptose dans différents types cellulaires (Wang *et al.*, 1997) mais p27 peut également avoir des effets anti-apoptotiques comme l'ont montré Hiromura *et al.* (1999). D'autres données ont montré que p21 et p27 étaient des cibles des caspases, liant donc ces deux molécules à l'apoptose. Pendant une privation en sérum qui induit l'apoptose, la partie carboxy-terminale de p21 et p27 est éliminée, ce qui empêche leur liaison à Cdc2 (Pucci *et al.*, 2000). p21 est une cible des caspases lors de l'apoptose induite par des irradiations γ (Gervais *et al.*, 1998) ou par le TNF (Donato et Perez, 1998). p27 est clivée par la caspase-3 pour générer un fragment de 23 kDa pendant l'arrêt du cycle cellulaire en G₁ (Loubat *et al.*, 1999). Le fait que ces deux CKI puissent être clivés suggèrent que Cdc2 pourrait en plus de son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire avoir un rôle dans l'induction de l'apoptose dépendante des caspases (Levkau *et al.*, 1998).

2.3. La protéine pRb

Une autre protéine peut encore réguler négativement le cycle cellulaire, il s'agit de la protéine du rétinoblastome pRb, produit du gène RB1 suppresseur de tumeurs. Cette protéine peut également intervenir dans l'apoptose (Vermeulen *et al.*, 2003). pRb fait partie d'une famille

comprenant également pRb2/p130 et p107. Les gènes codant ces protéines sont souvent mutés dans de nombreux types de cancers comme les rétinoblastomes, les carcinomes de poumons, les cancers du sein, les cancers des os ou de la prostate (Riley et *al.*, 1994).

2.3.1. Structure de la protéine pRb

La protéine pRb est composée d'un domaine amino-terminal, des domaines centraux A et B et d'un domaine carboxy-terminal. L'intégrité structurale des domaines A/B est nécessaire à l'interaction de pRb avec d'autres protéines comme E2F ou les protéines histones déacétylases (HDAC). Des analyses cristallographiques de la structure de pRb montrent qu'elle peut se lier à plusieurs protéines simultanément. Le domaine carboxy-terminal et le domaine amino-terminal semblent également impliqués dans la fonction de suppression des tumeurs de pRb. Le domaine carboxy-terminal possède une fonction de liaison à l'ADN et le domaine amino-terminal paraît nécessaire à l'intégrité fonctionnelle de pRb et à la liaison de pRb à quelques protéines comme Hsp70 (Zheng et Lee, 2001). Les protéines homologues p130 et p107 possèdent également les domaines A/B leur permettant d'interagir avec E2F et les protéines HDAC de la même façon que pRb et par conséquent de médier un arrêt du cycle cellulaire. Cependant pRb, p107 et p130 s'associent à des membres différents de la famille E2F, ce qui suppose qu'elles aient un rôle légèrement différent dans la régulation du cycle cellulaire (Nevins, 1998).

2.3.2. Rôle de pRb dans l'arrêt du cycle cellulaire en G₁

☞ *Mécanismes de régulation transcriptionnelle par pRb*

L'arrêt du cycle cellulaire en G₁ se fait par la liaison de pRb hypophosphorylée au facteur de transcription E2F qui normalement induit l'expression des gènes de protéines impliquées dans l'entrée des cellules en phase S ainsi que dans la synthèse d'ADN (Dyson, 1998) (Figure 9). D'autres protéines pouvant participer à la régulation transcriptionnelle induite par pRb sont actuellement étudiées ; RIZ (« Rb-interacting zinc-finger protein »), RbaK (protéine de la famille « KRAB-Zinc-Finger ») (Zheng et Lee, 2001). Bien que la formation du complexe pRb/E2F soit fortement impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire médié par pRb, cette dernière peut également exercer son activité par l'intermédiaire des protéines HDAC (Figure 9) ; pRb permettrait l'interaction de HDAC à l'ADN, ce qui altérerait la structure de la chromatine. Mais pRb peut directement altérer la structure de la chromatine en interagissant avec les protéines BRG1 et Brm (Figure 9), qui régulent le remodelage des nucléosomes de façon ATP-dépendante (Strober et *al.*, 1996).

☞ Régulation de pRb en phase G₁

L'activité de la protéine pRb est modulée au cours du cycle cellulaire par son degré de phosphorylation. La forme hypophosphorylée de pRb est dominante au début de la phase G₁ puis dans la phase M alors que la forme hyperphosphorylée est présente à la fin de la phase G₁ et est maintenue pendant les phases S, G₂ et M (Figure 9). Doisneau-Sixou *et al.* (2003) ont montré que le tamoxifène associé à un inhibiteur de la farnésyl transférase induisait un arrêt du cycle cellulaire accompagné d'une diminution de la phosphorylation de pRb. L'induction des complexes cyclines D/CDK, impliqués dans la phase G₁, coïncide avec l'initiation de la phosphorylation de pRb (Figure 9). pRb hyperphosphorylée ne peut plus interagir avec E2F ou HDAC et par conséquent n'exerce plus de répression sur la transcription des gènes impliqués dans la phase S (Harbour et Dean, 2000). E2F peut donc induire l'expression de gènes comme ceux codant pour les cyclines E et A, et HDAC peut induire l'expression de la cycline E. Les complexes cycline E/Cdc2 nouvellement formés augmentent alors le degré de phosphorylation de pRb (Figure 9). La protéine pRb associée à BRG1/Brm régule les gènes normalement induits dans la phase S (cycline A et Cdc2) (Figure 9). Une fois que pRb est phosphorylée par le complexe cycline E/Cdc2, le complexe pRb/BRG1/Brm se dissocie ce qui entraîne l'induction de la cycline A et de Cdc2. Les deux types de répression transcriptionnelle exercée par pRb sont successivement levés par phosphorylation de celle-ci, ce qui maintient l'activité des complexes cyclines/CDK dans un ordre bien précis (Figure 9).

2.3.3. Rôle de pRb dans la progression du cycle cellulaire

Le complexe pRb/E2F réprime l'expression de la cycline A et favorise la dégradation de la cycline B à la fin de la phase S. Celle-ci est de nouveau induite au cours de la phase G₂ puis activée pour permettre l'entrée en mitose. L'accumulation de la cycline B se fait lorsque pRb est phosphorylée par le complexe cycline E/Cdc2 (Zheng et Lee, 2001).

La protéolyse est un des principaux mécanismes régulant la progression en phase M et le complexe APC semble essentiel dans la dégradation des cyclines mitotiques. En interagissant avec un des composés du complexe APC, la protéine pRb pourrait contrôler le déroulement de la phase M. De plus, pRb peut s'associer à Hec1 (« highly expressed in cancer »), une protéine qui interagit avec le protéasome 26S et inhibe la dégradation des cyclines mitotiques comme la cycline A (Chen *et al.*, 1997) (Figure 9). En outre, la protéine pRb paraît indispensable à l'arrêt du cycle cellulaire en G₂/M induit par p53 (Flatt *et al.*, 2000).

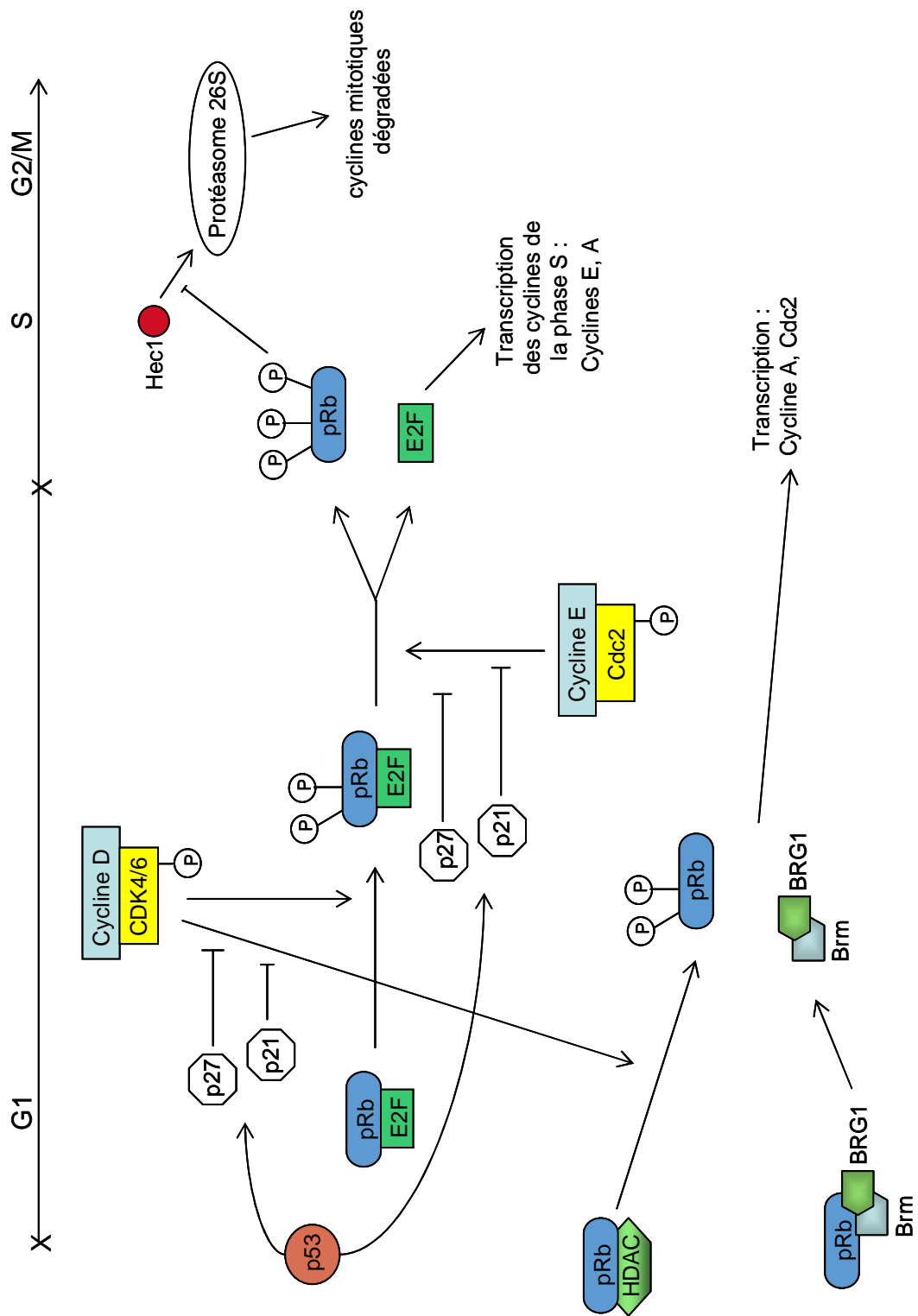


Fig. 9 : Régulation du cycle cellulaire par pRb (d'après Stewart et al., 2003)

Il est également supposé que pRb joue un rôle dans le contrôle de la synthèse d'ADN, et inhibe celle-ci lorsque l'ADN est endommagé. Cette hypothèse est confortée par le fait que pRb peut s'associer à un facteur permettant la réplication ou agir sur la transcription de gènes impliqués dans la réplication de l'ADN. Cette inhibition par la protéine pRb permet de maintenir l'intégrité du génome (Zheng et Lee, 2001).

2.3.4. Rôle de pRb dans l'apoptose

Le rôle de pRb en tant que facteur anti-apoptotique a été montré dans différents systèmes, notamment dans la mort cellulaire induite par le TGF- β 1 (Fan et *al.*, 1996), par l'IFN γ (Berry et *al.*, 1996) ou par des irradiations (Haas-Kogan et *al.*, 1995). Plusieurs auteurs ont également décrit le clivage de pRb par les caspases dans l'apoptose induite par le TNF, la staurosporine, ou l'activation de Fas (Janicke et *al.*, 1996 ; Dou et *al.*, 1997).

2.4. Rôle de la protéine p53

L'altération des fonctions de p53 dans les différents cancers a permis de constater son rôle aussi bien dans le contrôle de la croissance cellulaire, dans l'apoptose, dans le contrôle de l'intégrité du génome que dans la réparation de l'ADN (Levine, 1997). Plusieurs stimuli, comme des lésions sur l'ADN, l'hypoxie, l'activation d'oncogènes, la déplétion en facteurs de croissance, ou les chocs thermiques entraînent son activation en augmentant le taux de transcription du messenger ou en augmentant la durée de sa demi-vie (Mosner et *al.*, 1995). En réponse à ces stimuli, p53 peut induire un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN avant la division cellulaire ou l'initiation de l'apoptose. Dans la majorité des cancers, on observe une p53 mutée mais sans altération de son activité, et les cellules cancéreuses ayant une p53 sauvage sont souvent défectueuses en facteurs intervenant dans la stabilisation ou l'activité de p53 (Hainaut et Hollstein, 2000).

Cette protéine régule une grande variété de gènes impliqués dans diverses fonctions (Figure 10). Elle peut conduire à un arrêt du cycle cellulaire en activant la CKI p21, la cycline D, Gadd45, le cofacteur 14-3-3. Elle peut également réguler des gènes comme Bax, Bcl-X_L, TGF α , Fas, FasL, DR5 impliqués dans l'apoptose ou le gène Gadd145 impliqué dans la réparation de l'ADN. De plus, elle peut moduler sa propre activité en induisant le gène mdm2 (« murine double minute 2 ») (Bargonetti et Manfredi, 2002). D'autres gènes dépendants de p53 ont été décrits comme les gènes codants pour Apaf-1, NOXA (Oda et *al.*, 2000a) et PUMA (« p53-upregulated modulator of apoptosis ») (Nakano et Vousden, 2001). NOXA et PUMA sont tous les deux membres de la

famille Bcl-2 possédant un domaine BH3. Le niveau des lésions sur l'ADN est également un facteur contribuant au choix entre survie ou mort cellulaire. La protéine p53 peut réguler cette grande variété de gènes en s'associant de façon sélective à différents facteurs de transcription. La protéine p53 peut interagir avec des protéines impliquées dans la transcription comme TFIIID en se liant à sa sous-unité TBP (« TATA box-binding protein ») (Farmer et *al.*, 1996). Les protéines p300/CBP (« CREB-binding protein ») se lient au domaine amino-terminal de p53 et sont également impliquées dans la fonction transactivatrice de p53 (Gu et *al.*, 1997).

2.4.1. Structure de la protéine p53

p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés qui induit la transcription de différents gènes lorsqu'elle est sous forme de tétramère. Elle est constituée de trois domaines principaux, un domaine de transactivation en amino-terminal, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine responsable de son oligomérisation localisé en carboxy-terminal (Stewart et Pietenpol, 2001) (Figure 10). Deux dimères interagissent grâce à leurs hélices α pour former le tétramère. Le tétramère peut ainsi se fixer sur des séquences précises de l'ADN pour exercer son activité transcriptionnelle. Les séquences sur lesquelles se fixe p53 contiennent deux copies du motif 5'-Pu-Pu-Pu-C-(A/T)-(T/A)-G-Py-Py-Py-3' (Pu, base purique et Py, base pyrimidique) et il existe environ 200 à 300 éléments de réponse à p53 dans le génome (Funk et *al.*, 1992).

2.4.2. Régulation de l'expression de p53

Le niveau d'expression des gènes dépend de la quantité de p53 dans la cellule et du type de stress utilisé pour induire p53 (Bargonetti et Manfredi, 2002). En effet, différents types de lésions sur l'ADN activent diverses kinases qui phosphorylent p53 sur des résidus sérine ou thréonine.

☞ *Régulation de p53 par MDM2, ATM/ATR et JNK*

Dans les cellules normales, l'expression de p53 est maintenue à un faible taux par l'interaction avec son régulateur, MDM2. Le gène *mdm2* est induit par p53 et la protéine MDM2 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 en diminuant sa stabilité et en favorisant sa dégradation. Elle favorise la relocalisation de p53 du noyau vers le cytoplasme (Alarcon-Vargas et Ronai, 2002) et facilite également la dégradation de p53 par le protéasome dans le cytoplasme (Figure 11). MDM2 est également capable de s'auto-ubiquitinyler et peut provoquer sa propre dégradation dans certaines conditions.

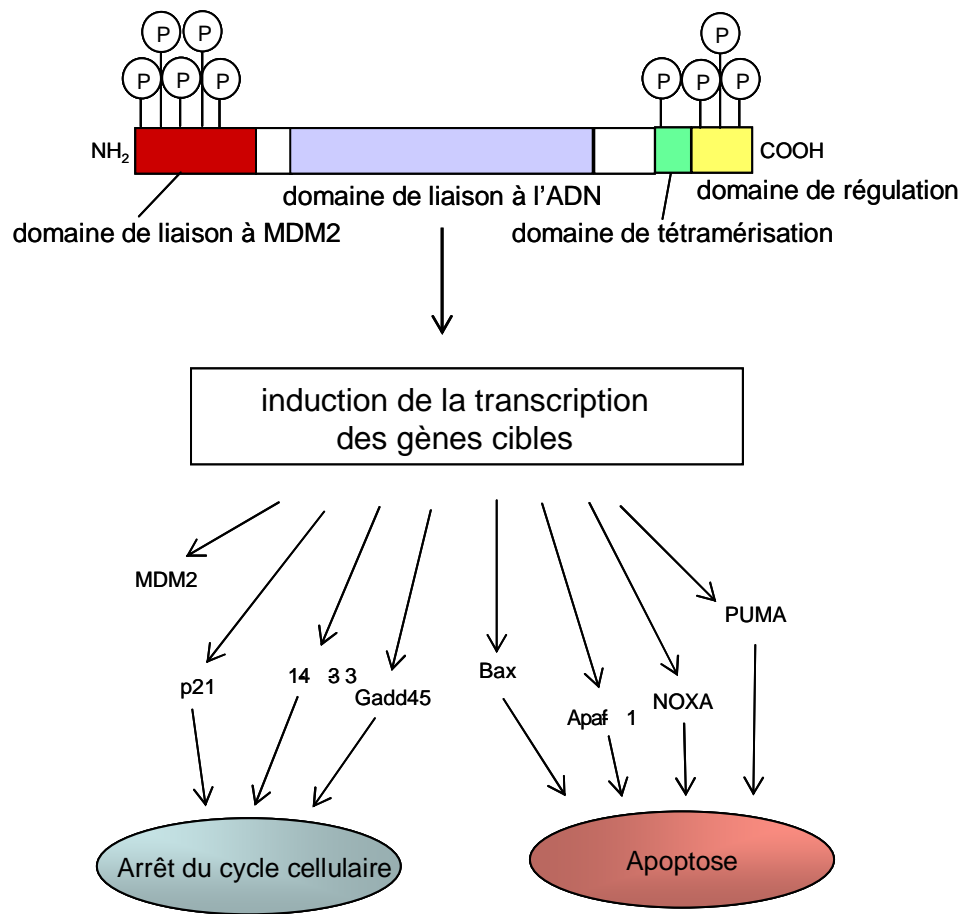


Fig. 10 : Structure de la protéine p53 (d'après Stewart et Pietenpol, 2001)

MDM2 contient un domaine de localisation nucléaire ainsi qu'un domaine d'exportation nucléaire, ce qui favorise son va-et-vient entre le cytoplasme et le noyau. Les kinases DNA-PK (« DNA-activated protein kinase »), ATM, ATR et p38 impliquées dans les activités de MDM2 sont les mêmes qui phosphorylent p53, ce qui révèle l'étroite régulation entre ces deux protéines (Figure 11). La phosphorylation de p53 par p38 augmente sa stabilité alors que la phosphorylation de MDM2 par cette même kinase augmente la dégradation de MDM2. De la même manière, ATM augmente la stabilité de p53 mais favorise l'export nucléaire de MDM2 empêchant donc son action sur p53 (Alarcon-Vargas et Ronai, 2002) (Figure 11). La surexpression de MDM2 est fréquente dans les cancers comme les ostéosarcomes et les carcinomes. Arriola et *al.* (1999) ont montré que l'inhibition de la transcription de MDM2 par l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II, activait p53. Les phosphorylations de p53 sur les sérines 15, 20 et 37 altèrent l'interaction de MDM2 avec p53. En effet, Gao et *al.* (1999) ont montré que différents agents anti-cancéreux (doxorubicine, étoposide, cisplatine) phosphorylaient p53 sur la sérine 15 et favorisaient par conséquent l'activation de p53. L'induction de la voie des kinases de la famille de la « phosphatidylinositol 3-kinase related kinase » (PIKK) par le cadmium, un inhibiteur de la prolifération et inducteur puissant d'apoptose, entraîne la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 (Matsuoka et Iqisu, 2001). Les protéines ATM et ATR augmentent la stabilité de p53 en la phosphorylant sur la sérine 15 et en phosphorylant la kinase Chk2 qui à son tour phosphoryle p53 sur la sérine 20 (Figure 11). Les deux sites (sérines 15 et 20) non phosphorylés semblent indispensables à l'interaction de p53 avec MDM2 (Alarcon-Vargas et Ronai, 2002). La protéine ATM peut également, en phosphorylant directement MDM2, empêcher l'export nucléaire de p53 et donc empêcher sa dégradation dans le cytoplasme. Ainsi, p53 est stabilisée et peut s'accumuler dans le noyau (Unger et *al.*, 1999) (Figure 11).

La protéine p53 peut également être régulée par les protéines p300/CBP et JNK. La phosphorylation de p53 sur la thréonine 81 par JNK semble jouer un rôle important dans la stabilité de la protéine (Buschmann et *al.*, 2001). La phosphorylation de p53 sur la sérine 15 augmente son affinité pour les co-activateurs p300/CBP.

☞ *Les différents sites de phosphorylation et leur rôle dans l'activité de p53*

Diverses phosphorylations ou acétylations influencent la liaison de p53 à l'ADN, sa multimérisation, son interaction protéine-protéine et son activité transcriptionnelle. Les modifications de p53 les plus connues sont les phosphorylations situées au niveau des sérines 6, 9, 15, 20, 33, 37 et 392, la phosphorylation des résidus thréonine 18 et 81, la déphosphorylation de la sérine 376 et les acétylations sur les lysines 320, 373 et 382 (Meek, 1998).

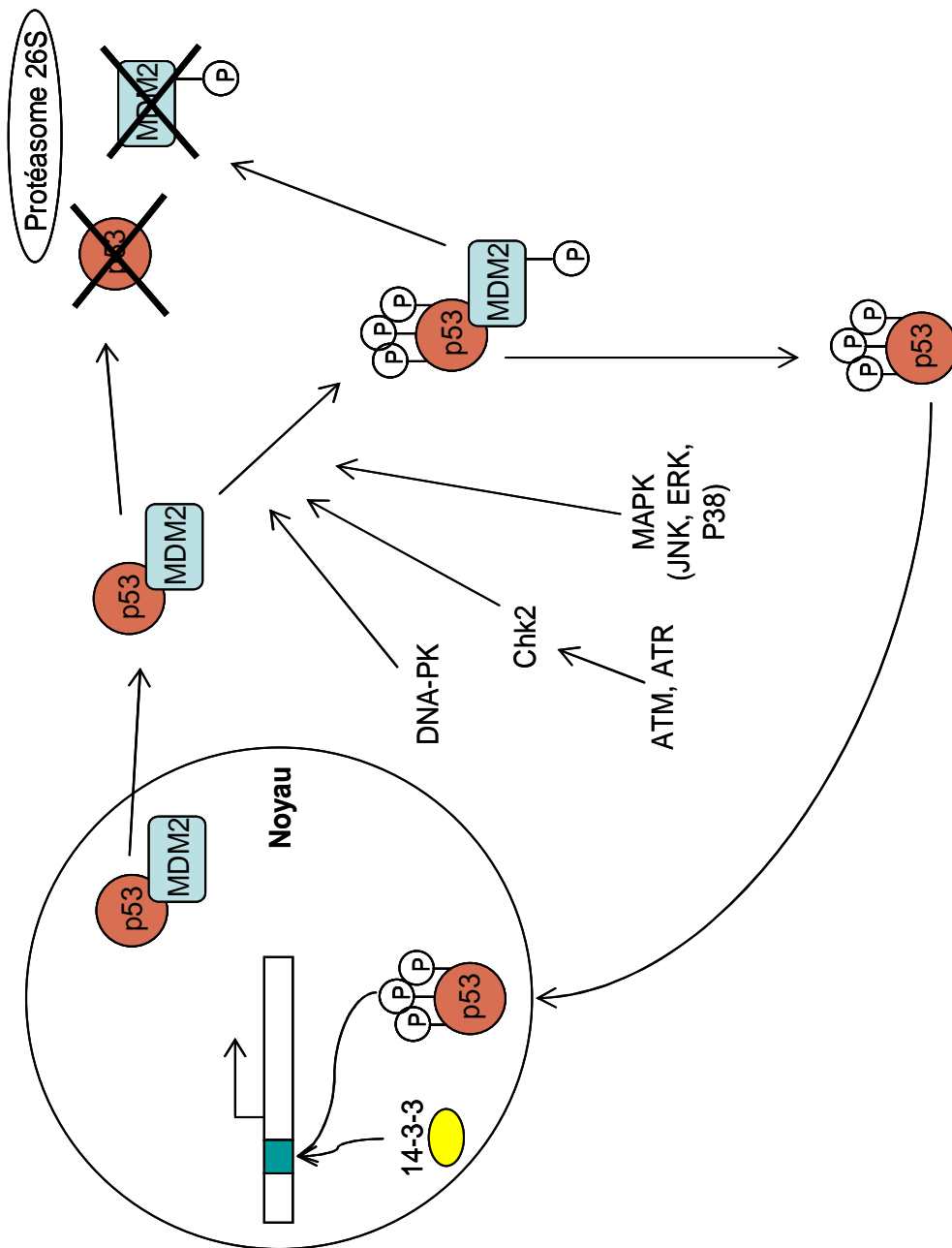


Fig. 11 : Activation de p53

- Phosphorylations sur les sérines 15 et 20

Des mutations au niveau des sérines 15 et 20 altèrent l'activité pro-apoptotique de p53 contrairement à d'autres mutations. Ces deux sérines ont donc un rôle crucial dans l'induction de l'apoptose p53-dépendante. La phosphorylation de p53 sur les sérine 15 et 20 est importante pour sa stabilisation, son induction et sa fonction transactivatrice (Unger et *al.*, 1999) puisqu'elle empêche MDM2 de réguler p53.

De récentes études montrent que les kinases de la famille des MAPK («mitogen-activated protein kinase») comme ERK («extracellular signal-regulated protein kinase»), JNK («c-Jun NH₂-terminal kinase»), ou p38 peuvent phosphoryler différents sites de p53, y compris la sérine 15. Ces protéines sont des sérine/thréonine kinases qui transmettent les signaux extra-cellulaires en se transloquant dans le noyau et en phosphorylant des gènes cibles comme p53 ou AP-1 (Schaeffer et Weber, 1999). Les kinases de la famille de la PIKK comme la DNA-PK, l'ATM ou l'ATR sont également impliquées dans la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 (Meek, 1998). Ces kinases semblent être activées lorsque l'ADN est altéré.

Le mécanisme de phosphorylation de p53 sur la sérine 20 est peu étudié contrairement au mécanisme phosphorylant la sérine 15. Récemment, Xie et *al.* (2001) ont montré que la sérine/thréonine kinase PIK3 («Polo-like Kinase 3») activée par les radicaux libres oxygénés phosphorylait p53 sur la sérine 20.

Il est également connu que ERK phosphoryle p53 sur les thréonines 73 et 83 (Milne et *al.*, 1994), JNK la phosphoryle sur la sérine 34 (Milne et *al.*, 1995) et p38 phosphoryle p53 sur la sérine 392 ou sur les sérines 33 et 46 (Bulavin et *al.*, 1999). Cependant, JNK peut se lier à p53 et favoriser sa dégradation de façon indépendante de MDM2 lorsque JNK est inactive (Fuchs et *al.*, 1998). Shieh et *al.* (1999) suggèrent que le domaine amino-terminal de p53 puisse être phosphorylé par un complexe contenant plusieurs kinases.

- Phosphorylation sur la sérine 392

La phosphorylation de p53 sur la sérine 392 favorise la stabilité du tétramère et par conséquent son activité transcriptionnelle (Hao et *al.*, 1996 ; Sakaguchi et *al.*, 1997). Cette phosphorylation se fait en général après une exposition de la cellule à des radiations UV qui génèrent des lésions importantes sur l'ADN (Kapoor et *al.*, 2000). Les radiations UV induisent la phosphorylation de p53 au niveau des sérines des domaines amino et carboxy-terminaux alors que les radiations γ induisent une phosphorylation de p53 sur la sérine 15. Les différences de réponses

au niveau de p53 face à ces deux types de radiations peuvent s'expliquer par le type de lésions provoquées sur l'ADN. Les radiations UV provoquent des dimères de thymine alors que les radiations γ induisent des cassures de l'ADN double brin (Lu et *al.*, 1998a). La phosphorylation de la sérine 392 peut être médiée par la caséine kinase II (Meek et *al.*, 1990) mais aussi par les kinases de la famille de la MAPK comme p38 qui est activée lors de radiations UV (Keller et *al.*, 1999). Il est supposé que la phosphorylation sur la sérine 392 facilite l'oligomérisation de p53 et permet également la phosphorylation sur la sérine 15. De plus, Houser et *al.* (2001) ont montré que la camptothécine et la zéocine induisaient pendant toute la durée du cycle cellulaire une accumulation de p53 phosphorylée sur la sérine 392.

- Autres sites de modifications

L'augmentation de l'affinité de liaison de p53 à l'ADN nécessite une déphosphorylation de la sérine 376, ce qui favorise la liaison de p53 à la protéine 14-3-3 et augmente la liaison de p53 à l'ADN (Waterman et *al.*, 1998) (Figure 11). Une phosphorylation sur la sérine 46 semble être importante dans l'induction de l'apoptose par p53 (Oda et *al.*, 2000b), mais elle empêche la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 (Bulavin et *al.*, 1999). La phosphorylation de p53 sur la thréonine 81 n'est pas suffisante pour induire son activité transcriptionnelle (Buschmann et *al.*, 2001). L'acétylation de p53 sur les sites 320, 373 et 382 est impliquée dans l'activité transcriptionnelle de p53 et semble être dépendante de la phosphorylation de la protéine (Gu et *al.*, 1997). En effet, la phosphorylation de p53 sur les sérines 33 et 37 favorise l'acétylation de p53 en carboxy-terminal et augmente son affinité de liaison à l'ADN (Sakaguchi et *al.*, 1998).

2.4.3. Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire

L'activation de la transition G1/S est caractérisée par l'accumulation et l'activation de la protéine p53 dans le noyau. Le rôle de p53 dans la prolifération se fait principalement au niveau de la phase G1 du cycle cellulaire par l'induction de l'expression de p21 (Kim, 1997) et l'inhibition de l'expression des complexes cycline D/CDK ou cycline E/Cdc2 impliqués dans l'initiation de la phase S. Dans ces conditions, pRb ne peut être phosphorylée, ce qui empêche la cellule de progresser en phase S (Figure 9). p53 peut également agir sur le cycle cellulaire sans faire intervenir les CKI mais en régulant les CAK conduisant à une diminution de l'activité Cdc2 (Schneider et *al.*, 1998).

D'autres études montrent également le rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire au niveau

du point de transition G₂/M (Agarwal et *al.*, 1995). Il s'agit le plus souvent d'une inhibition au niveau de l'entrée en mitose lors d'anomalies au niveau de la synthèse d'ADN ou dans la répartition des chromosomes (Agarwal et *al.*, 1995). p53 semble agir en diminuant la transcription et la synthèse de la cycline B1 (Innocente et *al.*, 1999) ou en agissant sur la protéine 14-3-3 conduisant à une diminution de l'activité Cdc25 et par conséquent à une diminution de l'activité Cdc2 (Hermeking et *al.*, 1997). L'activation par p53 de Gadd45, un élément de la voie de réponse aux lésions sur l'ADN, inhibe la réplication de l'ADN jusqu'à ce que la réparation se mette en place et participe également à l'arrêt du cycle en G₂/M (Sionov et Haupt, 1999).

De plus, p53 est impliquée dans le blocage des cellules en phase S de réplication lorsque le fuseau mitotique est altéré (Di Leonardo et *al.*, 1997). Cette protéine régule également la duplication du centrosome (Fukasawa et *al.*, 1996).

2.4.4. Rôle de p53 dans l'apoptose

L'apoptose médiée par p53 est induite par des lésions sur l'ADN, l'hypoxie ou le manque de facteurs de croissance. La protéine p53 peut inhiber la transcription de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou induire des gènes pro-apoptotiques comme Bax (Miyashita et *al.*, 1994), Fas (Owen-Schaub et *al.*, 1995) ou DR5 (Sheikh et *al.* 1998).

Mais dans la plupart des cas, son implication dans l'apoptose semble être indépendante de son activité transcriptionnelle (Haupt et *al.*, 1995) et est permise par son interaction avec d'autres protéines agissant au niveau de la réparation de l'ADN, comme TFIIH (Wang et *al.*, 1996c). En effet, l'apoptose médiée par p53 est également induite lorsque la transcription des gènes ou leur traduction sont inhibées (Caelles et *al.*, 1994 ; Gao et Tsuchida, 1999). La protéine p53 peut également induire l'apoptose en augmentant la production de radicaux libres au niveau de la mitochondrie. L'action de p53 au niveau de la mitochondrie pourrait augmenter son action au niveau du noyau et donc amplifier son activité pro-apoptotique. La localisation de p53 dans la mitochondrie est au niveau de la membrane externe mitochondriale et précède son accumulation dans le noyau (Sansome et *al.*, 2001). p53 peut induire l'expression de PIG3, une protéine homologue à la NADPH-quinone oxydoréductase, qui génère des radicaux libres oxygénés (Polyak et *al.*, 1997). Marchenko et *al.* (2000) ont décrit que p53 était localisée dans la mitochondrie après une hypoxie ou l'induction de lésions sur l'ADN. Cette localisation mitochondriale ne se produit pas lors d'une apoptose indépendante de p53 ou lors d'un arrêt du cycle cellulaire. Le transfert de p53 dans la mitochondrie est rapide et précède le relargage du cytochrome c et l'activation de la procaspase-3. De plus, Mihara et *al.* (2003) ont montré que p53

pouvait induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe en formant un complexe avec les protéines anti-apoptiques Bcl-2 et Bcl-X_L. L'interaction de p53 à Bcl-X_L se fait par le domaine de liaison à l'ADN.

2.4.5. p63 et p73, protéines homologues de p53

Les protéines homologues de p53 régulent le cycle cellulaire et l'apoptose par leur activité transcriptionnelle. Les protéines p63 et p73, contrairement à p53, sont exprimées sous différentes tailles ce qui complique l'analyse de leur fonction (Dietz et *al.*, 2002). Le gène de la protéine p73 a été identifié récemment et code pour deux protéines, p73 α (699 acides aminés) et p73 β (499 acides aminés). p73 active la transcription des gènes codant pour p21^{Waf1} et Bax et entraîne une inhibition de la croissance accompagnée d'une induction de l'apoptose (Jost et *al.*, 1997). Elle n'est exprimée que dans un nombre limité de cancer comme les neuroblastomes, les ostéosarcomes, les adénocarcinomes. La protéine p73 n'est pas induite par des signaux entraînant des lésions sur l'ADN, ce qui suppose qu'elle ne soit pas activée par les mêmes mécanismes que p53. La protéine p73, comme p53, induit l'expression de MDM2 qui régule négativement l'expression de p73 mais de façon différente que pour p53. p73 interagit avec MDM2 par son domaine amino-terminal, ce qui altère sa liaison avec les co-activateurs p300 et CBP et empêche son activité transcriptionnelle alors que MDM2 favorise la dégradation de p53 par le protéasome (Zeng et *al.*, 1999). D'autres protéines homologues à p53 comme p51 et p63 ont également été décrites et ont les mêmes propriétés que p53 et p73 (Osada et *al.*, 1998 ; Yang et *al.*, 1998a). Une étude récente montre que l'apoptose induite par p53 chez des souris exprimant différentes combinaisons de p53, p63 et p73 est la conséquence d'une interaction entre les différents membres de la famille p53 (Flores et *al.*, 2002).

III- Les cyclooxygénases

La réaction inflammatoire est une réaction de défense non spécifique en réponse à une lésion, une stimulation cellulaire excessive ou anormale faisant suite à une agression extérieure. Lorsque la réaction inflammatoire est dans sa phase aiguë, elle contribue à la réparation de l'intégrité physique du sujet, mais si elle persiste elle devient chronique et aboutit à la perte de fonctionnalité des tissus et organes concernés. Cette perte de fonctionnalité est décrite dans les manifestations rhumatismales articulaires mais ce phénomène pathologique peut être réduit par l'utilisation de thérapeutiques anti-inflammatoires comme les corticoïdes ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). L'action de ces anti-inflammatoires est basée sur le blocage de certaines voies du métabolisme notamment celui du métabolisme de l'acide arachidonique.

1. Métabolisme de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique (AA) ou acide 5, 8, 11, 14-eicosatétraénoïque est un acide gras polyinsaturé essentiel synthétisé à partir de l'acide linoléique apporté par l'alimentation. Cet acide gras n'est peu ou pas présent à l'état libre dans le cytoplasme des cellules animales. Il est estérifié dans les phospholipides membranaires en position β (ou 2-acylglycérol) et se trouve en permanence transféré entre les différents compartiments cellulaires et lipides membranaires (Chilton *et al.*, 1996).

La principale voie de libération de l'AA des phospholipides membranaires est médiée par les phospholipases A_2 ou PLA_2 qui sont des estérases hydrolysant la liaison ester des phosphoglycérolipides membranaires, permettant ainsi la libération d'un acide gras libre et d'un lysophospholipide (Figure 12). La PLA_2 cytosolique ($cPLA_2$) est une enzyme de 85 kDa principalement impliquée dans la libération de l'AA utilisé au cours de la synthèse des eicosanoïdes. Sous l'influence de divers stimuli, l'interaction ligand/récepteur conduit à l'activation de la $cPLA_2$ par l'augmentation du flux intracellulaire de calcium, via la voie du diacylglycérol (DAG), de l'inositol 1, 4, 5, tri-phosphate (IP_3) et l'action de la calmoduline. Cette activation implique la translocation de l'enzyme du cytoplasme vers la membrane nucléaire où elle se fixe aux phospholipides, grâce à son domaine de liaison et à la présence de calcium. Elle catalyse alors la libération de l'AA qui est pris en charge à ce niveau par les différents systèmes de synthèse des eicosanoïdes (Chilton *et al.*, 1996 ; Pouliot *et al.*, 1996).

Les formes solubles des PLA_2 (14 kDa) sont sécrétées principalement par les macrophages

dans l'espace intercellulaire et sont impliquées dans la libération de l'AA contenu dans les membranes altérées du foyer inflammatoire.

Une fois libéré des phospholipides membranaires, l'AA est métabolisé par divers systèmes enzymatiques permettant la synthèse de composés biologiquement actifs nommés eicosanoïdes comprenant les prostaglandines et les leucotriènes. Ces composés interviennent au cours des manifestations inflammatoires, de l'immunité, de la carcinogénèse ou dans la régulation des fonctions biologiques rénales, gastrointestinales ou nerveuses.

Les principales voies du métabolisme de l'AA sont la voie des cyclooxygénases (COX) et la voie des lipoxygénases (LO). Les COX sont responsables de la synthèse des prostaglandines (PG), thromboxanes (TX) et prostacyclines et la 5-LO est principalement responsable de la synthèse des leucotriènes comme l'indique la Figure 12.

1.1. Les cyclooxygénases ou COX

Les cyclooxygénases (prostaglandine endoperoxyde G/H synthases ou PGHS) sont les enzymes clés de la synthèse des prostanoïdes à partir d'acides gras polyinsaturés comme l'AA. Le terme prostanoïdes désigne l'ensemble des composés issus de la voie des COXs qui sont les prostaglandines (PGH₂, PGG₂, PGD₂, PGE₂, PGF₂α), les thromboxanes (TXA₂, TXB₂) et les prostacyclines (PGI₂, 6-céto-PGF₁α), et de façon minoritaire le 12-S-hydroxy-5, 8, 10-hepta-décatriénoïque (12-HHT) et le malondialdéhyde qui a un fort potentiel mutagène (Figure 12).

1. 1. 1. Les gènes codant pour les COXs

Les COXs existent sous deux isoformes, de structures et de fonctions proches mais elles sont codées par des gènes différents (Smith et *al.*, 2000b). En effet, les gènes des deux COXs ne sont pas présents sur le même chromosome et ne contiennent pas le même nombre d'exons et d'introns. De plus, le promoteur de COX-2 possède plusieurs éléments de réponse à des facteurs de transcription dont les éléments de réponse à NFκB, AP-2 et NF-IL-6, contrairement au promoteur de COX-1 qui ne contient que deux éléments cis-régulateurs Sp1 (Yamamoto et *al.*, 1998) (Figure 13). La COX-1, dont l'expression est constitutive, est codée par un gène dit «domestique» comme l'indique la présence d'une séquence riche en paires de bases GC au niveau de son promoteur. La COX-2 est codée par un gène inductible, la taille réduite de ce gène caractérise les gènes à réponse immédiate et facilite la transcription et la maturation rapide après induction de l'expression.

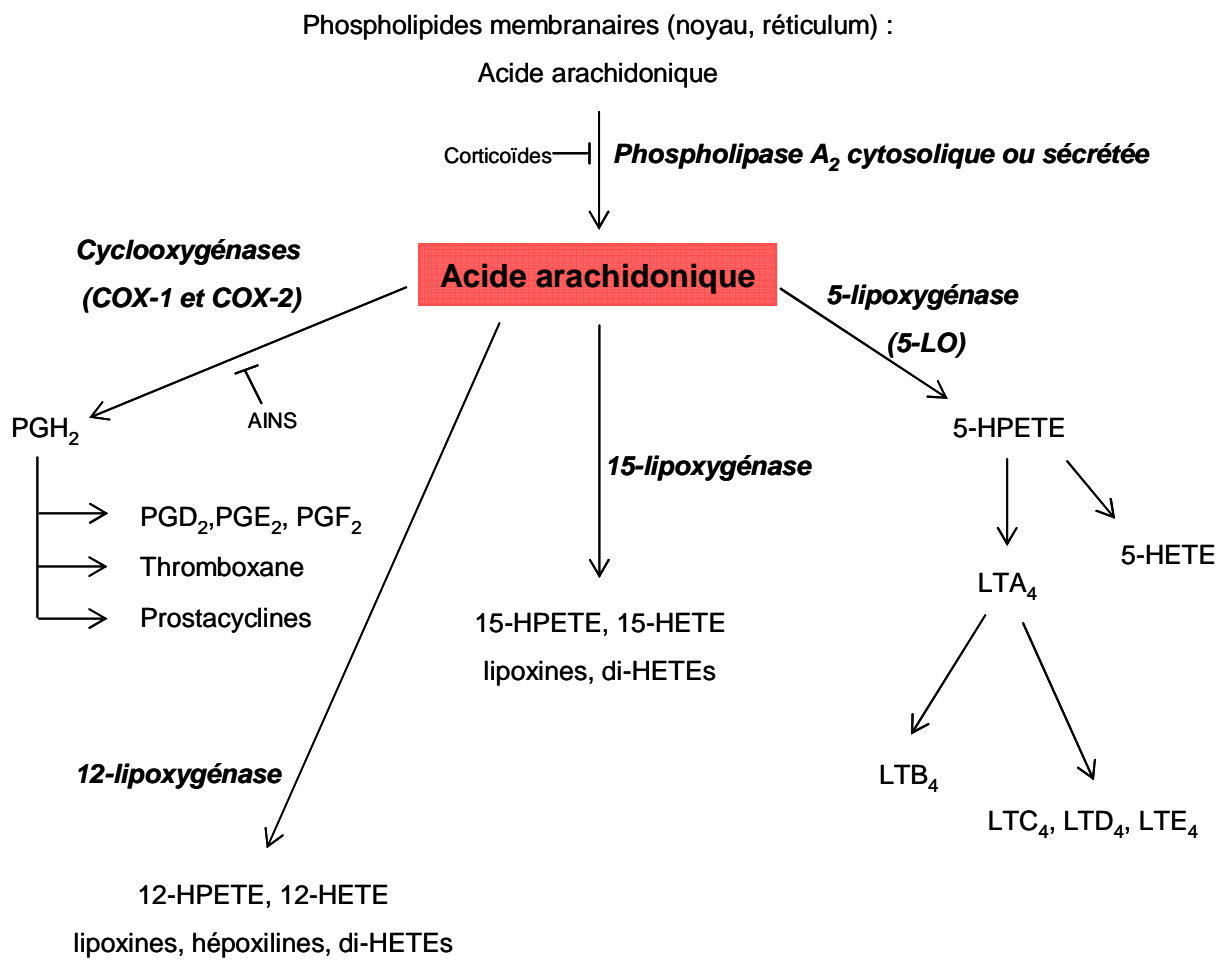


Fig. 12 : Métabolisme de l'acide arachidonique (d'après Chilton et *al.*, 1996)

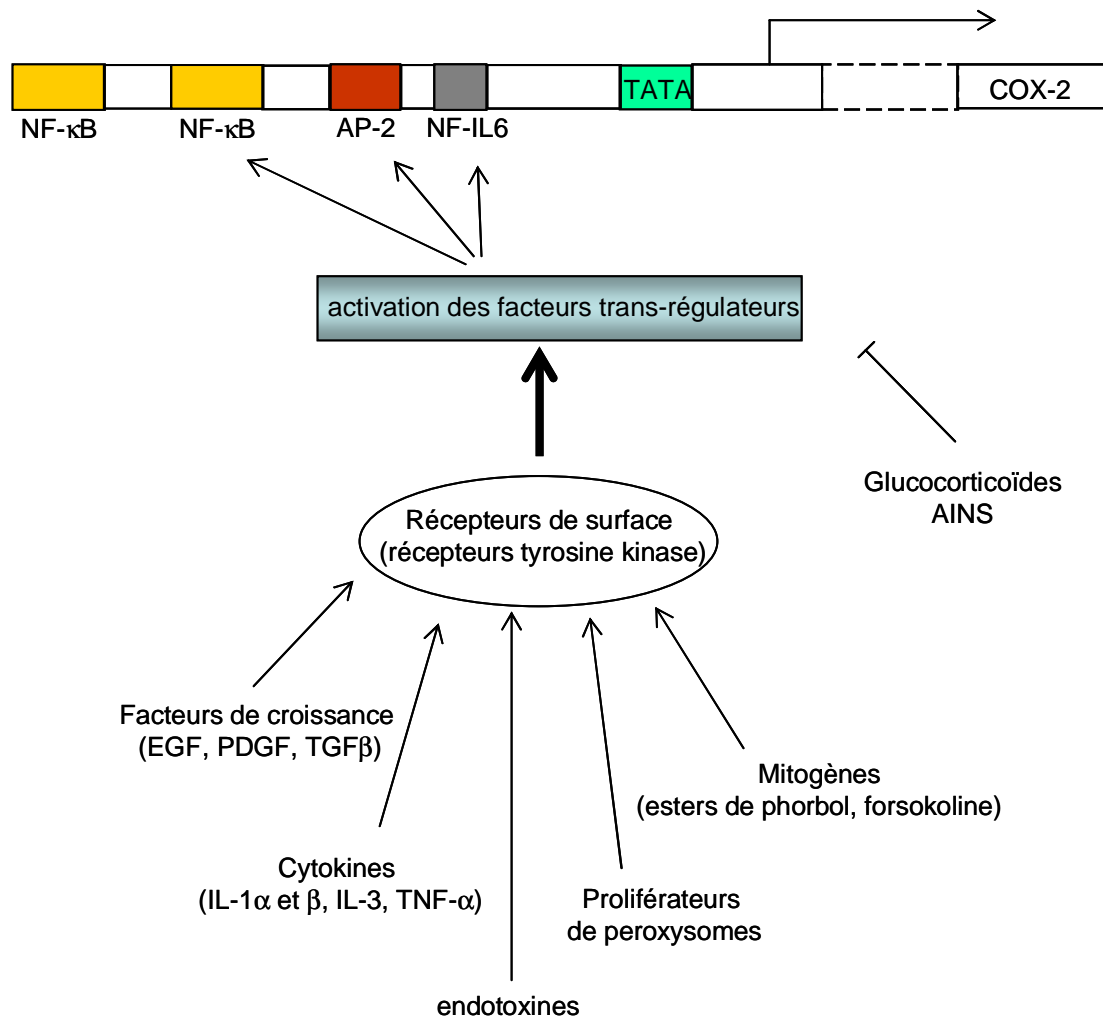
1. 1. 2. Structure des protéines COXs

Les COXs sont des enzymes homodimériques glycosylées contenant un groupement protoporphyrine IX à fer ferrique, localisées au niveau du réticulum endoplasmique (Newton *et al.*, 1998). La COX-2 est également présente dans le noyau. Les protéines COX-1 et COX-2 glycosylées matures ont un poids moléculaire de 67 kDa et 72 kDa respectivement (Garavito, 1996). Elles sont constituées de trois domaines : un domaine amino-terminal contenant un site de liaison à l'EGF («epidermal growth factor»), un domaine de liaison contenant quatre hélices amphipathiques et le site catalytique globulaire (Battu et Beneytout, 1997). Les COXs présentent une homologie de séquence de 60% qui traduit une légère variation structurale conduisant à d'importantes modifications d'activités enzymatiques et pharmacologiques. Chaque protéine est bifonctionnelle et présente une activité cyclooxygénasique et peroxydasique. La première étape de la réaction de métabolisation de l'AA correspond à l'insertion de deux molécules d'oxygène conduisant à la formation d'un endoperoxyde instable, la PGG₂. Sous l'action du site peroxydasique de l'enzyme, la PGG₂ est réduite en PGH₂. Cette dernière, également instable, constitue le précurseur de la synthèse des autres prostanoides (prostaglandines, thromboxanes et prostacyclines) (Figure 12).

1. 1. 3. Les différentes isoformes de COX

COX-1 est décrite comme une enzyme exprimée de façon constitutive et est ubiquitaire. Les prostanoides qu'elle synthétise sont facilement sécrétés et participent au maintien de l'homéostasie, à la coagulation, aux fonctions rénales et gastro-intestinales, à la reproduction et à la régulation de l'équilibre immunitaire (Vane *et al.*, 1998 ; Harizi *et al.*, 2001). COX-1 est fortement exprimée dans les plaquettes, les cellules endothéliales vasculaires, les macrophages, les glandes séminales. Le niveau d'expression de COX-1 peut être augmenté en fonction du type cellulaire par l'IL-1 et les esters de phorbols.

COX-2 est la forme inductible, son expression en absence de stimulus particulier comme l'inflammation n'est observée que dans certains tissus (cerveau, estomac, rein et endothélium vasculaire) (Seibert *et al.*, 1997). En plus d'une localisation dans le réticulum endoplasmique, COX-2 est présente dans la membrane nucléaire. Les prostanoides synthétisés à ce niveau seraient alors directement impliqués dans la régulation des phénomènes de réplication et de différenciation cellulaire.



**Fig. 13 : Promoteur du gène COX-2 et induction du gène
(d'après Yamamoto et *al.*, 1998)**

Cette isoforme est induite par un grand nombre de facteurs comme les facteurs de croissance (EGF : «epidermal growth factor», PDGF : «platelet derived growth factor», TGF β : «transforming growth factor β »), les cytokines (IL-1 α et β , IL-3, TNF α), les mitogènes (esters de phorbol, forskoline), les proliférateurs de peroxyosomes, les endotoxines ou le sérum de veau utilisé dans le milieu de culture des cellules (de Leval et *al.*, 2000) (Figure 13). Son expression peut être inhibée en présence de glucocorticoïdes, qui agissent au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Les différents stimuli qui induisent l'expression de COX-2 agissent par des récepteurs membranaires pouvant être des récepteurs tyrosine kinases. Une fois activés, ces récepteurs induisent différentes voies de transduction du signal conduisant à la phosphorylation de facteurs trans-régulateurs (Figure 13). Ces facteurs peuvent alors se fixer sur certaines séquences du promoteur du gène COX-2 et activer sa transcription. De cette façon, l'activation de Ras, des cascades ERK ou JNK aboutissent à la phosphorylation de c-Jun puis à l'activation transcriptionnelle de COX-2.

Les composés synthétisés par la COX-2 sont considérés comme des composés spécifiques des phénomènes pathologiques tels que l'inflammation chronique aiguë, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer ou le cancer du côlon (Battu et Beneytout, 1997). Les prostaglandines jouent un rôle important dans la carcinogénèse puisqu'ils affectent la mitose, la prolifération cellulaire, l'adhésion cellulaire ou encore l'apoptose (Taketo, 1998).

Une nouvelle isoforme de COX a récemment été décrite par Chandrasekharan et *al.* (2002). L'existence de cette nouvelle isoforme de COX a été suggérée en 1972 après une étude montrant que l'acétaminophène inhibait l'activité COX dans des homogénats de cerveau de chien et non dans des homogénats de la rate (Flower et Vane, 1972). Willoughby et *al.* (2000) ont mis en évidence une «COX» qui produisait peu de PGE₂ lors de la réaction inflammatoire induite chez le rat après injection d'une molécule pro-inflammatoire. Cette réponse inflammatoire n'étant pas inhibée par les inhibiteurs connus, ils ont conclu qu'il s'agissait d'une troisième isoforme de COX (Gilroy et *al.*, 1999). L'expression de cette troisième isoforme a été mise en évidence par l'équipe de Simmons (Chandrasekharan et *al.*, 2002). En effet, ces auteurs ont décrit plusieurs variants de COX issus d'épissage alternatif de l'ARNm de COX-1 : l'ARNm de COX-3 et l'ARNm de PCOX-1 («partial COX-1»). Les ARNs de COX-3 et de PCOX-1 ne sont pas épissés correctement ; l'ARNm qui sera traduit contient la séquence correspondante à l'intron 1. COX-3 possède des caractéristiques de structure et d'activité voisines de celles de COX-1 et COX-2. COX-3 est également localisée dans le réticulum endoplasmique où elle est glycosylée afin d'être active. La partie protéique correspondant à l'intron 1 pourrait modifier le repliement et la dimérisation de la protéine. Ces modifications au niveau de la protéine pourraient également

diminuer son activité enzymatique, ce qui expliquerait l'inhibition de cette enzyme par des molécules analgésiques et anti-pyrétiques de faible activité anti-inflammatoire (Schwab *et al.*, 2003). COX-3 est exprimée majoritairement dans le cerveau, surtout dans le cortex cérébral, chez le chien mais aussi chez l'homme (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Cependant, l'expression de COX-3 chez l'homme nécessite un autre mécanisme permettant l'expression de la protéine puisque la séquence correspondant à l'intron 1 n'est pas dans le cadre de lecture permettant la traduction. La protéine PCOX-1 est semblable à COX-3 mais l'absence d'une séquence d'acides aminés au niveau de son domaine catalytique ne lui confère pas d'activité cyclooxygénasique. Les mécanismes de régulation et d'induction de COX-3 ne sont pas encore déterminés mais COX-3 semble être inhibée de façon spécifique par l'acétaminophène.

1.2. Les lipoxygénases ou LO

Les propriétés catalytiques des linoléate oxygène oxydoréductases ou lipoxygénases (LO) ont été largement étudiées. Ces enzymes catalysent la dioxygénation du système cis, cis-1,4 pentadiénique des acides gras polyinsaturés pour former un hydroperoxyde diénique conjugué. Les LO animales jouent un rôle essentiel dans les mécanismes inflammatoires et immunitaires. Ces enzymes sont maintenant bien répertoriées comme étant des 12-, 15-, 5- et 8-LO selon les sites d'oxygénation sur l'AA. En 1974, Hamberg et Samuelsson ont décrit l'existence de la première LO animale, une 12-LO, dans les plaquettes humaines et depuis des activités 5-LO et 15-LO ont été décrites dans de nombreuses cellules, tissus et organes de différentes espèces animales. Le substrat préférentiel des LO animales est l'acide arachidonique.

La 5-LO cytoplasmique est une protéine de 78 kDa, localisée dans les macrophages, les mastocytes, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Elle est transloquée vers les membranes telle que la membrane nucléaire grâce à l'influx calcique provoqué par l'activation cellulaire. Sa fixation aux membranes et son activation nécessitent du calcium, de l'ATP et la FLAP (pour « five-lipoxygenase-activating-protein »). La 5-LO transforme l'AA à l'aide de la FLAP qui est une protéine transmembranaire et qui favorise la fixation de la 5-LO à la membrane (Battu *et al.*, 1998b). La 5-LO catalyse successivement la transformation de l'AA en acide 5-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque ou 5-HPETE, lui-même transformé en acide 5,6-époxyeicosatétraénoïque nommé leucotriène A₄ ou LTA₄. Sous l'influence de la glutathion peroxydase, le 5-HPETE peut être réduit en acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque ou 5-HETE (Figure 12). Les autres LT vont être synthétisés à partir du LTA₄ par deux voies distinctes. La LTA₄ hydrolase transforme le LTA₄ en acide 5,12-dihydroxyeicosatétraénoïque ou LTB₄ par

rupture de la liaison époxyde grâce à une molécule d'eau (Figure 12). La leucotriène C₄ synthétase qui est une glutathion-S-transférase transforme le LTA₄ en acide 5-hydroxy-6-glutathionyl-eicosatétraénoïque ou LTC₄, premier des sulfidopeptidoleucotriènes avec le LTD₄ et LTE₄ (Figure 12).

La 15-LO de réticulocytes humains est une protéine de 74,6 kDa qui présente un caractère hydrophile en accord avec sa localisation cytosolique (Sigal et *al.*, 1998). Elle est également localisée dans les cellules épithéliales des voies aériennes et dans les macrophages. La 15-LO convertit l'AA en acide 15-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque ou 15-HPETE mais elle peut aussi catalyser la dioxygénation d'autres acides gras polyinsaturés comme l'acide linoléique ou l'acide eicosapentaénoïque. Le 15-HPETE peut être transformé en acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque (15-HETE) par l'action d'une glutathion peroxydase mais aussi en dérivés époxydes, dihydroxylés et trihydroxylés (Figure 12). La 15-LO peut également produire du 12-hydroxyperoxyeicosatétraénoïque (12-HPETE) mais de façon minoritaire.

La 12-LO a été la première LO animale découverte, c'est une protéine d'environ 75 kDa. Deux isoformes ont été mises en évidence, la 12-LO de type plaquettaire et la 12-LO de type leucocytaire selon leur spécificité de substrat (Yoshimoto et *al.*, 1992). Elle est également présente dans les polynucléaires neutrophiles, les macrophages ou les muscles lisses. La 12-LO catalyse la transformation de l'AA en 12-HPETE et possède une activité LTA₄ synthétase (Yamamoto et *al.*, 1987). Le 12-HPETE est réduit par une glutathion peroxydase en acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque (12-HETE) (Figure 12). Plus récemment, Kinzig et *al.* (1997) ont mis en évidence une nouvelle isoforme de 12-LO de type épidermal chez la souris.

2. Rôle des cyclooxygénases dans la prolifération des cellules cancéreuses et dans l'apoptose

La cyclooxygénase-2 (COX-2) semble jouer un rôle important dans la carcinogénèse. En effet, plusieurs travaux sur différentes lignées cancéreuses mettent en évidence que COX-2 est fortement exprimée dans ces cellules (Badawi et Badr, 2002). Cette surexpression altère l'adhésion cellulaire, inhibe l'apoptose et altère la réponse aux signaux régulant la croissance cellulaire (Tsuji et DuBois, 1995 ; Kimura et *al.*, 2000). De plus, COX-2 augmente le taux de VEGF («vascular-endothelial growth factor») ce qui favorise la vascularisation des tumeurs (Mohan et Epstein, 2003). COX-2 diminue également le taux d'expression de la cadhérine E, une molécule

d'adhésion favorisant le développement des métastases (Costa et *al.*, 2002).

2. 1. Surexpression de COX-2 dans les cellules cancéreuses

2. 1. 1. Surexpression de COX-2 dans les cancers du côlon

Plusieurs études ont montré que COX-2 était fortement exprimée dans les cancers de l'appareil digestif qui sont très fréquents et très graves malgré les traitements de radiothérapie et de chimiothérapie utilisés (Kutchera et *al.*, 1996 ; Hida et *al.*, 1998 ; Fujita et *al.*, 1998) (Figure 14). La surexpression de COX-2 dans les cellules cancéreuses de côlon est accompagnée d'une augmentation de l'activité de la MMP-2 («matrix metalloprotéinase» de type 2) (Tsuji et *al.*, 1997). La MMP-2 dégrade de nombreux constituants de la matrice extra-cellulaire, étape cruciale dans le développement des métastases. De plus, la surexpression de COX-2 dans les cellules de cancer du côlon a récemment été associée à une diminution de l'expression de la phospholipase A₂, suggérant le rôle d'un dysfonctionnement de la PLA₂ dans la carcinogénèse (Dong et *al.*, 2003). Battu et *al.* (1998a) ont montré une surexpression de COX-2 dans une lignée cellulaire d'adénocarcinome de côlon en absence de sérum, ce qui suggère une expression « constitutive » de l'enzyme comme l'ont également montré Kutchera et *al.* (1996). Le mécanisme d'induction de l'expression de COX-2 en absence de stimulation n'est pas connu mais résulte probablement d'une surexpression de facteurs trans-régulateurs capables de surexprimer COX-2. Cette expression dite « constitutive » serait suffisante pour provoquer une carcinogénèse.

2. 1. 2. Surexpression de COX-2 dans les autres cancers

Les cancers gastriques sont étudiés de façon importante et, ces dernières années, plusieurs auteurs ont mis en évidence le rôle d'*Helicobacter pylori* dans la carcinogénèse, mais aussi la surexpression de COX-2, de l'HGF («Hepatocyte Growth Factor») et de la gastrine, une hormone responsable de la croissance du mucus gastrointestinal (Kim et *al.*, 2000a ; Ohno et *al.*, 2001). De plus, Konturek et *al.* (2003) ont montré que la gastrine induisait l'expression de COX-2 et de l'HGF et activait également la protéine anti-apoptotique Bcl-2 lors de la carcinogénèse gastrique (Figure 14).

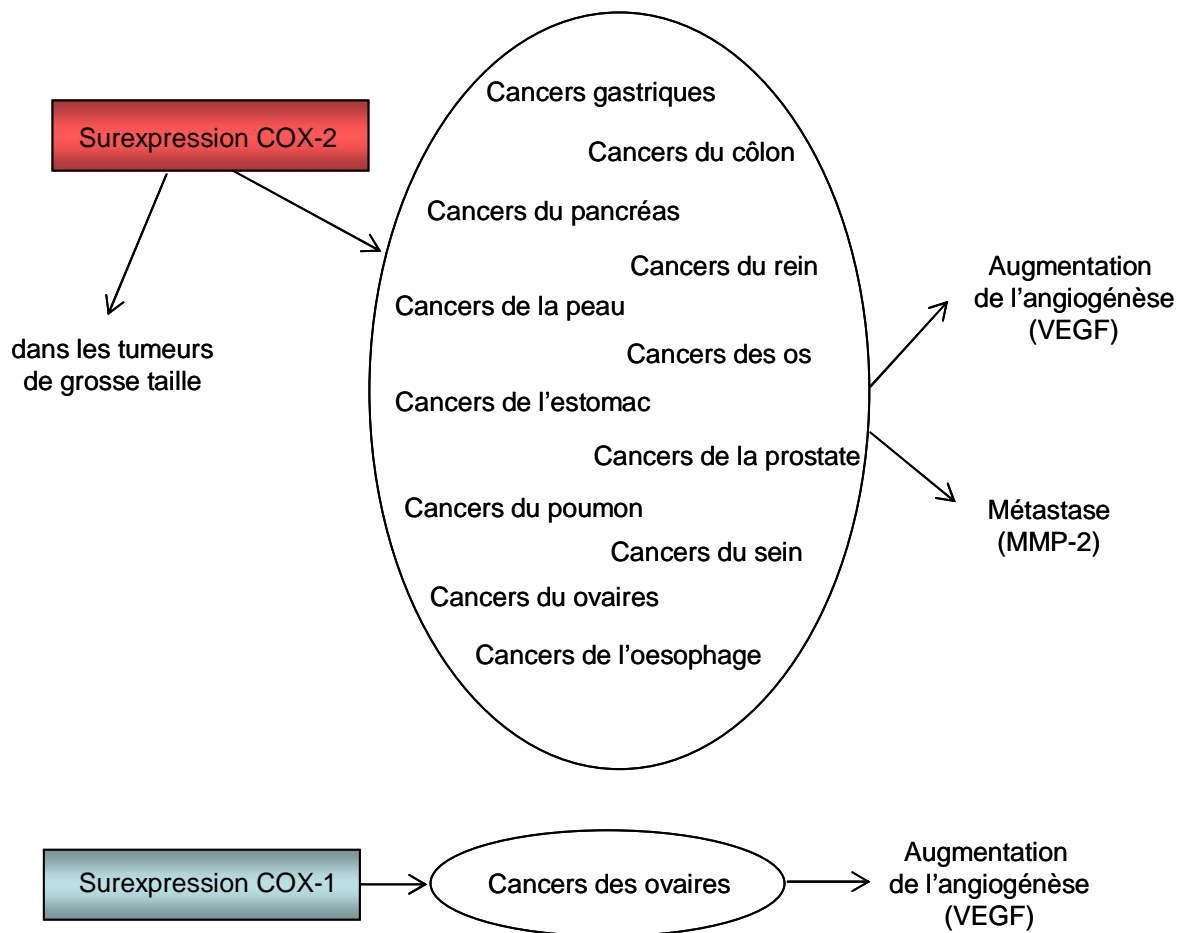


Fig. 14 : Surexpression des COXs dans les cancers

Dans les cellules de la peau, l'expression de COX-2 est très faible alors que, dans les cellules cancéreuses, elle est fortement induite et participe au développement du cancer de la peau (Muller-Decker et *al.*, 1999 ; Higashi et *al.*, 2000). La même observation a été faite dans les cellules d'ostéosarcome dans lesquelles l'expression importante de COX-2 pourrait s'expliquer par une régulation autocrine de l'enzyme par la PGE₂ et par d'autres prostaglandines (Wong et *al.*, 1997) (Figure 14).

La surproduction de PGE₂ a été décrite dans de nombreux autres cancers comme le cancer du pancréas (Kokawa et *al.*, 2001), de l'estomac (van Rees et *al.*, 2002), le cancer de la prostate (Gupta et *al.*, 2000 ; Fujita et *al.*, 2002), le cancer du poumon (Hasturk et *al.*, 2002 ; Sanchez-Alcazar et *al.*, 2003), les cancers du sein (Soslow et *al.*, 2000 ; Ristimaki et *al.*, 2002), les cancers des ovaires (Matsumoto et *al.*, 2001 ; Denkert et *al.*, 2002) ou le cancer de l'oesophage (Buskens et *al.*, 2002) (Figure 14).

2. 1. 3. Surexpression de COX et taille des tumeurs

La surexpression de COX-2 dans plusieurs cancers est souvent associée à la taille de la tumeur (Figure 14). En effet, Vidal et *al.* (2003) ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'expression de COX-2 et la prolifération des cellules de cancers de l'hypophyse mais que l'expression de COX-2 était plus importante dans les adénomes de grosse taille. Cette constatation a également été faite sur des polypes adénomateux à l'origine de cancer du côlon ainsi que sur des tumeurs de la prostate. Yang et *al.* (1998b) décrivent que le taux de prostaglandines reste faible dans les polypes adénomateux jusqu'à ce que la tumeur grossisse. Une étude faite sur plusieurs tumeurs de la prostate montre que COX-1 est fortement exprimée dans ce type de tumeur et que COX-2 est plus ou moins exprimée en fonction du stade de différenciation de l'adénocarcinome (Yoshimura et *al.*, 2000). Cependant, il ne semble pas y avoir de relation entre la taille ou le stade de la tumeur et l'expression de COX-2 dans les cancers des ovaires (Shigemasa et *al.*, 2003).

2. 1. 4. Surexpression de COX-1

Une surexpression de COX-1 a été décrite par Dore et *al.* (1998) dans des adénocarcinomes ovariens. De plus, de récentes analyses d'hybridation *in-situ* et d'immunohistochimie ont montré une expression élevée de COX-1 dans plusieurs types de cancers des ovaires (Gupta et *al.*, 2003). Cette équipe a rapporté que la production élevée de prostaglandines, dans une lignée cancéreuse ovarienne surexprimant COX-1, était réduite par un inhibiteur sélectif de COX-1. De plus, cet inhibiteur réduit la sécrétion de VEGF, suggérant que COX-1 joue un rôle dans l'angiogénèse de

cancers ovariens (Figure 14). Rioux et Castonguay (2000) ont également décrit une surexpression de COX-1 et non de COX-2 après transformation de macrophages par une molécule carcinogène extraite du tabac. De plus, cette molécule produit, par différents métabolismes, des radicaux libres oxygénés (RLO) qui activent le facteur de transcription NF- κ B.

2. 2. Induction de COX-2 et rôle de la PGE₂ dans les cellules cancéreuses

2. 2. 1. Induction de COX-2

L'augmentation d'expression de COX-2 dans les cancers est due à une augmentation de la transcription (Kutchera et *al.*, 1996) et de la traduction (Ristimaki et *al.*, 1994). Il est bien connu que COX-2 est fortement induite par l'IL-1, cette interleukine agissant en se fixant au récepteur de membrane IL-1RI (Figure 15). L'interaction entre IL-1 et son récepteur active une cascade de kinases qui va provoquer la phosphorylation de I- κ B et par conséquent activer le facteur de transcription NF- κ B (Zhang et *al.*, 1999). Ce facteur va induire la transcription de COX-2 en se liant à l'élément de réponse situé sur le promoteur du gène de COX-2 (Schmedtje et *al.*, 1997). Faour et *al.* (2001) ont montré que la PGE₂ exerçait un rétrocontrôle positif sur l'expression de COX-2 en activant le récepteur de prostaglandine EP4 et en induisant la voie de signalisation de la kinase p38 (Figure 15). Plusieurs auteurs ont montré que la MAPK p38 activait la transcription du messenger de COX-2 mais augmentait également sa stabilité (Lasa et *al.*, 2000). La séquence en 3' du messenger de COX-2 qui est une séquence riche en paire de bases AU appelé ARE (« AU-rich element ») joue un rôle important dans la stabilité du messenger, dans l'efficacité de la traduction ainsi que dans la dégradation rapide de la protéine (Dixon et *al.*, 2000). Le rôle de la stabilité du messenger dans l'augmentation de l'expression de COX-2 a été également montré dans des cellules épithéliales transformées par Ras et stimulées par le TGF- β (Sheng et *al.*, 2000). De plus, Shao et *al.* (2000) ont montré l'implication des voies de signalisation MAPK, PKB et l'importance des protéines de la famille Rho dans l'induction de COX-2 dans des lignées de cancer du côlon. De plus, des études réalisées *in vitro* suggèrent que le gène de COX-2 possède un élément de réponse à l'hypoxie au niveau de son promoteur.

Par conséquent, une hypoxie dans des cellules endothéliales vasculaires induit expression de COX-2 et favorise alors la vascularisation des tumeurs en activant la production de VEGF (Schmedtje et *al.*, 1997).

Fig. 15 : Quelques voies d'induction de COX-2 dans les cancers

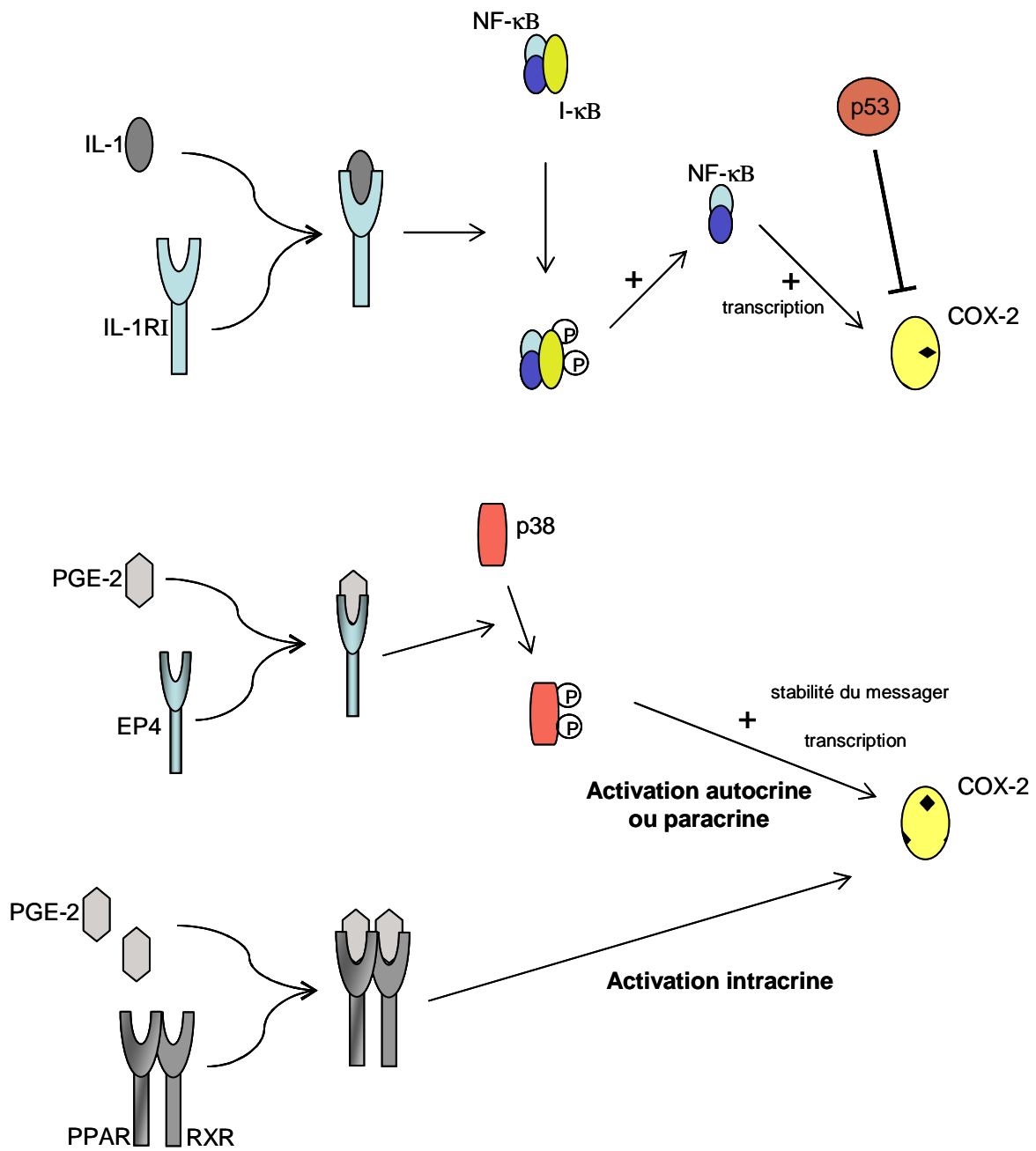


Fig.15 : Quelques voies d'induction de COX-2 dans les cancers

Le mécanisme d'induction de COX-2 et son rôle dans les cancers sont encore indéterminés, mais son expression (ARNm et protéine) peut être inhibée par la protéine p53 sauvage comme l'ont décrit Subbaramaiah *et al.* (1999) (Figure 15). Récemment, Shigemasa *et al.* (2003) ont examiné l'expression de COX-2 ainsi que l'accumulation de p53 mutée dans le noyau de cellules d'adénocarcinomes ovariens et ont rapporté que ces deux évènements étaient associés. Par conséquent, l'augmentation d'expression de COX-2 peut être due à une déficience dans l'expression de p53. La même observation a été faite sur des cellules cancéreuses gastriques mais le mécanisme par lequel ces deux protéines favorisent la carcinogénèse n'est pas encore connu (Shun *et al.*, 2003).

2. 2. 2. Rôle des métabolites de COX-2

Les prostaglandines agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires couplés aux protéines G et modulent la quantité d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et de Ca^{2+} (Badawi et Badr, 2002). Les prostaglandines peuvent favoriser le développement de cancers par différents mécanismes. En effet, les prostaglandines contrôlent la prolifération cellulaire (Hakeda *et al.*, 1991) et rendent les cellules résistantes à l'induction de l'apoptose (Tsuji et DuBois, 1995 ; Kroll *et al.*, 1998). Les prostaglandines sont également impliquées dans l'échappement immunitaire associée aux tumeurs, elles favorisent l'angiogénèse et l'adhésion cellulaire (Tsuji et DuBois, 1995 ; Bamba *et al.*, 2000).

Les prostaglandines peuvent agir par des récepteurs de surface comme les récepteurs de la PGE_2 (EP4) (activation autocrine ou paracrine) mais aussi par des récepteurs nucléaires comme les récepteurs de proliférateurs de peroxydase (PPARs) (activation « intracrine ») (Sarraf *et al.*, 1998 ; Saez *et al.*, 1998) (Figure 15).

La PGE_2 et les autres métabolites produits après induction de COX-2 peuvent accélérer le mécanisme de cancérisation ou induire l'apoptose selon le type et l'environnement cellulaire. En effet, COX-2 est une oxygénase qui synthétise des composés comme le malondialdéhyde ainsi que des radicaux libres oxygénés très réactifs capables d'agir sur des macromolécules comme l'ADN (Marnett, 1990 ; Kondo *et al.*, 2001) (Figure 16). L'activité peroxydasique de COX-2 contribue à la production d'anions superoxydes qui provoquent de nombreuses altérations dérèglant la régulation de la croissance cellulaire et favorisant la transformation des cellules ou l'apoptose (Chinery *et al.*, 1998).

Fig. 16 : Rôle de COX-2 dans la carcinogénèse et l'apoptose

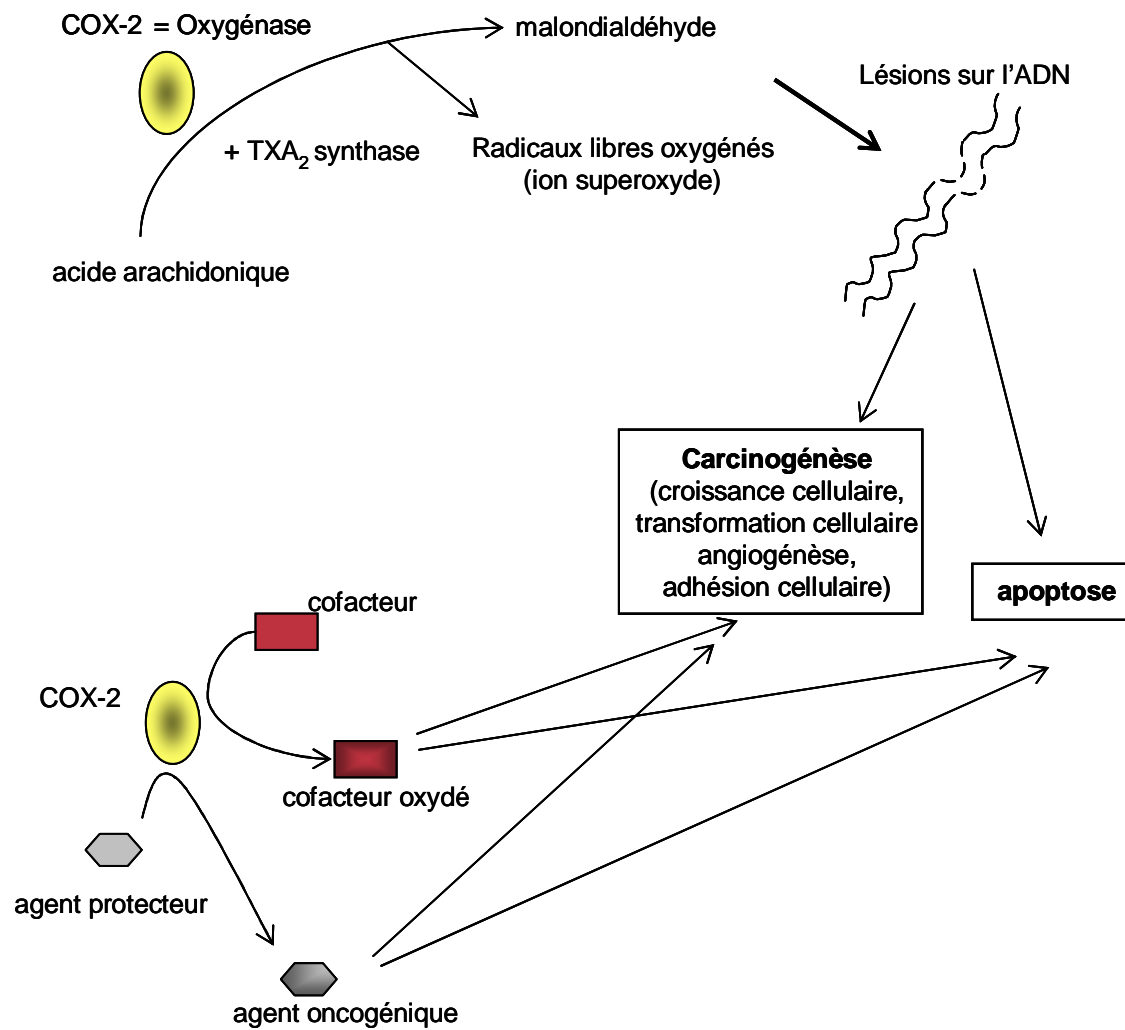


Fig. 16 : Rôle de COX-2 dans la carcinogénèse et l'apoptose

La seconde étape de la réaction réalisée par COX-2 est une réaction de réduction qui nécessite un cofacteur. Ce cofacteur est oxydé par la réaction et peut favoriser la carcinogénèse (Degen, 1990) (Figure 16). Les produits formés par COX-2 altèrent la croissance cellulaire, l'apoptose ou l'angiogénèse (Kim et *al.*, 1993). En effet, l'induction de COX-2 dans les cellules épithéliales de l'intestin augmente l'adhésion des cellules ainsi que leur réponse à des stimuli apoptotiques (Tsujii et DuBois, 1995). De plus, la PGE₂ inhibe la mort cellulaire en induisant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Sheng et *al.*, 1998 ; Loro et *al.*, 2002). Il est également possible que COX-2 dégrade un agent protecteur et génère un agent oncogénique. Plusieurs travaux ont décrit qu'une forte concentration d'AA exogène peut provoquer l'apoptose, indépendamment de la formation de prostaglandines (Surette et *al.*, 1996 ; Surette et *al.*, 1999 ; Longo et *al.*, 1999). Il est possible que l'expression de COX-2 soit augmentée afin de réduire la quantité d'AA dans la cellule et prévenir de l'apoptose.

2. 3. Rôle de COX-2 dans les maladies neurodégénératives

L'expression et l'activité de COX-2 sont induites dans les cellules cancéreuses et sont inhibées lors de l'apoptose provoquée par des AINS. Cependant, l'expression de COX-2 peut être induite au cours de l'apoptose se produisant dans les maladies neurodégénératives. En effet, plusieurs travaux ont décrit que l'expression de COX-2 était régulée dans les neurones par l'activité synaptique et par les glucocorticoïdes mais que son expression et non celle de COX-1 était fortement induite dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Yokota et *al.*, 2003). Cette constatation suggère que COX-2 pourrait avoir un rôle dans la mort cellulaire des neurones (Pasinetti, 1998). Ho et *al.* (1998) ont décrit une induction de l'expression de l'ARNm de COX-2 et non de COX-1 dans les cellules nerveuses apoptotiques *in vivo* et *in vitro*. Cette induction précède l'apoptose induite par la privation en sérum, ce qui suggère qu'elle aurait un rôle dans les mécanismes conduisant à l'apoptose.

2. 4. Effet de l'inhibition de l'expression de COX-2 par les AINS

2. 4. 1. Effet anti-tumoral : mécanisme dépendant ou indépendant de COX-2 ?

Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 et les inhibiteurs non sélectifs peuvent ralentir la carcinogénèse ou même l'empêcher en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses et en induisant l'apoptose dans ces cellules, ce qui met en évidence leur effet anti-tumoral (Qiao et *al.*, 1997 ; Liu et *al.*, 1998 ; Marnett, 2002). Pour cette raison, les AINS sont très étudiés car ils

pourraient augmenter la réussite des traitements de chimiothérapie et de radiothérapie. Cependant, l'importance de l'inhibition des COXs dans l'activité anti-cancéreuse des AINS est controversée (Elder et *al.*, 1997). En effet, le sulfone de sulindac qui n'inhibe pas les COXs possède également des effets anti-prolifératif et pro-apoptotique (Piazza et *al.*, 1997).

Des études épidémiologiques ont montré que la prise d'AINS réduisait le développement du cancer du côlon et le développement tumoral de polypes adénomateux bénins (Gupta et DuBois, 2001 ; Xu, 2002).

Le NS-398, un inhibiteur sélectif de COX-2, réduit la prolifération cellulaire et induit l'apoptose dans les cellules d'hépatocarcinomes exprimant COX-2 et non dans celles qui ne l'expriment pas (Cheng et *al.*, 2002). Toutefois, Smith et *al.* (2000a) ont montré que le NS-398 inhibait la prolifération des cellules cancéreuses de côlon en partie par l'inhibition de COX-2 mais ils ont également décrit que l'indométacine exerçait son activité anti-proliférative de façon indépendante de COX-2. Sanchez-Alcazar et *al.* (2003) ont montré que l'indométacine et le NS-398 inhibaient la production de PGE₂ dans les cellules exprimant COX-2. Néanmoins, à de fortes concentrations, ces inhibiteurs induisent l'apoptose dans les cellules exprimant ou non COX-2. Le NS-398 a le même effet sur différentes cellules du pancréas mais semble agir en partie par une voie indépendante de COX-2 (Molina et *al.*, 1999). Cependant, dans les cellules d'ostéosarcomes, le NS-398 augmente l'apoptose sans moduler l'expression de COX-2 à de faibles concentrations, alors qu'à de fortes concentrations, il induit COX-2 et provoque un ralentissement du cycle cellulaire mais diminue le taux de cellules apoptotiques (Moalic et *al.*, 2001b).

Récemment, Wu et *al.* (2003) ont montré que l'inhibition de la prolifération de cellules de carcinomes et l'induction de l'apoptose par le célécoxib était un mécanisme dépendant de COX-2. Cependant, une autre étude montre que le célécoxib induit la voie mitochondriale apoptotique indépendamment de sa capacité à inhiber COX-2 (Jendrossek et *al.*, 2003).

Par conséquent, bien que les AINS aient la capacité d'inhiber COX-2 et/ou COX-1, ils exercent leur activité anti-tumorale par différents mécanismes indépendant ou non des COXs.

2. 4. 2. Induction de différentes voies anti-prolifératives par les AINS

Les AINS pourraient agir par l'intermédiaire des PPARs ; en effet, l'indométacine qui inhibe la prolifération de cellules cancéreuses indépendamment de COX-2, active les récepteurs PPAR γ (Lehmann et *al.*, 1997). Cette activation pourrait expliquer l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose observés dans ces cellules (Brockman et *al.*, 1998). De plus, un co-traitement avec le NS-398 et un activateur du récepteur PPAR γ dans des cellules de cancer du sein inhibe la

prolifération cellulaire et induit l'apoptose de façon plus importante que lors d'une inhibition de COX-2 seule ou d'une activation de PPAR γ seule (Michael et *al.*, 2003).

Les AINS pourraient également agir en inhibant la protéine kinase C, les kinases de la famille des MAPK ou moduler l'activité de IKK (Subbaramaiah et *al.*, 2000 ; Tegeder et *al.*, 2001). Chan et *al.* (1998) ont décrit qu'un traitement au sulfide de sulindac ou à l'indométacine sur des carcinomes de côlon produisait une quantité importante d'AA stimulant la conversion de la sphingomyéline en céramide, un puissant inducteur d'apoptose.

En outre, Rigas et Shiff (1999) ont montré que plusieurs AINS utilisés à de fortes concentrations provoquaient un arrêt du cycle cellulaire en diminuant l'expression de différentes cyclines dans les cellules de cancer du côlon. Le traitement des cellules de cancer du côlon par le sulindac et le sulfide de sulindac provoque une augmentation de l'expression de p21^{Waf1} et une diminution consécutive du taux de cyclines A et B ainsi qu'une accumulation de la forme hypophosphorylée de pRb (Goldberg et *al.*, 1996). Cet arrêt du cycle semble être indépendant de l'inhibition des COXs. Cependant, les cellules épithéliales intestinales de rat qui expriment COX-2 de façon stable ont une phase G1 très longue contrairement aux cellules exprimant peu COX-2 (DuBois et *al.*, 1996). De plus, ces auteurs ont montré qu'il existait une relation inverse entre l'expression de COX-2 et l'expression de la cycline D. Le fait que les cellules restent longtemps en phase G₁ pourrait éviter à la cellule de rentrer en apoptose.

2. 5. PPARs et COX-2

Les peroxysomes sont des organites impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires essentiels comme la respiration cellulaire, l'homéostasie du glucose, le métabolisme lipidique ou la thermogénèse. Ces organites jouent également un rôle important dans certaines maladies comme le diabète, l'athérosclérose, les cancers (Badawi et Badr, 2002). Les inducteurs de la prolifération des peroxysomes provoquent une augmentation de la taille et du nombre de peroxysomes. Ces inducteurs agissent par des récepteurs nommés PPARs pour « peroxisome proliferator-activated receptors ».

2. 5. 1. Généralités sur les PPARs

⇨ *Classification des PPARs*

Les récepteurs activés par les inducteurs de la prolifération des peroxysomes font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes, de la vitamine D et de l'acide rétinoïque (Gelman et *al.*, 1999 ; Yousef et Badr, 2002). Les PPARs sont des facteurs de

transcription qui sont activés par la liaison de certains acides gras et/ou de leurs métabolites lipidiques. Ils pourraient ainsi jouer un rôle déterminant en signalant, au niveau de l'expression génique, un changement de l'apport nutritionnel et, en particulier, de sa composition lipidique (Escher et Wahli, 2000). Activés par la fixation de leurs ligands, les PPARs forment des hétérodimères avec les récepteurs de l'acide rétinoïque 9-cis (RXR) et se fixent sur des éléments de réponses spécifiques (PPRE ou « peroxisome proliferator response element ») au niveau du promoteur de leurs gènes cibles (Kliwer et *al.*, 1992) (Figure 17). Ces éléments de réponse sont généralement formés par la répétition directe du motif hexamérique de reconnaissance des récepteurs nucléaires (AGGTCA) espacé par un nucléotide.

La famille des PPARs comprend trois membres distincts, désignés α , β/δ et γ , chacun codé par un gène différent. D'un point de vue structural, les PPARs sont constitués, comme la plupart des autres récepteurs nucléaires, d'une structure en six domaines fonctionnels (Mangelsdorf et *al.*, 1995). Ces domaines sont bien conservés pour les trois types de PPARs indiquant qu'ils dérivent probablement d'un même gène ancestral.

☞ *Distribution tissulaire des PPARs*

Les différentes formes de PPARs présentent une expression tissulaire spécifique. Chez l'homme, PPAR α est majoritairement exprimé dans le foie et dans le tissu adipeux brun. L'ARNm de PPAR β/δ est retrouvé dans tous les tissus testés chez l'homme, suggérant une répartition ubiquitaire avec, peut-être, une expression plus importante dans le côlon par rapport aux autres tissus testés. PPAR γ est exprimé principalement dans le tissu adipeux et le tractus gastro-intestinal, en particulier dans le côlon, alors qu'il est très faiblement représenté dans le foie ou le muscle squelettique (Braissant et *al.*, 1996 ; Auboeuf et *al.*, 1997). Les PPARs sont également exprimés dans les monocytes/macrophages, les lymphocytes T, ainsi que dans les chondrocytes, les synoviocytes et les ostéoclastes (Bordji et *al.*, 2000 ; Fahmi et *al.*, 2002).

Fig. 17 : Induction et rôle des PPARs

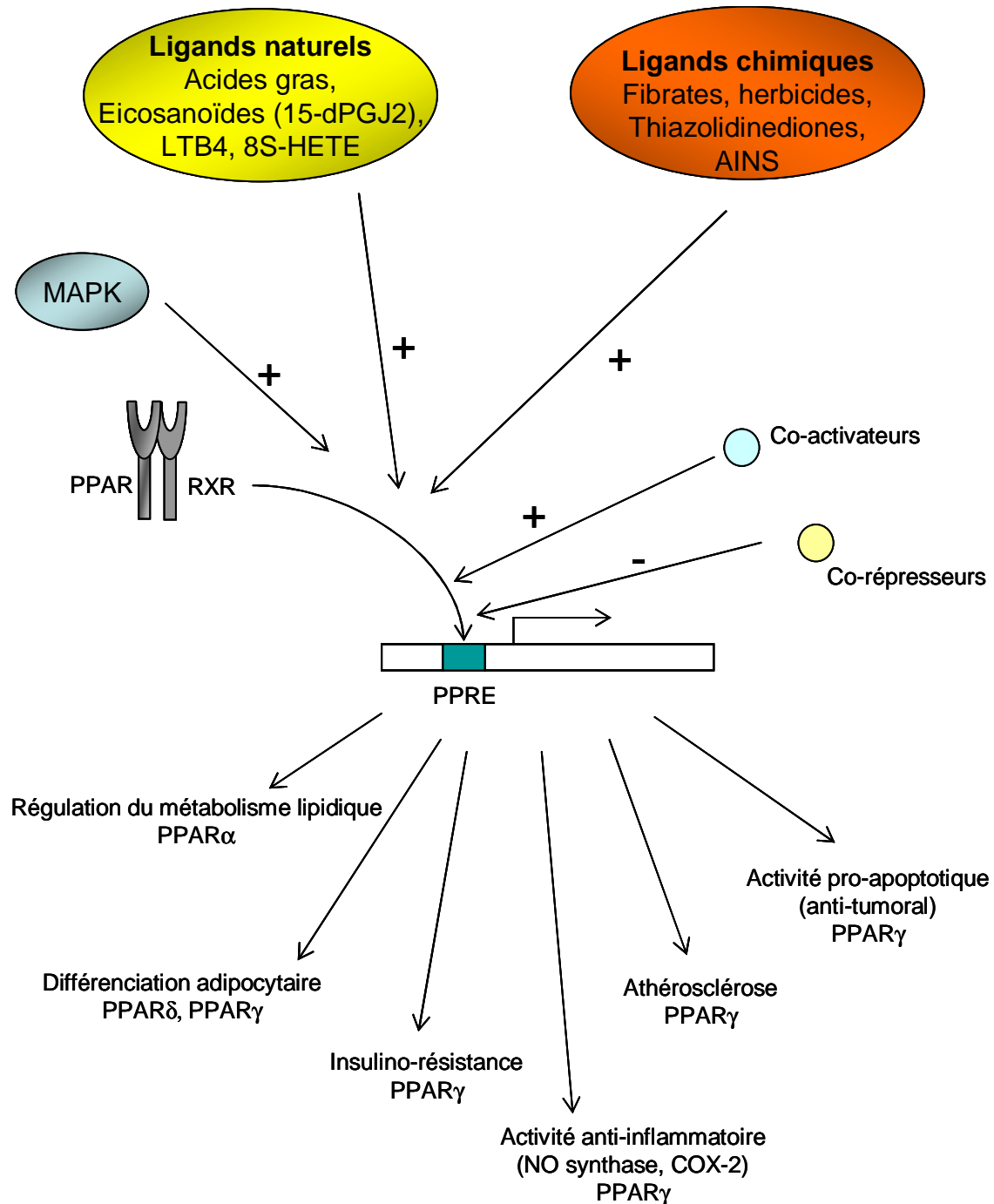


Fig. 17 : Induction et rôle des PPARs

☞ *Ligands des PPARs*

Différents ligands naturels comme les acides gras sont capables de se lier et d'activer les PPARs (Kliwer et *al.*, 1997). L'acide linoléique, par exemple, est un bon activateur et peut induire l'expression des trois types de PPARs (Yu et *al.*, 1995). Il a ensuite été clairement démontré que les eicosanoïdes, en particulier les prostaglandines des séries A, D et J, sont des activateurs des PPARs (Yu et *al.*, 1995) (Figure 17). Néanmoins, l'affinité de ces molécules est généralement faible, suggérant que les véritables ligands naturels des PPARs sont peut-être des métabolites plus rares que les eicosanoïdes. Ainsi, en ce qui concerne PPAR γ , la prostaglandine 15d-désoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15-dPGJ₂), issue de la série J, semble être un ligand plus efficace que ses précurseurs (Maxey et *al.*, 2000). Pour PPAR α , le leukotriène B₄ ainsi que le 8(S)-HETE, issus de la voie des lipoxygénases, ont été identifiés comme des ligands activateurs naturels (Figure 17). Concernant PPAR β , plusieurs acides gras polyinsaturés peuvent l'activer, et la PGI₂ semble être un ligand très efficace.

Différents types de molécules chimiques sont capables de se lier et d'activer les PPARs. Les proliférateurs des peroxyosomes comme le fibrates ou les herbicides sont principalement des activateurs de PPAR α (Yu et *al.*, 1995). Certaines de ces molécules sont même considérées comme agonistes spécifiques de PPAR α , bien qu'à forte concentration, elles puissent aussi activer les autres PPARs. Concernant PPAR γ , une classe particulière de molécules anti-diabétiques, les thiazolidinediones, ont été identifiées comme des ligands très spécifiques. De plus, certains thiazolidinediones comme le pioglitazone, la troglitazone ou la rosiglitazone possèdent des propriétés anti-diabétiques en améliorant la sensibilité à l'insuline, suggérant donc fortement que PPAR γ pourrait jouer un rôle dans l'action de l'insuline et l'insulino-résistance (Lehmann et *al.*, 1995). Concernant PPAR β/δ , peu de ligands synthétiques ont été décrits.

Enfin, il faut noter que plusieurs inhibiteurs des cyclooxygénases comme l'indométacine, l'ibuprofène et quelques autres AINS sont des ligands et des activateurs des trois types de PPARs (Lehmann et *al.*, 1997) (Figure 17).

☞ *Autres mécanismes d'activation des PPARs*

Il a été montré que PPAR α et PPAR γ peuvent être phosphorylés par les MAP kinases (Figure 17). Le site de phosphorylation est situé dans une séquence bien conservée dans les trois PPARs, suggérant que PPAR β/δ pourrait être phosphorylé. De façon intéressante, la phosphorylation augmente l'activité transcriptionnelle de PPAR α (Shalev et *al.*, 1996) et diminue

celle de PPAR γ (Hu et *al.*, 1996).

Enfin, il est important de noter que l'interaction avec des co-facteurs est un mécanisme fondamental de la régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires (Figure 17). En effet, l'activation ou la répression transcriptionnelle du gène cible ne dépend pas que de la liaison de l'hétérodimère avec la séquence PPRE mais requiert également la présence de co-activateurs ou de co-répresseurs. Ceux-ci agissent par interaction avec les hétérodimères et permettent de les lier à la machinerie transcriptionnelle, par conséquent les complexes formés induisent ou répriment la transcription des gènes cibles. Ces co-facteurs comprennent notamment la protéine de choc thermique Hsp70, c-jun, p65 ou la protéine de liaison à PPAR γ nommée PBP (« PPAR γ -binding protein ») (Huang et *al.*, 1994 ; Zhu et *al.*, 1997 ; Delerive et *al.*, 1999).

2. 5. 2. PPARs, COX-2 et cancers

Plusieurs études ont été réalisées sur COX-2 et les PPARs pour expliquer leur implication dans les cancers (Ota et *al.*, 2002). Quelques ligands des PPARs inhibent l'activité COX et provoquent une diminution de la production de PGE₂ (Bonazzi et *al.*, 2000 ; Jiang et *al.*, 2000) ; les PPARs sont par conséquent associés à la régulation de l'expression de COX-2. Plusieurs auteurs ont décrit qu'un ligand de PPAR γ , la 15d-PGJ₂, provoquait une forte inhibition de l'activité de COX-2 (Callejas et *al.*, 1999 ; Inoue et *al.*, 2000). Récemment, Mendez et LaPointe (2003) ont montré que l'induction de COX-2 par l'IL-1 β était inhibée par la 15d-PGJ₂.

Ces observations suggèrent que les métabolites de la PGD₂ comme la 15d-PGJ₂ pourraient exercer un rétrocontrôle négatif de l'expression de COX-2 (Fahmi et *al.*, 2002). Les métabolites de PGD₂, comme la 15d-PGJ₂, fonctionneraient comme des médiateurs de signalisation intracellulaire. La 15d-PGJ₂ en se liant aux récepteurs PPAR γ /RXR induirait une inactivation de NF- κ B, empêchant ainsi l'induction de l'expression de COX-2 (Figure 18). En revanche, la PGE₂ pourrait réguler positivement l'expression de COX-2. En effet, une forte expression de COX-2 permet à la cellule de produire beaucoup de PGE₂, celle-ci induirait l'expression de COX-2 grâce aux récepteurs de PG (EP2 et EP4) (Figure 18).

Fig. 18 : Boucle de régulation COX-2/PPAR

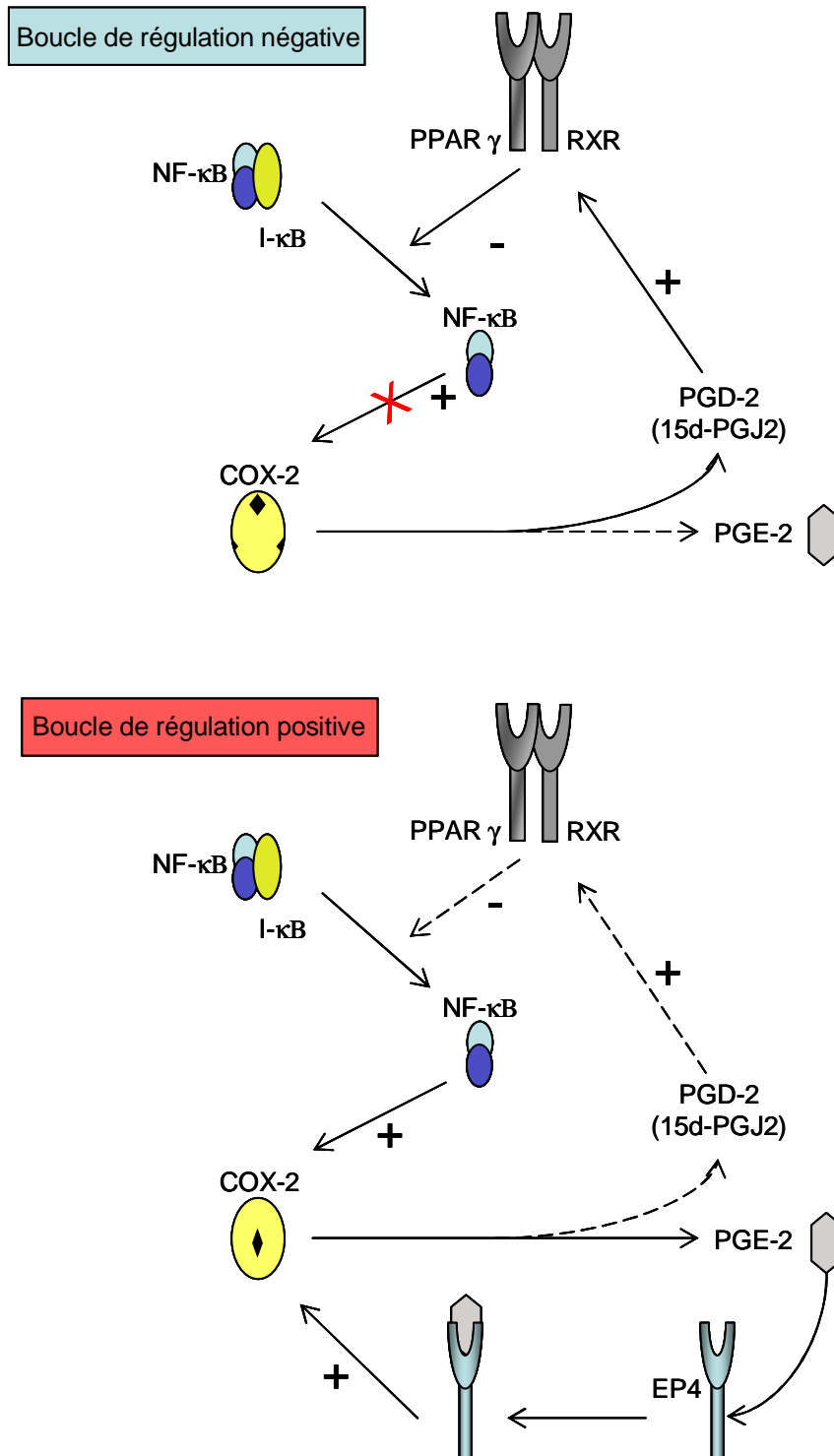


Fig. 18 : Boucle de régulation COX/PPAR

Les protéines COX-2 et PPARs pourraient influencer simultanément l'inflammation par l'intermédiaire de NF- κ B (Straus et *al.*, 2000). L'activation de NF- κ B est généralement liée à une prolifération cellulaire et à une réponse anti-apoptotique. Les ligands de PPARs inhibent l'activation de NF- κ B, ce qui entraîne une régulation négative de l'expression de COX-2 et une diminution de la production de PGE₂. Yang et Frucht (2001) ont montré que l'activation des PPARs inhibait l'expression de COX-2 et induisait l'apoptose dans les cellules de cancers du côlon. L'inhibition de COX-2 et l'activation de PPAR γ réalisées simultanément inhibent la prolifération de cellules cancéreuses de façon synergique (Badawi et Badr, 2002). Cependant, Meade et *al.* (1999) ont montré, dans des cellules épithéliales, que des activateurs de PPARs induisaient COX-2 grâce à un élément de réponse aux PPARs contenu dans le promoteur du gène de COX-2.

IV- Les stéroïdes végétaux

Les premières hormones utilisées en thérapeutique ont été extraites d'organes animaux mais les quantités obtenues étaient faibles. En 1939, la diosgénine, un précurseur, a été mise en évidence en quantité importante dans une dioscorée mexicaine. Ceci a permis le démarrage d'une production industrielle après mise au point d'un processus de dégradation de ce précurseur. La plus grande partie des hormones stéroïdiennes produites par l'industrie pharmaceutique sont maintenant obtenues par hémisynthèse à partir de substances naturelles : saponosides, phytostérols, cholestérol ou acides biliaires.

Le genre *Dioscorea* comprend environ 600 espèces souvent tropicales et la plupart de ces espèces ont un tubercule amylofère à partir duquel la diosgénine est extraite. Dans les tubercules, la diosgénine existe sous la forme de dioscine et d'hétérosides voisins. L'extraction débute par un traitement en milieu acide minéral qui provoque l'hydrolyse des hétérosides. Après filtration, la fraction insoluble est neutralisée, lavée et traitée par un solvant apolaire qui extrait la diosgénine. Actuellement, de nombreux pays tels que la Chine ou l'Inde produisent différentes espèces de dioscorées.

L'hécogénine, une autre molécule intéressante pour la production industrielle d'hormones est extraite des feuilles d'agave cultivées principalement en Afrique de l'est. Cette génine se différencie de la diosgénine par l'absence de la double liaison en C5 et la présence d'un groupe oxo en 12 (Figure 19). Après décortication, les feuilles sont soumises à une fermentation prolongée qui permet l'hydrolyse de certains composés. Les boues insolubles, filtrées et séchées, contiennent l'hécogénine et les autres génines habituellement présentes dans ce type de matière première comme par exemple la tigogénine.

Les stéroïdes végétaux sont de plus en plus étudiés dans le domaine biologique en raison de leur diversité structurale, de leurs activités biologiques (anticholestérolémique, anti-tumorale, antidiabétique ou anti-inflammatoire) et de leur faible toxicité.

Les trois stéroïdes végétaux étudiés, la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine, sont des saponines de structures très proches (Figure 19). La tigogénine se différencie de la diosgénine par l'absence d'insaturation en 5(6) et l'hécogénine se différencie de la tigogénine par un groupement oxo en 12. De ces trois molécules, la diosgénine est la plus étudiée par les scientifiques.

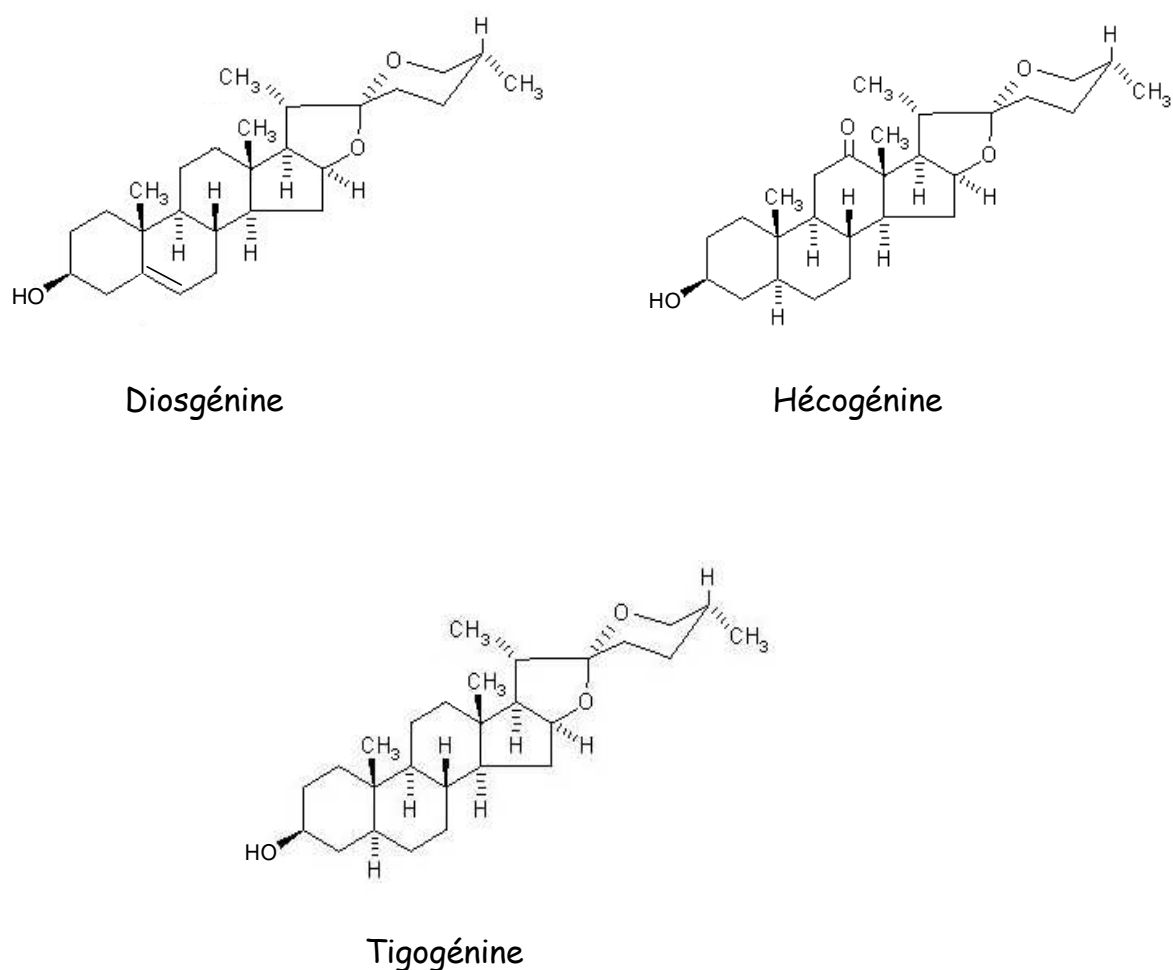


Figure 19 : Structure des trois stéroïdes végétaux étudiés : diosgénine, hécogénine, tigogénine.

Amigo *et al.* (1999) ont montré que la diosgénine augmentait la sécrétion du cholestérol biliaire et que cette sécrétion était accompagnée d'une augmentation de la concentration dans les membranes canaliculaires. Cette observation a été confirmée par Yamaguchi *et al.* (2003) qui ont montré que la diosgénine avait une action cholérétique.

L'effet de la diosgénine sur l'ostéoporose dans des modèles de rates adultes ovariectomisées montre qu'une supplémentation de cette molécule dans l'alimentation pourrait réduire significativement l'ostéoporose (Higdon *et al.*, 2001). Benghuzzi *et al.* (2003) ont montré

qu'une supplémentation en diosgénine chez des rates ovariectomisées entraînait une réduction de la taille des glandes surrénales. Enfin, la diosgénine protège également les reins contre les modifications morphologiques associées aux ovariectomies (Tucci et Benghuzzi, 2003).

Les stéroïdes végétaux comme la diosgénine présentent également des propriétés antioxydantes. En effet, Turchan et *al.* (2003) ont montré que la diosgénine pouvait diminuer significativement les effets des radicaux libres lors de l'infection par le VIH. Un autre travail (Ma et *al.*, 2001) a étudié l'effet de trois molécules (sarsasapogénine, hécogénine et tigogénine) sur la production de radicaux libres après stimulation de neutrophiles humains, ces auteurs ayant montré que la sarsasapogénine diminuait la production de radicaux libres de façon importante.

De plus, après avoir étudié l'effet du cholestérol et des esters de cholestérol sur le métabolisme de l'acide arachidonique dans le laboratoire de Biochimie de la Faculté de Pharmacie de Limoges, différents stéroïdes végétaux ont ensuite été testés sur ce métabolisme. En 1995, Beneytout et *al.* ont montré que le traitement de la lignée de cellules érythroleucémiques (HEL) par la diosgénine induisait la différenciation de ces cellules en mégacaryocytes, différenciation pendant laquelle l'expression de la 15-lipoxygénase était altérée (Nappez et *al.*, 1995).

L'activité anti-tumorale de plusieurs stéroïdes végétaux a été plus récemment étudiée. Une analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée avec des dérivés glycosylés de la diosgénine sur des cellules leucémiques HL60 montrant que l'effet anti-prolifératif dépend de la structure de la molécule étudiée (Mimaki et *al.*, 2001). Deux autres saponines dérivées de la diosgénine, la dioscine et la méthyl-protodioscine, provoquent un effet anti-prolifératif sur les cellules HL60 en induisant une différenciation et l'apoptose (Wang et *al.*, 2001 ; Cheng et *al.*, 2003), mais aussi sur les cellules HeLa en activant les caspases-9 et -3 (Cai et *al.*, 2002).

Matériels et Méthodes

I- Lignées cellulaires, culture et traitements

Les lignées cellulaires étudiées sont les lignées d'ostéosarcome humain (1547), de mélanome humain (M4Beu) et de carcinome de larynx humain (HEp-2).

Les cellules 1547 sont cultivées dans du milieu minimum essentiel contenant des sels de Earle et de l'HEPES (ou N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonique], 25 mM) (Eagle's MEM, Minimum Essential Medium, GibcoBRL). Ce milieu est complété par de la glutamine (2 mM, GibcoBRL), par les antibiotiques pénicilline/streptomycine (100 U/ml et 100 µg/ml, GibcoBRL) et par 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, GibcoBRL). Les cellules M4Beu sont cultivées dans du milieu MEM complété par de la glutamine, de la gentamycine (20 µg/ml, GibcoBRL), des acides aminés non essentiels (1%, GibcoBRL), des vitamines (1%, GibcoBRL) et 10% de SVF. Les cellules HEp-2 sont cultivées dans du milieu de Dulbecco (DMEM, GibcoBRL) complété par de la glutamine, par les antibiotiques pénicilline/streptomycine et 10 % de SVF. Toutes les cellules sont cultivées en atmosphère humide (95 %) avec 5 % de CO₂ dans une étuve thermostatée à 37°C.

Pour toutes les études réalisées, les cellules sontensemencées à une densité de 4000 cellules/cm² pour les cellules 1547, 5000 cellules/cm² pour les cellules M4Beu et 3500 cellules/ml pour les cellules HEp-2 après avoir été décollées du flacon de culture par de la trypsine (Trypsine-EDTA, GibcoBRL) pour les cellules 1547 et M4Beu ou par du tampon versène (GibcoBRL) pour les cellules HEp-2. Les numérations des cellules viables sont réalisées sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu trypan (Sigma) (les cellules blanches étant viables). Les cellules prolifèrent jusqu'à atteindre leur phase exponentielle de croissance (estimée pour les trois lignées à 72 h de prolifération), phase à partir de laquelle les cellules sont traitées ou non par des molécules contenues dans du milieu à 10 % de SVF.

Les solutions mères de diosgénine ((25R)-spirost-5-ène-3β-ol, Sigma), d'hécogénine ((25R)-3β-hydroxy-5α-spirostan-12-one, Sigma) et de tigogénine ((25R)-5α-spirostan-3β-ol, Sigma) à 10⁻² M sont préparées dans l'éthanol puis diluées dans le milieu de culture à 10 % de SVF pour obtenir les concentrations finales voulues (20 à 100 µM). Les cellules contrôles sont traitées par le même volume d'éthanol sans jamais dépasser 1 % d'éthanol et le milieu est renouvelé (milieu avec ou sans molécules) tous les deux jours. Une solution mère de MG132 (Calbiochem®) est préparée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Merck) pour obtenir une concentration finale de 2,1 mM et ensuite diluée dans le milieu de culture à 10 % de SVF pour travailler à 3 µM

(concentration déterminée comme étant l'IC₅₀ inhibant l'activité de NF-κB). La même quantité de DMSO est ajoutée dans les cultures contrôles.

II-Etude de la croissance par le test au MTT

Le test au MTT (Mosmann, 1983) est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables. Il est basé sur la transformation du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés et sont ainsi détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm. Ce test est utilisé pour comparer la croissance des cellules contrôles à celles des cellules traitées par les molécules.

Les cellules (1547, M4Beu, HEp-2) sontensemencées en plaques 96 puits selon la densité déterminée et cultivées pendant 72 h dans 100 µl de milieu contenant 10 % de SVF avant d'être traitées. Pour chaque condition analysée, 6 puits différents sont réalisés (n = 6). Le traitement est réalisé pendant la phase de croissance et dure de 24 à 96 h, le milieu étant changé tous les deux jours.

Pour chaque temps étudié, 10 µl de la solution de MTT (Sigma) (5 mg/ml, en tampon PBS) sont ajoutés dans chaque puits. Après 3 h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, 100 µl d'une solution de lyse (SDS : 10 % ; HCl : 0,01 N) sont ajoutés par puits et les plaques sont incubées à 37°C pendant minimum 3 h afin de libérer les cristaux de formazan formés. L'absorbance est mesurée à 550 nm, par un lecteur de plaques ELISA (Multiskan EX, Labsystems). Les blancs de lecture correspondent à du milieu à 10 % de SVF contenant du MTT et la solution de lyse.

Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle :

$$(\text{DO}_{\text{moyenne}} \text{ des cellules traitées} / \text{DO}_{\text{moyenne}} \text{ des cellules contrôles}) \times 100 \pm \text{écart-type}$$

La morphologie des cellules traitées ou non par les stéroïdes a été observée en microscopie optique à contraste de phase. Pour cela, les cellules sontensemencées en plaque 6 puits, cultivées pendant 72 h puis traitées par de la diosgénine, de l'hécogénine ou de la tigogénine à 40 µM pendant 24 h. Les cellules adhérentes sont rincées par du PBS avant d'être observées au microscope à contraste de phase (grossissement × 400).

III-Extraction et amplification des ARNs

1. Extraction des ARNs totaux

Les ARNs totaux sont extraits des cellules cultivées en milieu à 10% de SVF contenant ou non de la diosgénine, de l'hécogénine, de la tigogénine ou du MG132. La concentration étudiée pour les trois stéroïdes est 40 μM avec des temps de traitement de 6, 12 et 24 h pour la diosgénine, et 12 et 24 h pour l'hécogénine et la tigogénine. Les cellules sont incubées avec 3 μM de MG132 pendant 4, 8 et 24 h. Les temps de traitement ont été déterminés en fonction des résultats obtenus pour la prolifération cellulaire.

L'extraction des ARN totaux est réalisée sur environ cinq millions de cellules par le réactif TRIZOL[®] (GibcoBRL) selon une méthode basée sur la technique de Chomczynski et Sacchi (1987). Avant l'extraction, les cellules flottantes et adhérentes sont récupérées, centrifugées, lavées deux fois dans une solution tampon de phosphate de sodium 1X froid (PBS ; pH 7,4) et de nouveau centrifugées. Le culot cellulaire est lysé par 1 ml de TRIZOL[®] puis 200 μl de chloroforme sont ajoutés avant que le lysat soit agité vigoureusement, laissé à température ambiante pendant 3 min et centrifugé (12000 g, 15 min à 4°C). La phase aqueuse supérieure contenant les ARNs est récupérée afin de précipiter ceux-ci par 500 μl d'alcool isopropylique (10 min à température ambiante) ; l'interface et la phase organique inférieure contenant l'ADN et les protéines ne sont pas utilisées ici. Les ARNs sont récupérés par centrifugation (12000 g, 10 min à 4°C), lavés par de l'éthanol 75%, centrifugés (7500 g, 5 min à 4°C), et séchés. Ils sont ensuite repris dans de l'eau ne contenant pas de RNase avant d'être incubés à 60°C pendant 10 min et dosés par spectrophotométrie UV (BioPhotometer, Eppendorf AG). La concentration en ARN ($\mu\text{g/ml}$) est calculée selon la formule : $\text{DO}_{260} \times \text{dilution} \times 40$. Les ARNs sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

2. Transcription inverse

La transcription inverse ou RT (« reverse transcription ») permet de transcrire l'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase inverse qui synthétise le brin complémentaire d'ADN à partir d'une amorce polydT hybridée avec la queue polyA des ARNm.

La RT est réalisée à l'aide du kit «Omniscript[™] Reverse Transcriptase Kit» (Qiagen) à partir des ARNs totaux. Pour chaque échantillon, 2 μl de tampon de transcription 10X, 2 μl de dNTP (5 mM), 1 μl d'Oligo-dT (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1 μl d'inhibiteur de RNase (10 U/ μl) et 1 μl de transcriptase inverse sont mélangés à 2 μg d'ARNs totaux. Chaque mélange est complété à 20 μl

avec de l'eau dépourvue de RNase avant d'être incubé 1 h à 37°C puis 5 min à 93°C dans le thermocycleur (Tpersonal, Biometra®). Les ADNc ainsi synthétisés sont stockés à -20°C avant utilisation.

3. Réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR est une technique développée par Saiki et *al.* (1985) permettant d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN déterminé. Ici l'amplification se fait sur de l'ADNc et permet donc de détecter le niveau d'expression d'ARNm recherché. La PCR est réalisée à l'aide du kit «HotStarTaq™ DNA Polymerase Kit» (Qiagen) à partir de 2 µl d'ADNc de chaque échantillon en mélangeant 5 µl de tampon de PCR 10X, 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl d'amorce 5' (20 µM), 1 µl d'amorce 3' (20 µM), 0,25 µl de HotStarTaq DNA Polymérase. Le volume du mélange est complété à 50 µl avec de l'eau stérile et les mélanges sont placés dans le thermocycleur pour subir les étapes suivantes :

1/ activation de l'enzyme : 15 min à 95°C (1 cycle),

2/ dénaturation des brins d'ADNc : 45 s à 94°C,

3/ hybridation spécifique des amorces avec les brins d'ADNc : 45 s à température spécifique (T_m) (voir tableau MI),

4/ élongation des brins nouvellement synthétisés : 1 min à 72°C,

Ces 3 dernières étapes sont reproduites plusieurs fois selon les fragments à amplifier (voir le nombre de cycles dans le tableau MI).

5/ terminaison de la synthèse des néobrans : 10 min à 72°C (1 cycle).

L'ADN amplifié est alors stocké à 4°C avant d'être visualisé après électrophorèse en tampon Tris-acétate-EDTA 0,5 X ou TAE (Tris-HCl : 10 mM pH 7,4 ; Acétate : 1 mM ; EDTA : 1 mM) sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthydiu (BET). Les tailles des fragments estimées à l'aide de poids moléculaires (échelle de 100 pb, Invitrogen) sont comparées aux tailles des fragments théoriquement attendues (voir tableau MI). L'ADN amplifié est quantifié de façon semi-quantitative grâce au logiciel Quantity-One (Bio-Rad).

Le tableau MI suivant indique la position des amorces sur les séquences correspondantes de l'ADNc recherché (n° d'accession), la taille des fragments de PCR, ainsi que le nombre de cycle et les températures d'hybridation (T_m) utilisées pour chaque PCR.

ADNc	N° d'accèsion (« GenBank, NCBI »)	Position de l'oligonucléotide 5'	Position de l'oligonucléotide 3'
β-actine	XM_004814	590-611	1132-1158
p21 ^{WAF1/CIP1}	AF265443	430-454	849-873
p53	AH002918	129-151	609-632
Bcl-2	M14745	1386-1405	1829-1848
Bax	L22473	90-110	541-563
COX-1	M59 979	521-544	801-824
COX-2	NM_000963	447-469	867-887
caspase-3	4757911	68-89	499-521
caspase-8	<u>4502582</u>	651-671	879-899
caspase-9	AB020979	380-400	676-695
PPARalpha	<u>7549810</u>	350-370	1137-1158
PPARgamma	<u>18034679</u>	667-690	1165-1190

ADNc	Taille du produit de PCR (pb)	Nombre de cycles de PCR	Tm (°C) des oligo- nucléotides
β-actine	569	35	65
p21 ^{WAF1/CIP1}	444	27	63
p53	504	30	61
Bcl-2	463	27	59
Bax	474	30	66
COX-1	303	35	61
COX-2	443	30	59
caspase-3	454	30	61
caspase-8	249	30	57,8
caspase-9	316	30	59
PPARalpha	809	27	61
PPARgamma	524	31	64

Tableau MI : Caractéristiques des PCR

IV- Analyse de l'expression des protéines

1. Western blotting

1.1 Extraction des protéines totales

Les cellules sontensemencées dans des flacons de culture de 150 cm² selon la densité déterminée auparavant. Après 72 h de prolifération, les cellules sont traitées ou non par 40 µM de diosgénine, d'hécogénine ou de tigogénine pendant 24 h. Les cellules flottantes et les cellules adhérentes sont récupérées, centrifugées, lavées en tampon PBS 1X froid. Les culots cellulaires peuvent être congelés à -80°C si nécessaire. Les cellules sont lysées dans du tampon RIPA (HEPES : 50 mM pH 7.5 ; Déoxycholate : 1 % ; Nonidet P-40 : 1 % ; SDS : 0,1 % ; NaCl : 150 mM ; Aprotinine : 20 µg/ml) contenant 40 µl/ml d'une solution d'inhibiteurs de protéases (Complete™, Roche Diagnostics). Les lysats sont récupérés par centrifugation (12000 rpm, 20 min à 4°C) et placés dans la glace ou à -20°C avant de déterminer la concentration protéique par la technique colorimétrique de Bradford (1976) utilisant le bleu de Coomassie (Bio-Rad). La lecture au spectrophotomètre à 595 nm est effectuée contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : 0 à 12,5 µg/ml).

1.2. Extraction des protéines cytosoliques, mitochondriales et nucléaires.

Le fractionnement subcellulaire a été réalisé à partir du kit 'Mitochondria/Cytosol Fractionation (BioVision). Après traitement avec la diosgénine pendant 6 h, les cellules flottantes et les cellules adhérentes sont récupérées, centrifugées et lavées en tampon PBS 1X froid. Les cellules sont resuspendues dans 500 µl de tampon d'extraction cytosolique et incubées 10 min dans la glace avant d'être broyées au potter. Une centrifugation de 10 min à 700 g permet de récupérer les protéines cytosoliques et mitochondriales dans le surnageant (S1) et de récupérer les protéines nucléaires et les cellules non lysées dans le culot. Le culot contenant entre autre les protéines nucléaires est repris dans du tampon d'extraction nucléaire (KCl : 500 mM ; HEPES : 25 mM, pH 7,8 ; PMSF : 1 mM ; DTT : 100 µM ; glycérol :10%) et centrifugé 10 min à 20000 g ; le surnageant de cette centrifugation représente la fraction nucléaire. Le surnageant (S1) contenant les protéines cytosoliques et mitochondriales est centrifugé 30 min à 10000 g afin de récolter les protéines cytosoliques dans le nouveau surnageant (S2). Le culot de cette centrifugation, repris dans du tampon d'extraction mitochondrial, représente la fraction mitochondriale. Les

concentrations protéiques de chaque fraction sont déterminées par la technique colorimétrique de Bradford (1976).

1.3. Analyses de l'expression des protéines (totales, cytosoliques, mitochondriales et nucléaires).

20 à 70 µg de protéines sont mélangés à un volume identique de tampon d'échantillon 2X (Tris-HCl : 50 mM pH 6,8 ; SDS : 2 % ; Glycerol : 10 % ; dithiothréitol (DTT) : 100 mM ; Bleu de Bromophénol : 0,1 %), puis dénaturés 5 min à 100°C dans un bain-marie. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) (10 à 15% selon les protéines). La migration s'effectue pendant 2 h (100 V) dans le tampon de migration (Tris-HCl : 25 mM pH 8,5 ; Glycine : 250 mM ; SDS : 0,1%).

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) (Amersham Pharmacia Biotech). La membrane est préalablement trempée quelques secondes dans du méthanol avant d'être rincée à l'eau puis équilibrée quelques minutes dans du tampon transfert (Tris : 48 mM ; Glycine : 39 mM ; Méthanol : 20 % ; SDS : 0,03 % ; pH 8,1-8,5). Le gel de polyacrylamide est également équilibré quelques minutes dans le tampon de transfert avant d'être mis en contact avec la membrane selon les instructions du constructeur (Invitrogen). Le transfert s'effectue pendant 1h30 (20V, 100 mA). Pour vérifier l'efficacité du transfert, la membrane est colorée au rouge Ponceau (Sigma) afin de faire apparaître les différents bandes de protéines.

Après lavages en tampon PBS 1X-Tween 0,1 %, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation avec du tampon de blocage (PBS 1X-caséine 4 % ou PBS 1X-BSA 3 % selon les Ac utilisés) afin de saturer les sites aspécifiques. Après avoir éliminé le tampon de blocage, les membranes sont lavées brièvement avant d'être incubées une nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage.

Les anticorps (Ac) monoclonaux de souris sont dirigés contre les protéines humaines suivantes : β -actine (Sigma, 1/5000), Bcl-2 (Dako, 1/1000), Bax (Immunotech, 1/2000), p53 (Santa Cruz Biotechnology, 1/1000), p21 (Santa Cruz Biotechnology, 1/500), PARP (Santa Cruz Biotechnology, 1/100) et cytochrome c (Pharmingen, 1/2500). Les protéines AIF, Bid, PPAR α et PPAR γ sont révélées par des Ac monoclonaux de lapin : respectivement Sigma, 1/1000 ; Biosource, 1 µg/ml ; Santa Cruz Biotechnology, 1/500 et Santa Cruz Biotechnology, 1/1000.

Après incubation, les membranes sont lavées plusieurs fois dans du tampon PBS 1X-Tween

0,1% avant d'être incubées avec les anticorps secondaires polyclonaux anti-IgG correspondants conjugués à une peroxydase (Ac secondaire anti-IgG de souris (Dako) ou de lapin (Southern Biotech). La révélation des complexes antigène-anticorps spécifiques se fait sous agitation 1 h à température ambiante en présence de l'Ac secondaire dilué au 1/1000 ou au 1/4000 (selon qu'il est anti-souris ou anti-lapin) dans le tampon de blocage. Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon de lavage afin d'éliminer l'excès d'Ac secondaire.

La révélation est réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le système ECL™ (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Pharmacia Biotech) et les membranes sont exposées à un film autoradiographique (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) selon la technique donnée par le fabricant.

Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration du marqueur de poids moléculaires connus (Prestained Protein Molecular Weight standards, Low range, Invitrogen). L'intensité relative des bandes est déterminée grâce au logiciel Kodak 1D (BioLabo).

2. Immunohistochimie de p53-phosphorylée et du fragment de 85 kDa de PARP

Les cellules sont ensemencées en chambre de culture dans les conditions déterminées auparavant, puis sont traitées ou non par 40 μ M de diosgénine, d'hécogénine ou de tigogénine pendant 24 h. Le tapis cellulaire est alors rincé au PBS 1X, pH 7,4 froid avant d'être fixé avec du glutaraldéhyde (0,25%)-formaldéhyde (1%) (dans du tampon TBS 1X : Tris-HCl : 10 mM pH 8 ; NaCl : 150 mM) pendant environ 2 min. Après plusieurs lavages au TBS froid, les cellules sont perméabilisées par du citrate de sodium 0,1%-triton 0,1% pendant 20 min et lavées avant d'être incubées 1 h avec du tampon de blocage TBS-BSA 0,1%. Plusieurs lavages sont réalisés avant d'incuber les cellules avec l'anticorps primaire (dilué dans le tampon de blocage) pendant 1 nuit à 4°C. L'anticorps monoclonal de souris anti-p53 phosphorylée (sérine 392) (Calbiochem) est dilué au 1/200 et l'anticorps polyclonal de souris anti-fragment de 85 kDa de PARP (Promega) est dilué au 1/500. Après plusieurs lavages, les cellules sont incubées avec l'anticorps biotinylé anti-IgG de souris (Interchim, 1/200) pendant 40 min puis avec l'anticorps couplé à la streptavidine et au FITC (Dako, 1/1000) pendant 40 min à l'obscurité. Après lavages, les cellules sont observées grâce à un microscope à fluorescence (Nikon, Eclipse E800) (grossissement \times 500).

V-Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en Flux

Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits, les cellules de 2 puits sont réunies pour l'analyse et chaque condition est réalisée en triplicate. Les cellules 1547 sont traitées ou non par 40 μM de diosgénine (12, 24 et 48 h), 40 μM d'hécogénine (12 et 24 h) ou 40 μM de tigogénine (12 et 24 h) et les cellules HEP-2 et M4Beu sont traitées ou non par de la diosgénine à 40 μM (12 et 24 h). Une fois traitées, les cellules flottantes et les cellules adhérentes sont récupérées, centrifugées et lavées une fois en PBS 1X. Le nombre de cellules viables est ensuite déterminé par le test d'exclusion au bleu trypan. 10^6 cellules sont mis dans un nouveau tube, les cellules sont récupérées par centrifugation, perméabilisées et fixées dans 1 ml d'éthanol à 50% (pendant une nuit à -20°C) ou dans 1 ml d'éthanol à 70% (pendant une semaine à -20°C). Après cette étape à -20°C , les cellules sont récupérées par centrifugation avant d'être lavées deux fois en PBS froid, reprises dans 500 μl de PBS froid contenant de la RNase A (40 U/mg), et incubées 20 min à température ambiante.

Une solution mère de RNase A à 100 mg/ml (Roche diagnostics) est préparée préalablement dans du tampon Tris (Tris-HCl : 0,1 M pH 7,6 ; NaCl : 0,1 M) ne contenant pas de DNase (la DNase résiduelle a été éliminée par chauffage à 100°C pendant 20 min). Les cellules sont ensuite marquées à l'iodure de propidium (IP, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) juste avant analyse.

Les analyses sont effectuées par cytométrie en flux à l'aide d'un analyseur-trieur FACS Vantage (Becton Dickinson, USA). L'excitation de l'IP est réalisée avec la raie d'un laser à Argon à 488 nm et l'émission de fluorescence rouge (IP) est recueillie pour des longueurs d'ondes supérieures à 600 nm. Les analyses se font sous forme de cytogramme : pic du signal de fluorescence (FSC, Forward Scatter) en fonction de la surface du signal de fluorescence rouge (SSC, Side Scatter) afin d'éliminer les événements correspondants aux débris, agrégats et doublets. Un minimum de 2×10^4 cellules est analysé avec une vitesse de passage de 300 cellules/s. L'analyse de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est réalisée à partir des cytogrammes précédents avec le logiciel ModFit LT (Verity Software, USA).

VI-Analyse quantitative de l'apoptose

Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits, prolifèrent pendant 72 h avant d'être traitées ou non par 40 μM de diosgénine, d'hécogénine ou de tigogénine pendant 6 h (diosgénine), 12 et 24 h (diosgénine, héco-génine et tigogénine).

L'apoptose est quantifiée par le kit « Cell Death Detection ELISA^{PLUS} » (Roche Diagnostics). Les lysats cellulaires sont déposés dans les puits d'une plaque d'analyse recouverts de streptavidine. Un mélange d'anticorps anti-histones biotinylé et d'anti-ADN conjugué à la peroxydase est ensuite ajouté dans les puits. Au cours de l'incubation (2 h sous agitation), les mono- et les oligo-nucléosomes formés lors de la fragmentation de l'ADN sont complexés avec les Ac anti-histones, eux-même capturés au fond des puits par la streptavidine. De plus, les Ac anti-ADN réagissent avec l'ADN nucléosomique. Après lavages, une solution d'ABTS (2,2'-azino-di-[3-éthylbenzothiazoline sulfonate]), substrat de la peroxydase, est ajoutée dans les puits. Au cours de l'incubation (15 min sous agitation à température ambiante), une réaction colorimétrique se développe entre l'ABTS et la peroxydase portée par les Ac anti-ADN. La quantité d'ABTS oxydé correspondant à la quantité d'ADN fragmenté est mesuré à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA ; le blanc de lecture étant la solution d'ABTS (longueur d'onde de référence 490 nm).

Après traitement, les cellules flottantes sont récupérées et mélangées aux cellules adhérentes fraîchement décollées. Les cellules sont récupérées par centrifugation (1500 rpm, 10 min à 4°C), puis lavées une fois dans le PBS 1X avant d'être comptées. 5×10^4 cellules sont alors prélevées, centrifugées, et lysées par 200 μ l de tampon de lyse avant d'être incubées 30 min à température ambiante. Les lysats peuvent être conservés une nuit à -20°C avant le dosage. Après centrifugation (10 min à 200 g) des lysats, 20 μ l de chaque surnageant sont déposés dans la plaque ainsi que 20 μ l de contrôle positif (complexe histone-ADN) et 20 μ l de contrôle négatif (tampon d'incubation), puis 80 μ l d'immunoréactif (mélange d'Ac anti-histones et d'Ac anti-ADN reconstitués dans le tampon d'incubation) sont ajoutés dans tous les puits. Une incubation de 2 h sous agitation (300 rpm) est nécessaire pour la formation des complexes immuns, plusieurs lavages avec le tampon d'incubation permettent d'éliminer l'excès d'Ac avant d'ajouter 100 μ l d'ABTS/puits et de laisser incuber 10 à 15 min sous agitation (250 rpm) à l'obscurité avant les lectures à 405 et 490 nm contre le blanc (solution d'ABTS).

Chaque condition est testée trois fois et les valeurs à 405 nm et 490 nm obtenues pour le contrôle négatif sont soustraites aux valeurs obtenues pour chaque échantillon. Les valeurs moyennes d'absorbance (405 - 490) sont ensuite déterminées pour chaque échantillon et rapportées aux valeurs obtenues pour les contrôles cellulaires (cellules non traitées). Les résultats sont exprimés en ratio apoptotique des cellules traitées/cellules non traitées.

VII-Etude du potentiel membranaire mitochondrial

Le potentiel membranaire mitochondriale ou $\Delta\Psi_m$ est estimé en utilisant la sonde JC-1 (5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazole carbocyanide iodide) (Molecular Probes). La sonde JC-1 est un composé fluorescent qui existe sous forme de monomères lorsqu'il est à faible concentration et sous forme d'agrégats à forte concentration. La fluorescence des monomères est verte alors que la fluorescence des agrégats est rouge. La mitochondrie ayant un potentiel membranaire intact concentre JC-1 sous forme d'agrégats qui produisent une fluorescence rouge. Au contraire une mitochondrie ayant un potentiel altéré ne peut concentrer JC-1, les monomères produisent alors une fluorescence verte (Smiley et *al.*, 1991)

Les cellules sontensemencées en chambre de culture, prolifèrent pendant 72 h avant d'être traitées pendant 6 et 24 h par 40 μM de diosgénine (1547, Hep-2 et M4Beu) ou 40 μM d'hécogénine ou de tigogénine (1547). Les cellules adhérentes sont incubées dans 1 ml de milieu contenant la sonde JC-1 (1 $\mu\text{g/ml}$) pendant 30 min à 37°C. Les photos ont été prises grâce à un microscope Nikon ECLIPSE E800 (grossissement $\times 500$).

VIII-Dosage des activités caspases-3, -8 et -9

Le dosage des activités caspases se fait à partir du kit « CaspACE™ Assay System, Fluorometric » (Promega) après quelques modifications (Duval et *al.*, 2002). Le dosage est basé sur l'activité protéolytique des caspases. En effet, chaque caspase clive son substrat après un motif bien précis : DEVD pour la caspase-3, IETD pour la caspase-8 et LEHD pour la caspase-9. Les substrats utilisés pour réaliser ce dosage sont rendus lipophiles grâce à un groupement acétyl et sont couplés à un peptide, le 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC), qui est libéré lorsque le substrat est clivé par la caspase. Une fois libéré, l'AMC émet de la fluorescence permettant de quantifier l'activité de chaque caspase.

Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture de 150 cm^2 . Les cellules 1547 sont traitées par 40 μM de diosgénine, d'hécogénine ou de tigogénine pendant 12 et 24 h. Les cellules HEp-2 et M4Beu sont traitées par 40 μM de diosgénine pendant 12 et 24 h. Les cellules flottantes et les cellules adhérentes sont récupérées et lysées dans 0,1 % de citrate de sodium contenant 10 % de triton 100X. La concentration des protéines est déterminée par la méthode de Bradford. Les essais sont réalisés en plaque de 96 puits opaques (Falcon, Becton Dickinson). 32 μl de tampon caspase (10 mM de DTT, 2 % de DMSO) et 75 μg de protéines sont déposés dans les puits.

L'inhibiteur non spécifique de caspase, DEVD-CHO, est utilisé à une concentration de 2,5 mM pour vérifier que le clivage du substrat est bien dû aux caspases et non à une autre protéine ayant un pouvoir protéolytique. La plaque est incubée 30 min à 37°C avant de rajouter les substrats respectifs des caspases-3, -8 et -9 (2,5 mM). La fluorescence du bruit de fond est déterminée dans les puits contenant seulement le tampon caspase et les substrats. La plaque est de nouveau incubée à 37°C pendant 1 h. La fluorescence est alors mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Fluorolite 1000, Dynatech Laboratories) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm. Les résultats sont exprimés en unité relative de fluorescence (RUF) qui correspond à la concentration d'AMC libéré et représentent la moyenne de trois expériences.

IX-Dosage de l'ATP

La quantification de la production d'ATP produit par les cellules est réalisé à l'aide du kit «ATP Bioluminescence Assay Kit HS II» (Roche Diagnostics). La détection de l'ATP est basée sur l'activité oxydante ATP-dépendante de la luciférase. La luciférine est oxydée en présence de luciférase et de l'ATP contenu dans les lysats cellulaires. La lumière émise par cette oxydation est donc proportionnelle à la quantité d'ATP consommé.

Les cellules 1547 sont traitées par 40 µM de diosgénine, d'hécogénine ou de tigogénine pendant 6, 12 et 24 h. Les cellules HEp-2 et M4Beu sont traitées par 40 µM de diosgénine pendant 6, 12 et 24 h. Les cellules flottantes et les cellules adhérentes sont récupérées, comptées et 2000 cellules/ml sont reprises dans du tampon de dilution. 100 µl de cette suspension cellulaire sont mélangés à 100 µl de tampon de lyse. Après 5 min d'incubation à température ambiante, 100 µl de lysat sont mélangés à 100 µl de luciférase et la quantité d'ATP produit est déterminée grâce à un luminomètre Lumat LB 9507 (Berthold) après 1 seconde de délai et 1 seconde d'intégration. Les résultats sont exprimés en unité relative de luminescence (URL) par seconde et représentent la moyenne de trois expériences.

X-Transformation bactérienne et transfection cellulaire

1. Transformation bactérienne

Un plasmide recombinant contenant l'élément de réponse à NF-κB couplé au gène de la

luciférase (pGL3-NF- κ B-Luc), un plasmide recombinant contenant l'élément de réponse à PPAR couplé au gène de la luciférase (pGL3-ACO-PPRE-Luc) et un plasmide recombinant contenant le gène de la β -galactosidase sous la dépendance d'un promoteur constitutif (pCMV- β -gal) sont amplifiés. Les plasmides possédant le gène de résistance à l'ampicilline sont introduits par choc thermique dans une souche bactérienne compétente d'*Escherichia coli* contenue dans le kit « One Shot[®] Top10 competent cells » (Invitrogen). 10 ng de plasmides sont ajoutés à 50 μ l de suspension bactérienne. La transformation se fait par choc thermique en incubant le mélange dans la glace pendant 30 min avant de le placer à 42°C pendant 30 s puis dans la glace. 250 μ l de milieu SOC (milieu riche « Bacto-Tryptone » : 2 g ; Extrait de levure : 0,5 g ; NaCl : 1 M ; KCl : 1 M ; Mg²⁺ : 2 M ; Glucose : 2 M ; qsp 100 ml H₂O distillée, pH 7,0) sont ajoutés à ce mélange, et l'ensemble est incubé pendant 1 h à 37°C sous agitation. 50 à 150 μ l de cette suspension sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu Luria Broth (LB) agar (Gibco BRL) et de l'ampicilline (50 μ g/ml), marqueur de sélection des bactéries transformées. Les boîtes sont ensuite incubées une nuit à 37°C.

2. Création de souchiers

Une colonie de bactérie isolée transformée par chacun des plasmides (pGL3-NF- κ B-Luc, pGL3-ACO-PPRE-Luc ou pCMV- β -gal) est repiquée dans 3 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline (50 μ g/ml) et incubée une nuit à 37°C sous agitation. 700 μ l de chacune des suspensions bactériennes sont mélangés à 300 μ l de glycérol afin d'être conservées à -80°C (souchiers). Le reste de la suspension est conservé pour l'extraction plasmidique.

3. Amplification et purification de l'ADN plasmidique

Ces étapes sont réalisées à l'aide du kit « Qiagen[®] Plasmid Purification Maxi Kit » (Qiagen). 500 ml de milieu LB sontensemencés avec 500 μ l de suspension bactérienne recombinante et incubés une nuit à 37°C sous agitation. Après centrifugation (6000 g, 15 min à 4°C), les culots de bactéries sont repris dans 10 ml de tampon P1 (Tris-HCl : 50 mM pH 8,0 ; EDTA 10 mM ; RNase A : 100 μ g/ml), puis dans 10 ml de tampon P2 (NaOH : 200 mM ; SDS : 1%). Le mélange est agité 4 à 5 fois par retournement et incubé 5 min à température ambiante. 10 ml de tampon P3 (acétate de potassium : 3 M, pH 5,5) sont ensuite ajoutés, le mélange est encore agité 4 à 5 fois par retournement et incubé 20 min dans la glace. Ce mélange est centrifugé à 20000 g 30 min à 4°C afin de récupérer les surnageants contenant l'ADN plasmidique. Les surnageants sont de nouveau centrifugés à 20000 g 15 min à 4°C. Pendant la centrifugation, la colonne

« Qiagen-Tip 500 » est équilibrée avec 10 ml de tampon QBT (NaCl : 750 mM ; MOPS 50 mM pH 7,0 ; isopropanol : 15% ; Triton[®]X-100 : 0,15%). Les surnageants sont ensuite déposés sur la colonne qui est lavée deux fois avec 30 ml de tampon QC (NaCl : 1 M ; MOPS : 50 mM pH 7,0 ; isopropanol : 15%). L'élution de l'ADN plasmidique retenu par le filtre de la colonne est réalisée en appliquant 15 ml de tampon QF (NaCl : 1,25 M ; Tris : 50 mM ; Tris-Cl pH 8,5 ; isopropanol 15%). L'ADN récupéré est alors précipité avec 0,7 volume d'isopropanol et ultracentrifugé à 15000 g 30 min à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots sont repris par 1 ml d'éthanol à 70%. Après une dernière centrifugation (15000 g, 10 min à 4°C), le culot est séché sous vide et repris par un volume d'eau distillée approprié. L'ADN plasmidique est dosé par spectrophotométrie UV (BioPhotometer, Eppendorf AG). La concentration en ADN ($\mu\text{g/ml}$) est calculée selon la formule : $\text{DO}_{260} \times \text{dilution} \times 50$. Les ADNs sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

4. Transfection cellulaire transitoire par les plasmides pGL3-NF- κ B-Luc/pCMV- β -gal ou pGL3-ACO-PPRE-Luc/pCMV- β -gal

Les cellules 1547 sontensemencées en plaque 6 puits à 25000 cellules/puits de manière à avoir 80% de la confluence au moment de la transfection 72 h après l'ensemencement. La transfection se fait en utilisant la Lipofectamine[™]2000 (Invitrogen) et selon le protocole suivant : l'ADN plasmidique (1 μg par puits : pGL3-NF- κ B/ pCMV- β -gal, pGL3-ACO-PPRE/pCMV- β -gal) est mélangé à 100 μl de milieu 10% de SVF et agité doucement. La lipofectamine est également diluée dans 100 μl de milieu 10% de SVF avant d'être incubée 5 min à température ambiante. L'ADN plasmidique et la lipofectamine ainsi préparés sont mélangés et incubés pendant 20 min à température ambiante afin de permettre la formation des complexes ADN plasmidique/agent transfectant. Après incubation, 200 μl d'ADN plasmidique complexé à la lipofectamine et 300 μl de milieu 10% de SVF sont déposés dans chaque puits de la plaque de culture et incubés à 37°C pendant 4 h avant d'être remplacés par 2 ml de milieu 10% de SVF jusqu'au moment du traitement (24 h plus tard). Les cellules transfectées sont traitées ou non par 40 μM de diosgénine, d'hécogénine ou de tigogénine pendant 24 h. Des cellules non transfectées sont utilisées comme contrôle de transfection.

5. Préparation des lysats cellulaires

Afin de doser les activités luciférase et β -galactosidase, les cellules sont lysées selon la technique décrite par le constructeur (Promega). Les surnageants contenant les cellules flottantes sont récupérés et les cellules sont séparées par centrifugation. Les cellules adhérentes sont récupérées en grattant le tapis cellulaire à l'aide de 300 μ l de solution de lyse ou RLB 1X (Reporter Lysis Buffer) ayant agit à température ambiante pendant 15 min sous agitation. Les cellules adhérentes et les cellules flottantes sont rassemblées, mises dans la glace, agitées vigoureusement 10 à 15 s avant d'être centrifugées (10 000 rpm, 2 min à 4°C). Les lysats sont transférés dans de nouveaux tubes avant d'être dosés ou stockés à -80°C.

6. Dosage de l'activité luciférase

L'activité luciférase de chacun des lysats reflétant l'activation des promoteurs contenant les éléments de réponse à NF- κ B ou à PPAR (PPRE) est dosée selon le protocole du kit « Luciferase Assay System » (Promega) à partir de 40 μ l de lysat et 200 μ l de réactif. Le dosage se fait à l'aide d'un luminomètre à tube unique avec injecteur (Lumat LB 9507, Berthold), la mesure se faisant pendant 10 secondes toutes les 3 secondes. Le signal lumineux est produit en oxydant la luciférine en oxyluciférine grâce à la luciférase en présence d'ATP et de Mg^{2+} . L'activité luciférase est exprimée en unité relative de luminescence émise par sec (URL/seconde).

7. Dosage de l'activité β -galactosidase

La cotransfection du plasmide pCMV- β -gal et des plasmides pGL3-NF- κ B-Luc ou pGL3/ACO-PPRE-Luc permet de normaliser l'activité luciférase. Le dosage de la β -galactosidase est réalisée en plaque 96 puits à l'aide du kit « β -galactosidase Enzyme Assay System » (Promega) selon le protocole indiqué par le fabricant. Une gamme étalon d'activité β -galactosidase allant de 0 à 5 mU/ μ l est réalisée afin de déterminer l'activité dans les échantillons. 50 μ l de lysats dilués dans la solution de lyse RLB ainsi que 50 μ l de chaque standard de la gamme sont déposés en plaque 96 puits et 50 μ l de tampon de réaction 2X sont ajoutés. La plaque est incubée à 37°C jusqu'à apparition d'une coloration jaune (30 min à 3 h). Dès que la coloration apparaît, c'est-à-dire dès que le substrat ONPG (O-nitrophényl- β -D-galactopyranoside) est hydrolysé par la β -galactosidase en O-nitrophényl (jaune), la réaction est arrêtée par addition de 150 μ l de carbonate de sodium 1M et l'absorbance est lue à 420 nm dans un lecteur de plaque.

XI-Préparation des extraits nucléaires et étude de l'activation de NF- κ B et PPAR par des analyses de retard sur gel

Les cellules 1547 sont ensemencées en flacon de culture de 150 cm², prolifèrent pendant 72 h et sont traitées ou non par 40 μ M de diosgénine, d'hécogénine ou de tigogénine pendant 24 h ou par 3 μ M de MG132 pendant 4 h.

1. Préparation des extraits nucléaires

Les protéines nucléaires sont isolées comme cela a été décrit par Dignam *et al.* (1983) après avoir fait quelques modifications. Les cellules flottantes et les cellules adhérentes sont récupérées, centrifugées (1300 rpm, 10 min à 4°C), lavées deux fois en tampon PBS froid. Après centrifugation, les cellules sont lysées dans 600 μ l d'une solution saline de faible concentration (HEPES :10 mM, pH 7,9 ; KCl : 10 mM ; DTT : 1 mM) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete™, Roche Diagnostics) et du nonidet-p40 (NP-40 0,5 %), puis la solution est agitée vigoureusement et incubée 20 min dans la glace. Le surnageant correspondant à l'extrait cytosolique est récupéré après centrifugation (2000 g, 5 min à 4°C), dosé et conservé à -80°C. Le culot de noyaux est alors repris par 50 μ l d'une solution saline hautement concentrée (HEPES :10 mM, pH 7,9 ; NaCl : 420 mM ; DTT : 1 mM) en présence de Complete™. Après incubation de 30 min dans la glace sous agitation (au vortex) intermittente, les débris nucléaires sont éliminés par centrifugation (13000 g, 10 min à 4°C). Le surnageant correspondant à l'extrait nucléaire est dosé et conservé à -80°C. Le dosage protéique de ces extraits est effectué par la méthode colorimétrique de Bradford.

2. Analyse de retard sur gel

L'effet des stéroïdes végétaux (40 μ M) sur l'activation de NF- κ B et de PPAR est évalué par la technique de retard sur gel. Son principe repose sur l'utilisation d'oligonucléotides marqués au ³²P contenant l'élément de réponse spécifique au facteur de transcription NF- κ B ou au récepteur nucléaire PPAR étudié. Les sondes marquées sont incubées en présence des protéines nucléaires et la fixation de NF- κ B ou de PPAR sur l'ADN est mise en évidence par autoradiographie après

séparation des complexes formés par électrophorèse en conditions natives. La fixation de protéine sur l'ADN retarde la migration de celui-ci.

Les séquences nucléotidiques des sondes sens et antisens pour NF- κ B sont les sondes suivantes :

-sonde sens : 5'-GAT CC A GTT GAG GGG ACT TT C CCA GGC G-3'

-sonde antisens : 3'-GT CAA CTC CCC TGA AAG GGT CCG CCT AG-5'

site consensus NF- κ B

Les séquences des sondes sens et antisens pour PPRE sont :

- sonde sens : 5'-AGT AAG GAC AAA GGT CA-3'

- sonde antisens : 3'-TCC TGT TTC CAG TAG AG-5'

site consensus PPRE

2.1. Hybridation des sondes monocaténares

Les sondes sens et antisens sont reprises dans de l'eau ultra pure afin d'obtenir une concentration de 1 μ g/ μ l, puis diluées (10 ng/ μ l) avant d'être mélangées volume à volume et incubées 5 à 10 min dans la glace.

2.2. Marquage radioactif des sondes hybridées

Le radiomarquage des sondes par [α - 32 P]dCTP utilise le fragment de klenow de l'ADN polymérase I qui va intégrer les dNTP complémentaires de la matrice mono-brin des sondes, et en particulier l' [α - 32 P]dCTP. 2 μ l des sondes hybridées (ou 10 ng) sont incubés pendant 30 min à température ambiante avec 2 μ l de tampon de marquage 10 X (tampon de klenow), 0,5 μ l d'enzyme de klenow (Promega), 2 μ l de dNTP 6 mM (sauf les dCTP), 1 μ l de [α - 32 P]dCTP (Activité spécifique : 3000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech), le volume étant complété à 20 μ l avec de l'eau.

2.3. Purification

Deux volumes (40 μ l) d'éthanol absolu et 1/10 de volume (2 μ l) d'une solution d'acétate de sodium (3 M) sont ajoutés à la solution. Après une incubation de 30 min à -20°C, la solution est centrifugée (10 000 g, 5 à 10 min à 4°C). Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est repris dans 20 μ l d'eau. Un comptage radioactif est ensuite effectué de manière à avoir un marquage des sondes de 2 cps/ μ l.

2.4. Réaction de fixation

10 µg d'extraits nucléaires sont pré-incubés pendant 10 min à 4°C avec 2 µl de tampon de fixation 10X pour NF-κB ou 5X pour PPRE (tampon de fixation 10X : Tris-HCl 100 mM, pH 7,4 ; MgCl₂ 10 mM ; EDTA 5 mM ; Glycérol 50 % (v/v) ; NaCl 500 mM ; DTT 5 mM ; tampon de fixation 5X : Hepes 20 mM, pH 7,9 ; MgCl₂ 20 mM ; EDTA 4 mM ; Glycérol 40 % (v/v) ; KCl 160 mM ; DTT 4 mM), 2 µl de poly(dIdC) (1µg/µl), dans un volume final de 20 µl. Les extraits nucléaires sont ensuite incubés pendant 30 min supplémentaires à 4°C en présence de 2 µl (1 ng) de sonde marquée. Après addition de bleu de charge (2 µl/tube), les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 5%. La migration des complexes ADN-protéine s'effectue en conditions natives en tampon TBE 0,5 X (Tris-Borate-Acétate) pendant 45 min à 100-150 V. Après migration, le gel est séché et révélé par autoradiographie après avoir été mis au contact d'un film pendant une nuit à -80°C.

Pour s'assurer de la spécificité de la liaison, des études de compétition sont réalisées par une pré-incubation des extraits nucléaires en présence soit d'un excès de sonde froide spécifique double-brin (non radio-marquée, dont la concentration est 100 fois plus importante que celle de la même sonde marquée), soit d'une sonde froide SP-1 non spécifique (élément SP-1 : 5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3'), avant l'addition de la sonde radio-marquée.

Les protéines présentes au niveau des dimères de NF-κB sont identifiées après une analyse de retard sur gel. Pour cela, 1 µg d'anticorps anti-p65 ou anti-p50 (Dako) sont ajoutés au moment de la réaction de fixation : 2 µl de tampon de fixation 10 X ; 2 µl de poly(dIdC) (à 1 µg/µl) ; 10 µg d'extraits nucléaires ; eau qsp 20 µl ; 1 µg d'anticorps. Le mélange est incubé pendant 30 min à 4°C. 4 µl de sonde marquée sont ensuite ajoutés au mélange réactionnel qui est incubé pendant 30 min supplémentaires à 4°C. Ensuite, les échantillons sont déposés comme pour l'analyse de retard sur gel.

XII-Etude de l'activité COX-2 par dosage de la PGE₂

Les cellules sontensemencées en plaques 6 puits selon leur densité respective. Les cellules 1547 sont traitées ou non après 72 h de prolifération par la diosgénine pendant 6, 12 et 24 h, l'hécogénine et la tigogénine à une concentration de 40 µM pendant 12 et 24 h. Les cellules HEp-2 et M4Beu sont traitées ou non par la diosgénine pendant 6, 12 et 24 h. Chaque condition est réalisée trois fois. Après traitement, les surnageants sont prélevés et peuvent être soit testés tout de

suite soit congelés à -80°C . Le nombre de cellules vivantes est déterminé par comptage au bleu trypan sur cellule de Malassez.

Le dosage de la PGE_2 , qui est le premier produit du métabolisme de l'acide arachidonique, se fait à l'aide du kit « Prostaglandin E_2 -monoclonal enzyme immunoassay » (Cayman Chemical). Ce dosage est basé sur la compétition entre la PGE_2 plus ou moins présente dans nos échantillons et entre un traceur (conjugué PGE_2 -acétylcholinestérase) dont la concentration est constante pour une quantité limitée d'Ac monoclonal de souris anti- PGE_2 . La quantité de traceur capable de se fixer à l'Ac anti- PGE_2 est inversement proportionnel à la concentration de PGE_2 dans le puits. Le complexe Ac- PGE_2 (libre ou conjugué) se lie aux Ac polyclonaux de chèvre anti-souris fixés dans le puits. La plaque est lavée pour éliminer tout ce qui n'a pas été fixé. Afin de déterminer la quantité de traceur fixé, le réactif d'Ellman contenant le substrat de l'acétylcholinestérase est ajouté à chaque puits. Le produit de la réaction enzymatique est coloré (jaune) et est donc détectable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 412 nm. L'absorbance ainsi obtenue est proportionnelle à la quantité de traceur fixé et inversement proportionnelle à la quantité de PGE_2 présente dans nos échantillons. La concentration minimale détectable est de 3 pg/ml après 90 min d'incubation et la spécificité de ce test est de 100% pour la PGE_2 . Il existe des réactions croisées avec PGI_2 (1%), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (< 0,01%) et TXB_2 (< 0,01%).

Le dosage des échantillons se fait après reconstitution des réactifs (tampon EIA, tampon de lavage, traceur, anticorps anti- PGE_2) comme l'a indiqué le constructeur. Une gamme standard de PGE_2 allant de 0 à 1 ng/ml est réalisée pour permettre la quantification et plusieurs contrôles doivent être faits. Chaque plaque doit contenir 2 blancs (absorbance du réactif d'Ellman), 2 puits TA représentant l'activité enzymatique totale du traceur (traceur, réactif d'Ellman), 2 puits NSB ou puits de contrôle de liaison non spécifique du traceur (tampon EIA, traceur, réactif d'Ellman), 2 puits B0 de liaison maximale du traceur (tampon EIA, traceur, Ac anti- PGE_2 , réactif d'Ellman). 50 μl de chacun des standards et 50 μl de chacun des échantillons non dilués sont déposés dans les puits en présence de 50 μl de traceur et de 50 μl d'Ac anti- PGE_2 . Les puits NSB contiennent 100 μl de tampon EIA et 50 μl de traceur et les puits B0 contiennent 100 μl de tampon EIA, 50 μl de traceur et 50 μl d'Ac. La plaque est incubée 18 h à 4°C sous agitation avant d'être vidée et lavée 5 fois avec le tampon de lavage. Ensuite, 5 μl de traceur sont ajoutés dans les puits TA et 200 μl de réactif d'Ellman sont ajoutés dans tous les puits. La plaque est alors incubée à l'obscurité 60 à 90 min sous agitation avant d'être analysée à 412 nm en lecteur de plaque ELISA.

Les résultats sont exprimés en quantité de PGE_2 par ml (pg/ml) rapporté au nombre de cellules viables présentes dans les puits (pg/ml/ 10^6 cellules). La concentration de PGE_2 est obtenue

en tenant compte des valeurs d'absorbance des blancs et en utilisant la courbe de référence d'équation standard/ $B_0=f([PGE_2])$.

XIII-Utilisation du modèle 1547/diosgénine en SdFFF

1. Principe de la SdFFF (« sedimentation field flow fractionation »)

La technique de fractionnement par couplage flux-force ou SdFFF (« sedimentation field flow fractionation ») a été développée dans les années 60 et est une technique apparentée à la chromatographie liquide. Le principe de la SdFFF est basé sur l'élution différentielle de diverses espèces dans une phase mobile qui passe dans un canal horizontal de très faible épaisseur soumis à un champ externe gravitationnel perpendiculaire au canal. La SdFFF utilise un champ mutigravitationnel généré par la rotation du cylindre, elle est préférentiellement utilisée pour séparer des espèces de la grandeur du micron comme les cellules. La SdFFF sépare les cellules en fonction de leur taille, de leur densité et de leur forme. La SdFFF est largement utilisée dans différents domaines comme l'hématologie, la recherche sur le cancer, les analyses bactériennes, la neuroscience afin de séparer et de purifier les cellules (Wang *et al.*, 2000 ; Sanz *et al.*, 2002 ; Lautrette *et al.*, 2003). La SdFFF sépare les cellules en conservant l'intégrité des cellules. Elle ne modifie pas leur viabilité, n'induit pas l'apoptose et n'altère ni le stade de différenciation ni la maturation des cellules.

A densité équivalente (lorsque les cellules ont atteint leur position d'équilibre dans le canal), les particules de grande taille sont éluées plus rapidement et sortent donc en premier par rapport aux particules de petite taille. Le profil d'élution des cellules ou fractogramme dépend des caractéristiques cellulaires et est composé d'un volume mort correspondant à des espèces non retenues dans le canal, et d'un pic d'absorbance correspondant au plus grand nombre de cellules éluées de la même manière. Dans le système SdFFF, la séparation des cellules ne dépend que de leur taille et de leur densité car le rapport de rétention (temps d'élution du volume mort/ temps de rétention) dépend de la vitesse du flux de la phase mobile et du champ externe. Le temps de rétention des cellules obtenu pour chaque condition est comparé, celui-ci étant estimé par le temps nécessaire pour atteindre le sommet du pic d'élution.

Nous avons utilisé le modèle d'induction apoptotique cellules 1547/diosgénine afin de montrer que la SdFFF peut être utilisée comme outil de détection rapide de l'apoptose. Nous avons comparé le résultat obtenu après SdFFF avec d'autres modèles d'induction connus pour induire l'apoptose de façon importante (staurosporine et MG132) et avec l'hérogénine et la tigogénine qui

ont une activité pro-apoptotique modérée par rapport à la diosgénine (Corbière et *al.*, 2003).

2. Traitement des cellules 1547

Les cellules 1547 ont été cultivées en flacon de culture de 150 cm². Après 72 h de prolifération, les cellules sont traitées ou non par la diosgénine (40 µM), l'hécogénine (40 µM), la tigogénine (40 µM), la staurosporine (0,1 µM) ou le MG132 (3 µM) pendant 6, 12 et 24 h. Les cellules flottantes et les cellules adhérentes sont récupérées, comptées et la viabilité cellulaire est déterminée par la méthode d'exclusion au bleu trypan. Les cellules sont lavées deux fois en PBS (pH 7,4) et la concentration cellulaire est ajustée à 2×10^6 cellules/ml avant l'analyse en SdFFF.

3. Détection de l'apoptose

3.1. Microscopie optique

Pour l'observation des cellules en microscopie visible, les cellules sont traitées par la diosgénine (40 µM), la staurosporine (0,1 µM) ou le MG132 (3 µM) pendant 6 h avant d'être fixées dans du PBS contenant 0,25 % de glutaraldéhyde et 1 % de formaldéhyde pendant 2 min à 37°C. Elles sont ensuite lavées plusieurs fois en PBS avant d'être observées avec un microscope à contraste de phase (grossissement $\times 400$).

3.2. Dosage de la fragmentation de l'ADN

L'apoptose a également été quantifiée par le kit ELISA de détection des fragments mono- et oligo-nucléosomiques (cf. VI) après 24 h de traitement par la diosgénine, l'hécogénine, la tigogénine, la staurosporine et le MG132.

3.3. Marquage des cellules au DAPI

Le marquage des cellules au DAPI permet d'évaluer la condensation du noyau des cellules et donc d'évaluer l'apoptose. Cette technique a été utilisée afin de vérifier que la SdFFF n'induisait pas l'apoptose dans nos conditions. Après 24 h de traitement avec la diosgénine, les cellules sont incubées dans une solution de DAPI à 0,5 µg/ml avant et après le passage en SdFFF.

4. SdFFF et détermination du diamètre des cellules

Pour l'analyse en SdFFF, 100 μ l de suspension cellulaire sont injectés. Les cellules sont alors entraînées par la phase mobile constituée de PBS (pH 7,4) dont le débit est réglé sur 0,6 ml/min par une pompe à chromatographie Spectroflow 400-ABI Kratos (ABI-Kratos, Ramsey, NJ, USA). A l'intérieur du canal, les cellules sont soumises à un champ gravitationnel externe de $40 \pm 0,03$ g créé par la rotation du canal. L'élution des cellules est mesurée à 254 nm par un détecteur d'absorbance Water 484 (Water associate, Milford, MA, USA). Pour chaque condition, trois injections sont réalisées afin de comparer les temps de rétention des cellules traitées et des cellules contrôles.

Le diamètre des cellules est déterminé à l'aide d'un compteur de particules ou « Coulter Counter ». La suspension cellulaire (2×10^6 cellules) est diluée dans l'Isoton® dans un volume final de 15 ml. Les résultats expriment la différence de diamètre entre les cellules traitées et les cellules contrôles (en μ m) et représentent la moyenne \pm écart-type de trois estimations.

XIV-Statistiques

Les analyses statistiques de différences entre les résultats concernant les cellules traitées et les cellules témoins ont été réalisées par des analyses de variances (ANOVA). Une valeur de variance inférieure à 0,05 ($P < 0,05$) est considérée comme significative. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

Résultats

Objectifs

Un travail réalisé au préalable sur les cellules 1547 d'ostéosarcome humain a permis de montrer qu'un stéroïde végétal, la diosgénine, avait un effet anti-prolifératif important. Ce travail nous a amené à comparer l'effet anti-prolifératif de deux autres stéroïdes végétaux, l'hécogénine et la tigogénine avec celui de la diosgénine. Ces trois stéroïdes ont donc été testés sur les cellules 1547. Une fois cette comparaison établie, nous avons cherché à savoir si la diosgénine avait un effet similaire sur deux lignées cellulaires d'origine différente : les cellules HEP-2 (laryngocarcinome) et les cellules M4Beu (mélanome). La voie d'induction apoptotique mitochondriale et l'activité de la cyclooxygénase-2 ont été analysées sur les trois lignées cellulaires afin d'établir un mécanisme d'action de la diosgénine.

I- Effets de la diosgénine, de l'hécogénine et de la tigogénine sur les cellules 1547

1. Prolifération cellulaire

1. 1. Etude de la prolifération cellulaire par le MTT

Les cellules 1547 sont cultivées dans du milieu contenant 10 % de SVF pendant 72 h avant d'être traitées par la diosgénine à 10, 20, 40, 80 ou 100 μM pendant 4 jours afin de déterminer l'effet de cette molécule sur la prolifération cellulaire par rapport à un témoin. La prolifération cellulaire est estimée par le test au MTT.

Les résultats obtenus après 24 h de traitement montrent que la diosgénine inhibe la prolifération en fonction de la concentration utilisée : 8 %, 13 % et 86 % d'inhibition avec 10, 20 et 40 μM respectivement ($P < 0,05$). Les concentrations 40, 80 et 100 μM provoquent une diminution similaire (86 %) de la croissance cellulaire : pour cette raison, nous avons choisi de travailler à la concentration de 40 μM (Figure RI-1).

Afin de vérifier si des composés voisins de la diosgénine ont les mêmes effets sur les cellules 1547, nous avons réalisé un test de prolifération au MTT avec deux molécules de structure proche, l'hécogénine et la tigogénine (Fig. 19 p. 107). Les cellules ont été traitées avec ces molécules à une concentration de 40 μM afin de comparer leurs effets à celui de la diosgénine à la même concentration.

Nous avons observé une inhibition de la prolifération de 38 % avec l'hécogénine ($P < 0,05$) et de 53 % avec la tigogénine ($P < 0,05$) après 24 h de traitement (Figure RI-2).

Les résultats précédents ont été confirmés par un comptage au bleu trypan afin de déterminer la viabilité des cellules après traitement par rapport au contrôle.

De plus, le test de cytotoxicité basé sur la libération de la lactate déshydrogénase indique que la concentration utilisée n'est pas cytotoxique.

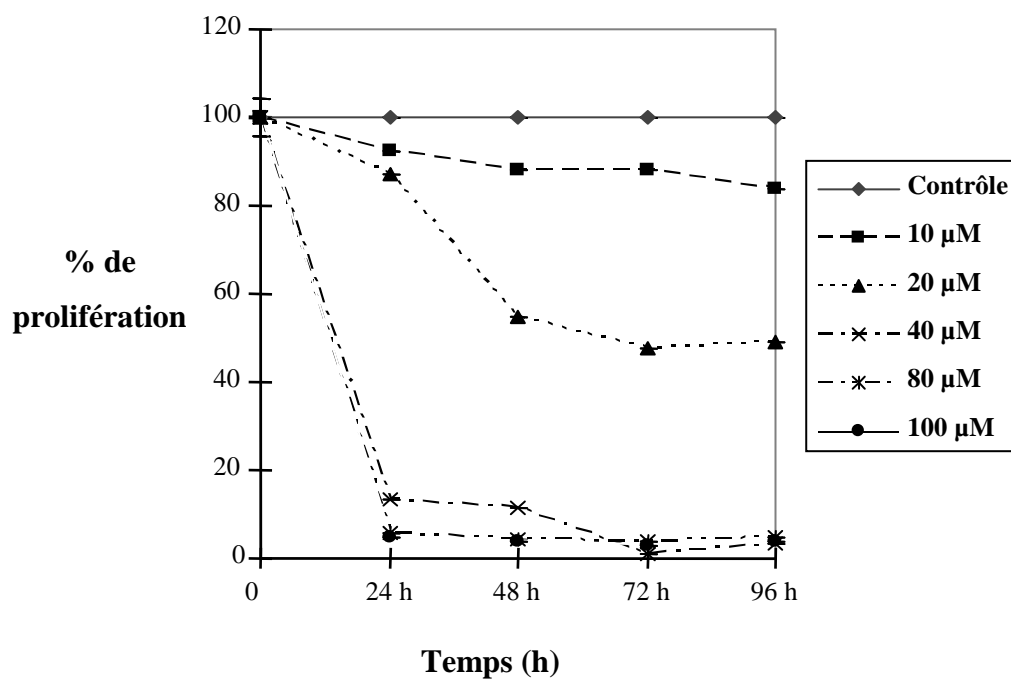


Figure RI-1 : Effets de la diosgénine sur la prolifération des cellules 1547.

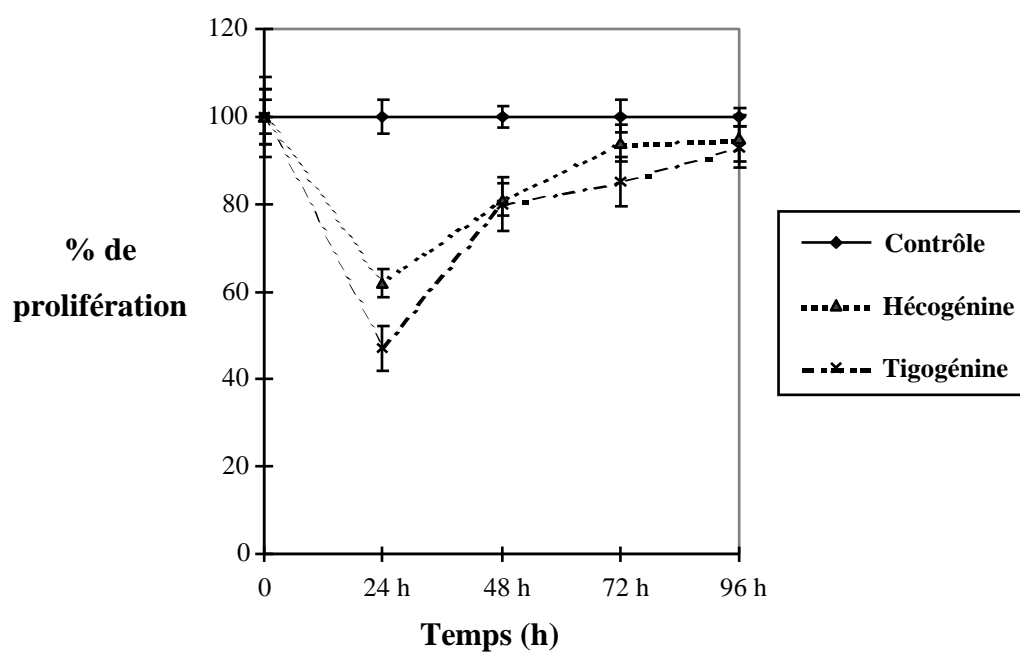


Figure RI-2 : Effets de l'hécogénine et de la tigogénine sur la prolifération des cellules 1547.

1. 2. Observation des cellules en microscopie optique

L'observation des cellules 1547 en microscopie optique permet également de voir les différences de morphologie induites ou non par les trois stéroïdes végétaux. La figure correspondant aux cellules traitées par la diosgénine à 40 μ M montre la réduction de la taille des cellules, la condensation du cytoplasme et l'apparition de filaments cytoplasmiques entre les cellules par rapport aux cellules contrôles. Au contraire, le traitement des cellules 1547 par l'hécogénine ou la tigogénine n'induit pas de modification morphologique par rapport aux cellules contrôles (Figure RI-3).

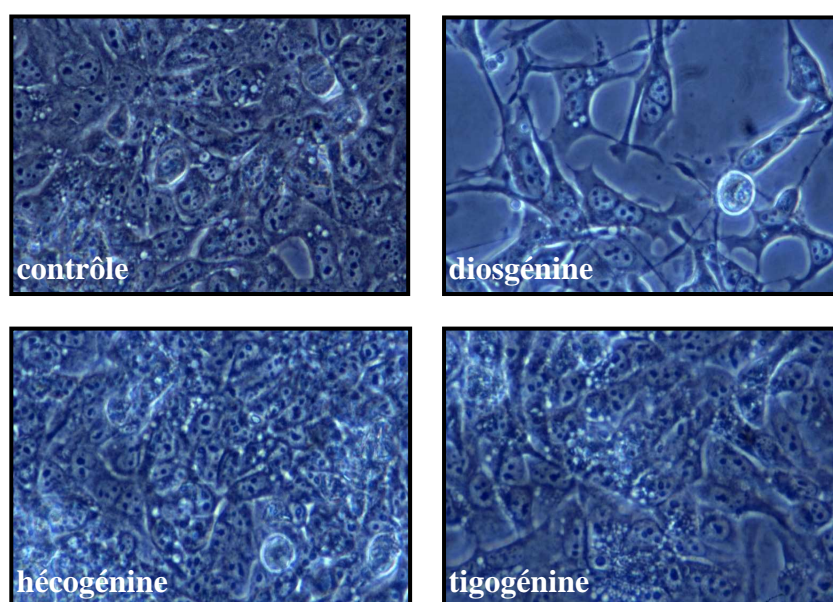


Figure RI-3 : Observation en microscopie optique des cellules 1547 traitées par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μ M pendant 24 h (grossissement \times 400).

2. Etude du cycle cellulaire et étude de l'expression de p21 et p53

L'inhibition de la prolifération cellulaire peut s'expliquer par deux phénomènes qui sont un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. Nous allons, dans un premier temps, étudier le cycle cellulaire des cellules 1547 après traitement par les trois molécules et, dans un deuxième temps, nous étudierons l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire : p21 et p53.

2. 1. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules 1547 ont été traitées par 40 μ M de diosgénine pendant 12, 24 et 48 h. Après 12 h de traitement, les cellules 1547 s'accumulent en phase G₁ comme l'indique le pourcentage de cellules (34 %) par rapport au contrôle (26 %) (P<0,05). Cette accumulation est accentuée à 24 h : 50 % de cellules sont en phase G₀/G₁ après traitement par la diosgénine comparé à 35 % pour les cellules non traitées. Par conséquent, le nombre de cellules en phase S diminue considérablement après traitement ; en effet, seulement 21 % de cellules traitées sont en phase S alors que 46 % de cellules non traitées sont en phase de réplication. De plus, une population sub-G₁ apparaît après 48 h de traitement, cette population est le plus souvent associée à des cellules apoptotiques (Figure RI-4).

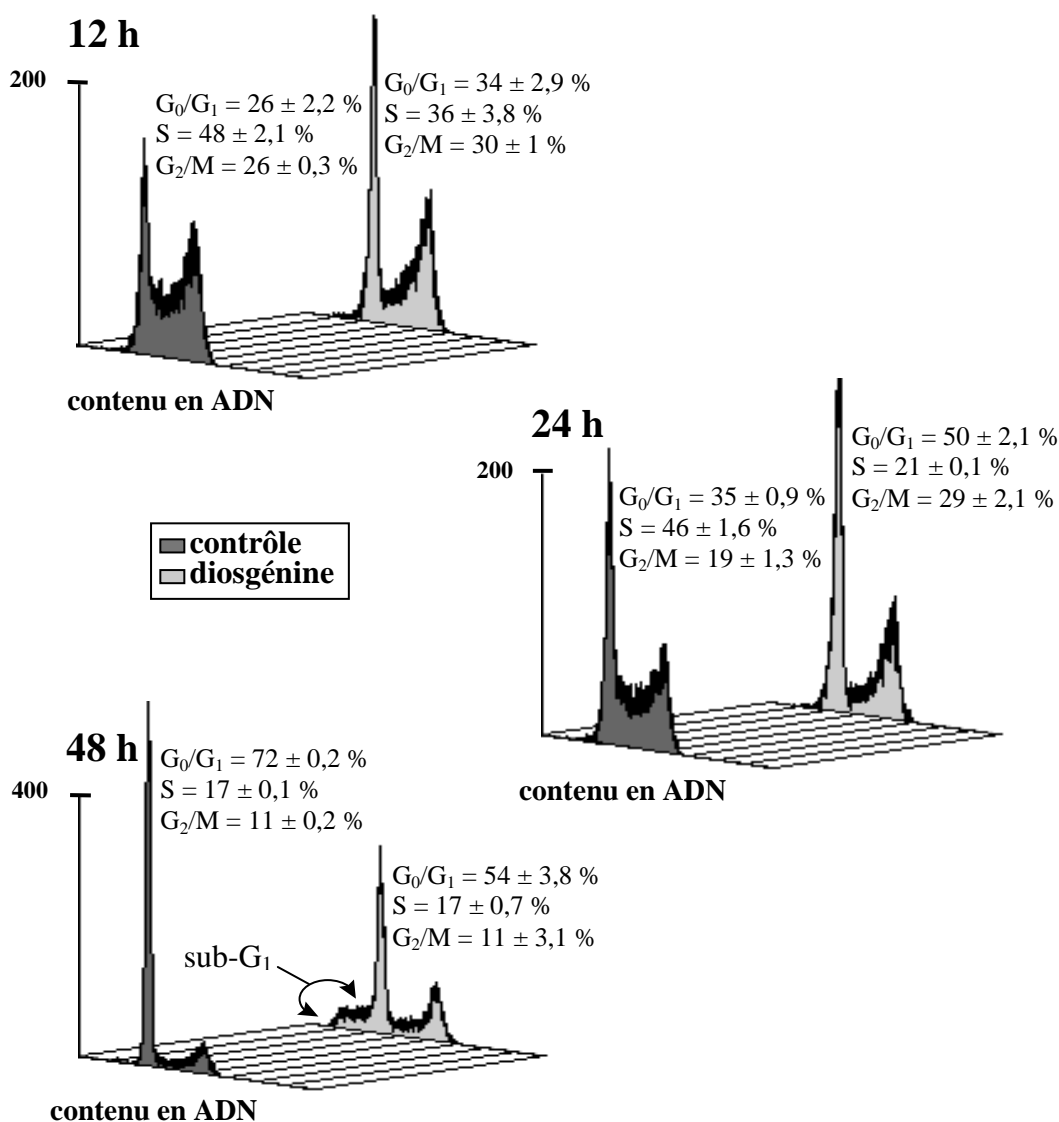


Figure RI-4 : Effets de la diosgénine sur la distribution des cellules 1547 dans le cycle cellulaire. Les cellules ont été traitées pendant 12, 24 et 48 h par la diosgénine à 40 μ M avant d'être analysées en cytométrie en flux après un marquage à l'iodure de propidium. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences.

L'étude du cycle cellulaire a également été réalisée après traitement par l'hécogénine et la tigogénine à 40 μ M pendant 12 et 24 h. Comme le montre les résultats obtenus et contrairement à la diosgénine, ces deux stéroïdes n'induisent pas d'arrêt du cycle cellulaire, ni à 12 h ni à 24 h (Tableau RI-1).

	contrôle 12 h	hécogénine 12 h	tigogénine 12 h
G₀/G₁	43 ± 2 %	46 ± 1,2 %	46,2 ± 1,3 %
S	39 ± 0,5 %	36,5 ± 0,4 %	34,5 ± 0,4 %
G₂/M	18 ± 1,5 %	17,5 ± 1,2 %	19,4 ± 1,2 %

	contrôle 24 h	hécogénine 24 h	tigogénine 24 h
G₀/G₁	39 ± 1,3 %	40 ± 1,4 %	43 ± 1,2 %
S	48 ± 0,4 %	48 ± 0,8 %	47 ± 1 %
G₂/M	12,5 ± 0,8 %	12 ± 0,8 %	10,4 ± 0,3 %

Tableau RI-1 : Effets de l'hécogénine et de la tigogénine à 40 µM sur le cycle cellulaire des cellules 1547. Les cellules ont été traitées pendant 12 et 24 h par l'hécogénine et la tigogénine à 40 µM avant d'être analysées en cytométrie en flux après un marquage à l'iodure de propidium. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences.

2. 2. Etude de quelques régulateurs du cycle cellulaire

2. 2. 1. Expression de p21

p21 fait partie de la famille de protéines Cip/Kip qui sont des CKI (inhibiteurs des CDKs) régulant la progression du cycle cellulaire. L'expression du transcrit de p21 et de la protéine a été analysée après traitement par les trois stéroïdes.

L'expression de l'ARNm de p21 est augmentée après 24 h de traitement par la diosgénine (1,5 fois par rapport au contrôle, $P < 0,05$) mais ne l'est pas après traitement par l'hécogénine et la tigogénine (Figure RI-5A). L'étude de l'expression de la protéine montre que les trois stéroïdes induisent l'expression de p21 (2 fois plus importante avec la diosgénine et 2,5 fois avec l'hécogénine et la tigogénine par rapport au contrôle, $P < 0,05$) (Figure RI-5B).

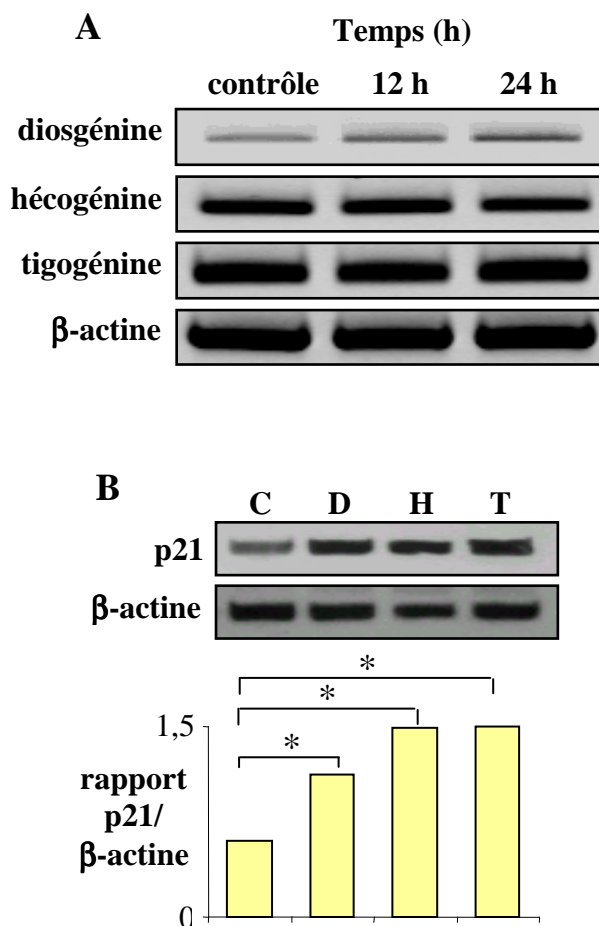


Figure RI-5 : Expression de l'ARNm (A) et de la protéine p21 (B) dans les cellules 1547 après traitement par les trois stéroïdes (diosgénine, hécogénine, tigogénine). (A) RT-PCR réalisées sur les cellules 1547 contrôles ou traitées par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μ M pendant 12 et 24 h. (B) Western blot réalisé sur les cellules 1547 traitées ou non (C, contrôle) par la diosgénine (D), l'hécogénine (H) et la tigogénine (T) pendant 24 h. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne (* différence significative par rapport au contrôle, $P < 0,05$).

2. 2. 2. Expression de p53

Il est désormais bien connu que la protéine suppresseur des tumeurs p53 inhibe la croissance cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose. C'est pourquoi nous avons analysé son expression par RT-PCR ainsi que par western blot.

L'analyse de l'ARNm de p53 montre que la transcription est induite après traitement par la diosgénine et par la tigogénine (1,3 fois par rapport au contrôle, $P < 0,05$) et non après traitement par l'hécogénine (Figure RI-6A).

Les résultats concernant la diosgénine sont corrélés par l'étude de l'expression de la protéine qui montre que l'expression est 1,2 fois plus importante lors du traitement par la diosgénine par rapport au témoin. Le traitement par l'hécogénine et la tigogénine ne modifie pas l'expression de la protéine p53 comparé au contrôle (Figure RI-6B).

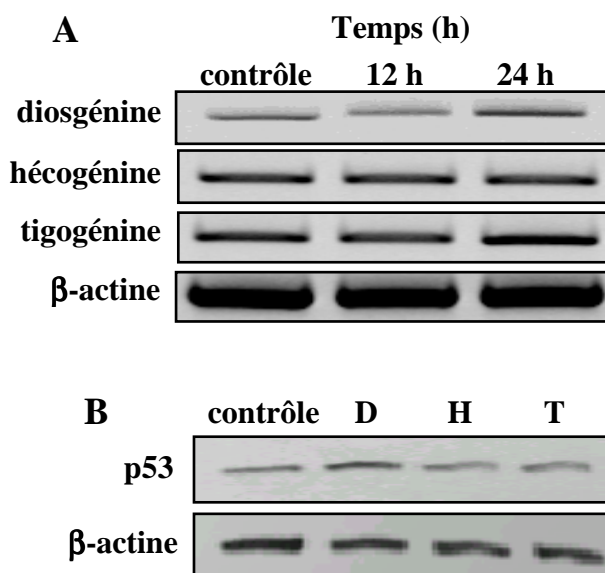


Figure RI-6 : Expression de l'ARNm (A) et de la protéine p53 (B) dans les cellules 1547 après traitement par les trois stéroïdes (diosgénine, hécogénine, tigogénine). (A) RT-PCR réalisées sur les cellules 1547 contrôles ou traitées par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μ M pendant 12 et 24 h. (B) Western blot réalisé sur les cellules 1547 traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D), l'hécogénine (H) et la tigogénine (T) pendant 24 h. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne.

La régulation de l'activité de p53 se fait par différents mécanismes dont le plus connu est la phosphorylation de la protéine. En effet, la phosphorylation de p53 favorise sa stabilité et son activité. L'analyse de la phosphorylation de p53 sur la sérine 392, révélant la stabilité de la protéine, montre que seules les cellules 1547 traitées par la diosgénine expriment une p53 active (Figure RI-7).

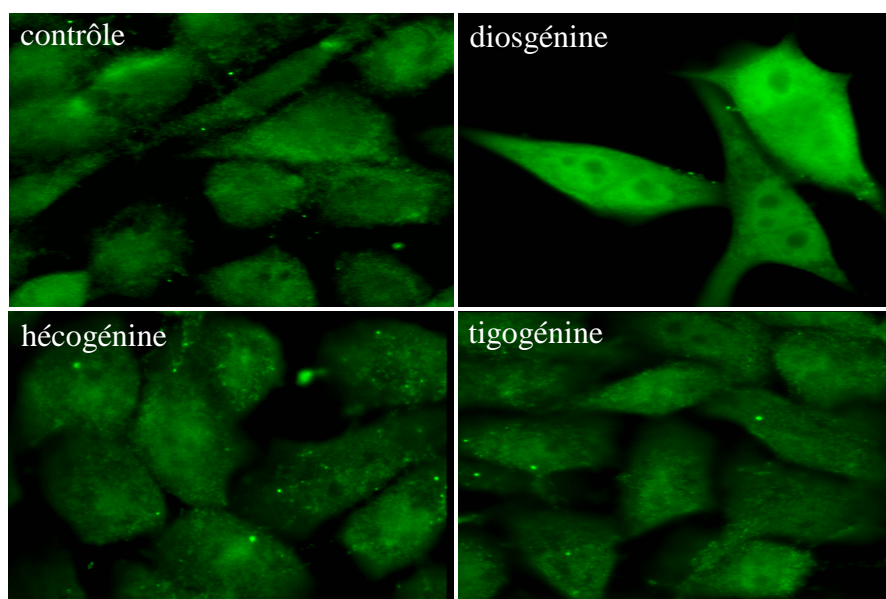


Figure RI-7 : Expression de p53 phosphorylée sur la sérine 392 dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine. Les cellules 1547 ont été traitées ou non (contrôle) par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μ M pendant 24 h. Les photographies ont été prises avec un microscope Nikon (grossissement \times 500).

Après avoir étudié l'effet des molécules sur le cycle cellulaire, nous avons analysé l'apoptose qui est le deuxième mécanisme pouvant expliquer l'effet anti-prolifératif observé.

3. Induction de l'apoptose ; analyse de la fragmentation de l'ADN

L'apoptose a tout d'abord été évaluée en étudiant la fragmentation de l'ADN qui est un évènement se produisant lors de la dernière étape de l'apoptose avant que les cellules ne se divisent en plusieurs corps apoptotiques ensuite phagocytés par les cellules environnantes.

Le test ELISA a été réalisé sur la totalité des cellules (flottantes et adhérentes) traitées ou non par 40 μ M de diosgénine pendant 6, 12 et 24 h. L'étude de l'induction de la fragmentation de l'ADN a également été faite après traitement par l'hécogénine et la tigogénine à la même concentration mais uniquement à 24 h étant donné les résultats concernant l'inhibition de la prolifération. Le tableau RI-2 suivant montre la fragmentation de l'ADN au cours du traitement. Le ratio apoptotique, qui est le rapport de la fragmentation de l'ADN des cellules traitées et celle des cellules témoins, indique que la diosgénine induit une plus forte génération d'oligonucléosomes que les deux autres stéroïdes. En effet, le ratio est de 5,5 pour les cellules

traitées par la diosgénine comparé à 2,2 pour la tigogénine et 1,3 pour l'hécogénine à 24 h ($P < 0,05$).

Temps (h)	diosgénine	hécogénine	tigogénine
contrôle	1	1	1
6 h	0,5 ± 0,1	ND	ND
12 h	2,5 ± 1,2	ND	ND
24 h	5,5 ± 1,2	1,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1

Tableau RI-2 : Induction de la fragmentation de l'ADN (ratio apoptotique) dans les cellules 1547 après traitement par les trois stéroïdes à 40 μ M ($P < 0,05$; ND : non déterminé).

4. Implication de la voie mitochondriale

Etant donné que les trois stéroïdes induisent l'apoptose, nous avons étudié l'une des voies apoptotiques qui est la voie intrinsèque ou mitochondriale.

4. 1. Etude de l'expression de Bax et Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 jouant un rôle crucial dans l'induction de l'apoptose par la mitochondrie, nous avons étudié l'expression de deux membres de cette famille : Bcl-2 (anti-apoptotique) et Bax (pro-apoptotique).

Les techniques de RT-PCR et de western blot nous ont permis d'analyser l'expression de Bcl-2 et Bax dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine à 40 μ M pendant 12 et 24 h. Les résultats montrent que, après 24 h de traitement, la diosgénine provoque une diminution de l'expression des ARNm de bcl-2 et de bax alors que l'hécogénine et la tigogénine induisent la transcription du gène bax (1,3 fois par rapport au contrôle, $P < 0,05$) sans changer l'expression de bcl-2 (Figure RI-8).

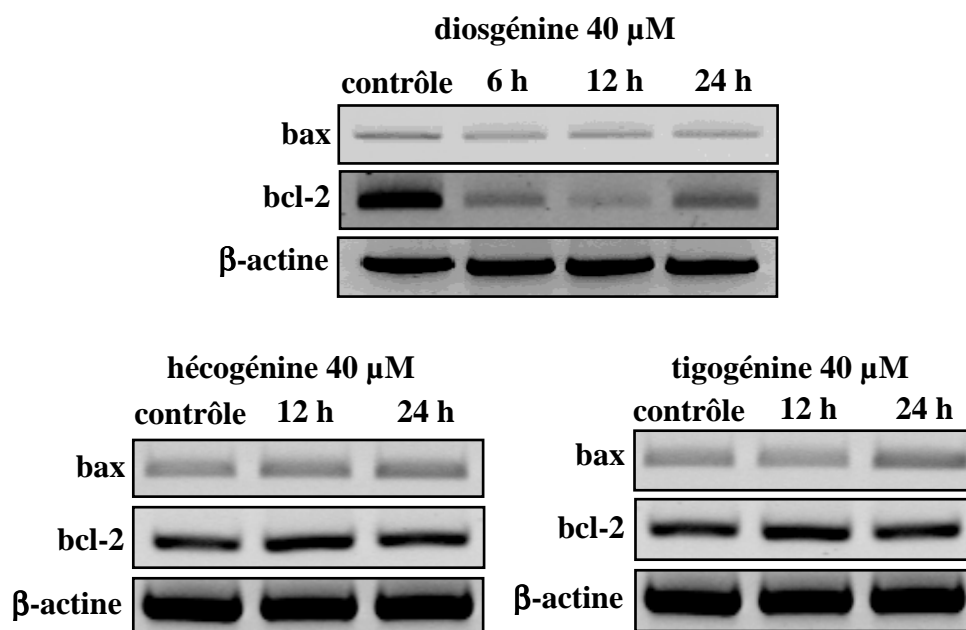


Figure RI-8 : Analyse de l'expression des ARNm bax et bcl-2 dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine. RT-PCR réalisées sur les cellules 1547 contrôles ou traitées par la diosgénine (6, 12 et 24 h), l'hécogénine (12 et 24 h) et la tigogénine (12 et 24 h) à 40 µM. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β-actine comme contrôle interne.

Le niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2) et pro-apoptotiques (Bax) après 24 h de traitement par la diosgénine révèle que le rapport Bax/Bcl-2, déterminant critique de l'apoptose, est augmenté par rapport au contrôle (1,53 fois par rapport au contrôle, $P < 0,05$). Les résultats de western blot obtenus après traitement par l'hécogénine et la tigogénine confirment ceux obtenus par RT-PCR. Le rapport Bax/Bcl-2 est fortement augmenté comparé au contrôle : 3 et 2,6 fois par rapport au contrôle respectivement ($P < 0,05$) (Figure RI-9).

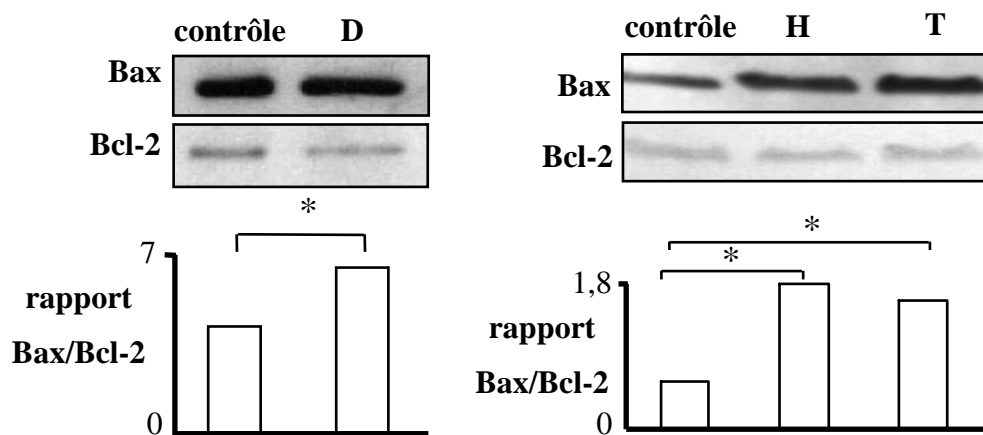


Figure RI-9 : Analyse de l'expression des protéines Bax et Bcl-2 dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine. Western blots réalisés sur les cellules 1547 traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D), l'hécogénine (H) et la tigogénine (T) pendant 24 h. Les histogrammes représentent le rapport Bax/Bcl-2 déterminé après analyse densitométrique des bandes.

Nous avons ensuite cherché à vérifier si l'augmentation de l'expression de la protéine Bax dans les cellules 1547 provoquait, comme il est connu, une chute du potentiel membranaire mitochondrial.

4. 2. Analyse de la chute de potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

La chute de potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) a été analysée sur les cellules 1547 après 6 et 24 h de traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine à 40 μM à l'aide de la sonde JC-1. La fluorescence obtenue indique les différences de potentiel membranaire entre les cellules traitées et les cellules contrôles. Après 6 h de traitement, aucune des trois molécules ne provoque de chute de potentiel. Après 24 h de traitement par la diosgénine, la fluorescence verte des cellules révèle une chute du $\Delta\Psi_m$ par rapport aux cellules contrôles qui présentent une fluorescence rouge (Figure RI-10). Les deux autres stéroïdes n'induisent pas de chute du $\Delta\Psi_m$, même après 24 h de traitement.

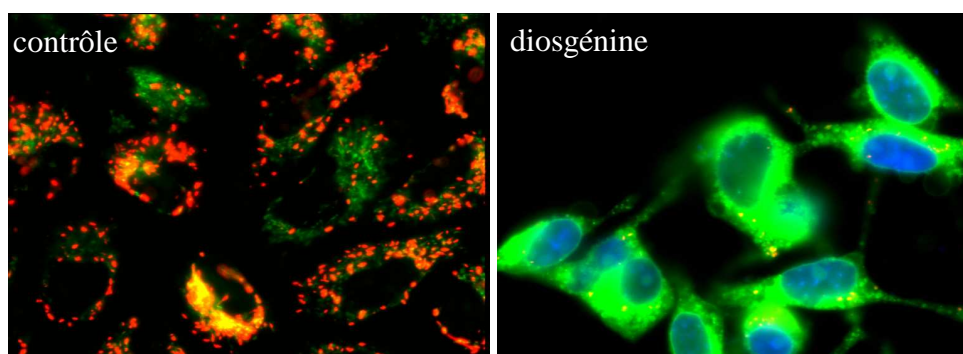


Figure RI-10 : Chute du $\Delta\Psi_m$ dans les cellules 1547 après 24 h de traitement par la diosgénine. La sonde JC-1 utilisée produit une fluorescence rouge lorsque le potentiel membranaire est intact car la sonde se retrouve sous forme d'agrégats. Au contraire, lorsque le potentiel est altéré, la mitochondrie ne peut concentrer la sonde. Celle-ci se retrouve sous forme de monomères qui produisent une fluorescence verte. Les photographies ont été prises avec un microscope Nikon (grossissement $\times 500$).

4. 3. Analyse de la quantité d'ATP dans les cellules après traitement par les stéroïdes

La chute de potentiel membranaire mitochondrial est souvent accompagnée d'une diminution de la production en ATP. Celle-ci a été quantifiée dans les cellules 1547 traitées par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μM pendant 6, 12 et 24 h.

Les histogrammes suivants montrent que la production d'ATP est fortement diminuée par la diosgénine (2,2 fois moins importante par rapport au contrôle, $P < 0,05$) et la tigogénine (3,4 fois moins importante par rapport au contrôle, $P < 0,05$), mais reste inchangée avec l'hécogénine après 6 h de traitement. A 12 h, la quantité d'ATP dans les cellules est similaire au contrôle lors du traitement par la diosgénine et l'hécogénine et est augmentée par la tigogénine (1,45 fois plus importante par rapport au contrôle, $P < 0,05$). Après 24 h de traitement, la quantité d'ATP produite par les cellules traitées est similaire à celle produite par les cellules contrôles (Figure RI-11).

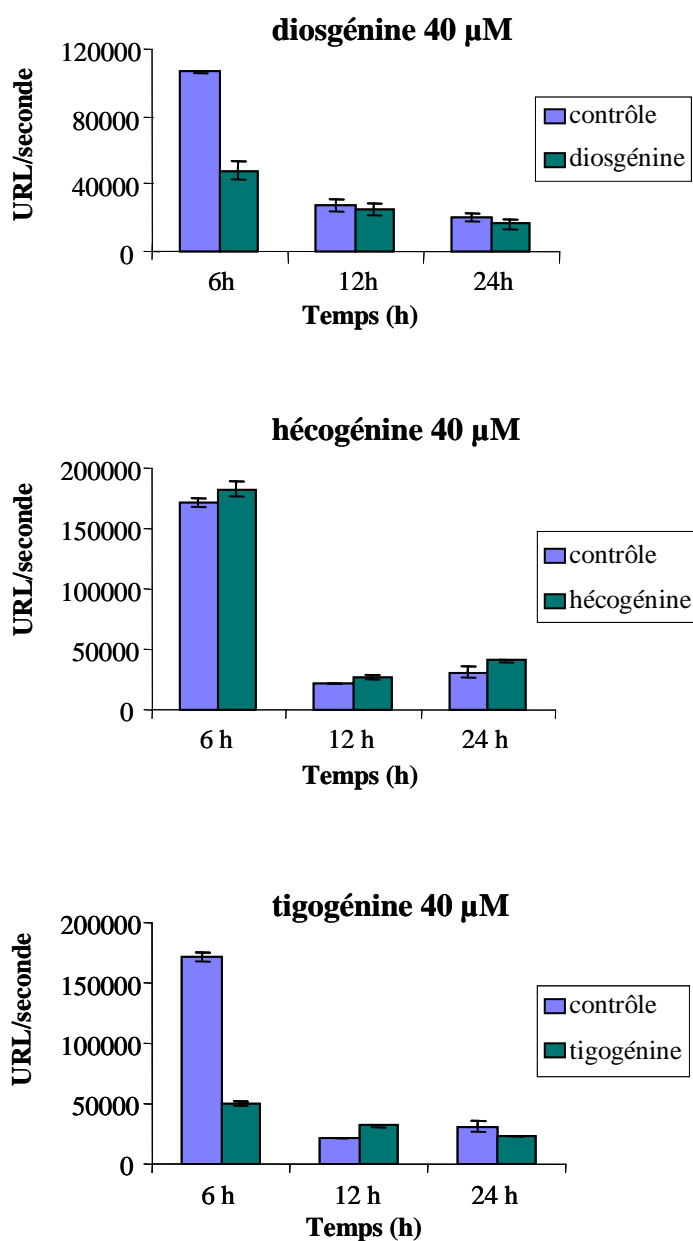


Figure RI-11 : Analyse de la production d'ATP dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine. L'ATP produit a été dosé sur les cellules 1547 contrôles ou traitées par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μM pendant 6, 12 et 24 h. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences et sont exprimés en unité relative de luminescence par seconde (URL/seconde).

4. 4. Etude de la redistribution subcellulaire du cytochrome c

La chute de potentiel membranaire mitochondrial provoque souvent un relargage des molécules situées dans l'espace intermembranaire comme le cytochrome c ou l'AIF. La libération du cytochrome c dans le cytosol permet la formation de l'apoptosome nécessaire à l'activation de la caspase-9.

Le relargage du cytochrome c a été analysé par western blot réalisé sur les fractions cytosolique et mitochondriale des cellules 1547 traitées ou non par la diosgénine à 40 μM . Cette étude a été faite après 6 h de traitement car le relargage du cytochrome c est un évènement précoce dans l'induction de l'apoptose. De plus, nous n'avons pas réalisé cette étude sur les cellules traitées par l'hécogénine et la tigogénine car ces deux molécules ne provoquent pas de chute de $\Delta\Psi\text{m}$.

Les résultats obtenus ne nous permettent pas d'affirmer que la diosgénine a un effet sur la libération du cytochrome c de la mitochondrie. En effet, le cytochrome c est présent dans les fractions mitochondriales des cellules contrôles et des cellules traitées en quantité similaire alors que la quantité devrait être diminuée dans les cellules traitées. De plus, l'analyse des fractions cytosoliques montre que le cytochrome c est présent dans le cytosol des cellules contrôles et des cellules traitées (Figure RI-12).

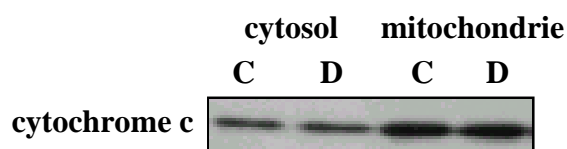


Figure RI-12 : Etude du relargage du cytochrome c dans les cellules 1547 après 6 h de traitement par la diosgénine. Les protéines cytosoliques (cytosol) et mitochondriales (mitochondrie) des cellules contrôles (C) et des cellules traitées par la diosgénine (D) ont été extraites puis soumises à une analyse par western blot.

4. 5. Localisation nucléaire de l'AIF

L'AIF est une flavoprotéine présente dans la mitochondrie qui peut, sous l'effet de certains stimuli, être relarguée dans le cytosol puis être transloquée dans le noyau afin d'induire l'apoptose. Une analyse par western blot a été réalisée à partir des extraits cytosoliques, mitochondriaux et nucléaires de cellules 1547 traitées ou non par la diosgénine pendant 6 h. L'utilisation de la β -actine permet de vérifier que les extractions ont été réalisées correctement.

Comme pour l'analyse du cytochrome c, nous n'avons pas réalisé cette étude sur les cellules traitées par l'hérogénine et la tigogénine.

La figure RI-13 montre que l'AIF est présent en grande quantité dans la mitochondrie (EM) par rapport au cytosol (EC) et qu'il est localisé au niveau du noyau (EN) des cellules contrôles et des cellules traitées par la diosgénine, à un niveau d'expression similaire. Sa distribution subcellulaire n'est donc pas modifiée après traitement par la diosgénine.

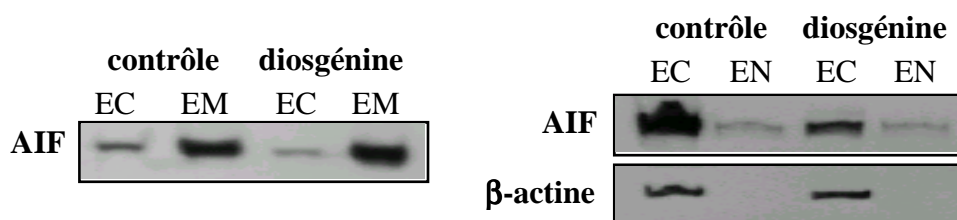


Figure RI-13 : Localisation de l'AIF dans les cellules 1547 après 6 h de traitement par la diosgénine. Les extraits cytosoliques (EC), mitochondriaux (EM) et nucléaires (EN) des cellules contrôles et des cellules traitées par la diosgénine ont été soumis à une analyse par western blot.

4. 6. Activation des caspases après traitement des cellules par les stéroïdes

Les activités des caspases-8, -9 et -3 ont été analysées afin de déterminer si l'apoptose induite par les stéroïdes était dépendante des caspases et afin de définir quelle(s) caspase(s) pourrait être impliquée dans la mort cellulaire induite par les stéroïdes.

Une première analyse de l'expression du messenger des caspases a été réalisée sur les cellules 1547 après traitement par la diosgénine (6, 12 et 24 h), l'hérogénine (12 et 24 h) et la tigogénine (12 et 24 h) à 40 μ M. L'analyse du niveau d'expression des ARNm des trois caspases ne montre pas de différence significative entre la quantité des ARNm exprimés par les cellules traitées et ceux exprimés par les cellules contrôles. Pour cette raison, l'étude de l'activité enzymatique des caspases est indispensable (Figure RI-14).

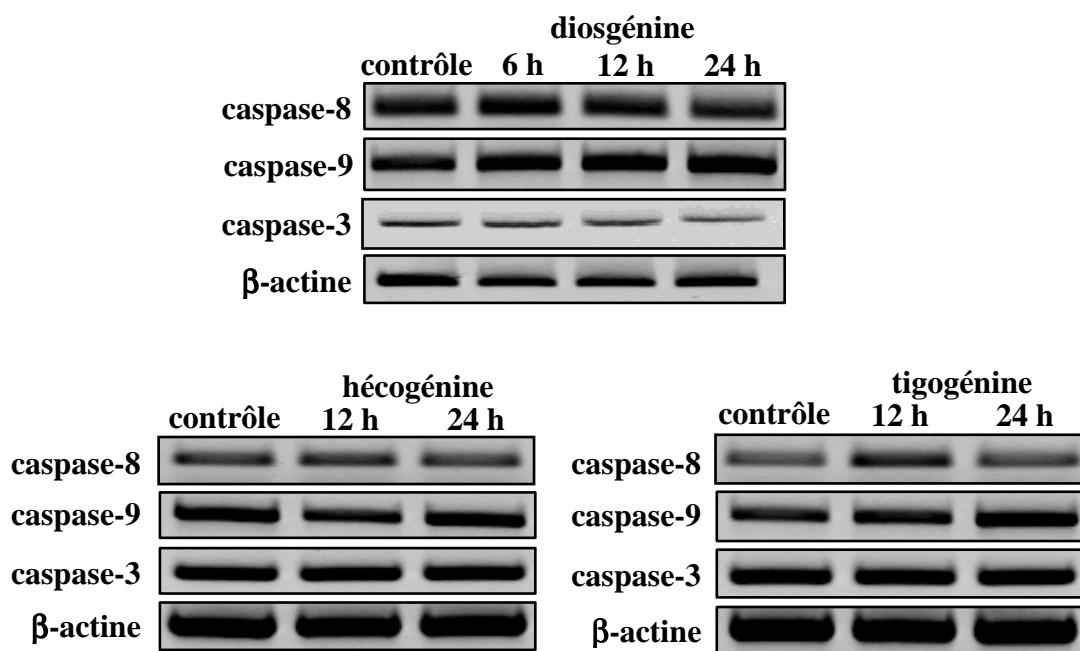


Figure RI-14 : Analyse des ARNm des caspases-8, -9 et -3 après traitement des cellules 1547 par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine. RT-PCR réalisées sur les cellules 1547 contrôles ou traitées par la diosgénine (6, 12 et 24 h), l'hécogénine (12 et 24 h) et la tigogénine (12 et 24 h) à 40 μ M. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne.

L'activité des caspases a été dosée après 12 et 24 h de traitement par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μ M. Un inhibiteur non spécifique des caspases (DEVD-CHO) a été utilisé afin de vérifier que la fluorescence obtenue était bien due à l'action des caspases et non à l'action d'autres protéases. Après 12 h de traitement par la diosgénine, aucune modification des activités des caspases n'est observée par rapport au contrôle. Les activités des caspases-8 et -9 sont faiblement augmentées alors que l'activité de la caspase-3 est significativement induite (1,4 fois plus importante par rapport au contrôle, $P < 0,01$) après 24 h de traitement par la diosgénine. De façon surprenante, les activités des caspases-8, -9 et -3 sont diminuées après 12 h de traitement par l'hécogénine à 40 μ M : 1,2 fois, 1,4 fois et 1,2 fois moins importante par rapport aux contrôles respectifs ($P < 0,01$). L'hécogénine n'induit pas de variation des activités caspases à 24 h. Après 12 et 24 h de traitement par la tigogénine, seule l'activité de la caspase-3 est augmentée mais de façon modérée (1,2 fois plus importante par rapport au contrôle, $P < 0,05$) (Figure RI-15).

En résumé, seule la diosgénine induit l'activité des caspases-8 et -9 initiatrices et de la caspase-3 exécutive après 24 h de traitement. La tigogénine augmente de façon modérée l'activité de la caspase-3.

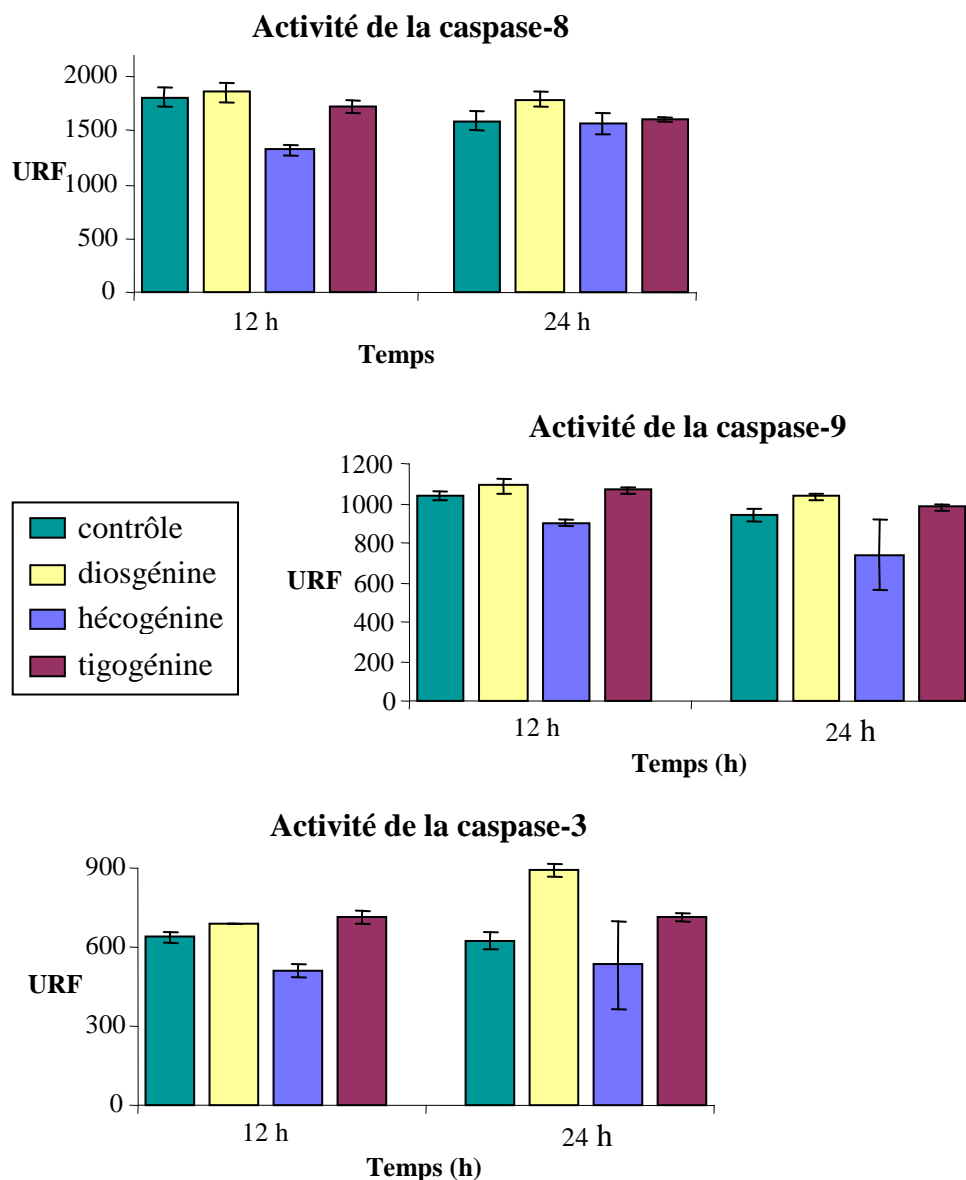


Figure RI-15 : Analyse des activités des caspases-8, -9 et -3 après traitement des cellules 1547 par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine. Les activités des caspases ont été dosées à partir des lysats cellulaires des cellules 1547 contrôles ou traitées par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μ M pendant 12 et 24 h. Le dosage a été réalisé à l'aide des substrats de la caspase-8 (Ac-IETD-AMC), de la caspase-9 (Ac-LEHD-AMC) et de la caspase-3 (Ac-DEVD-AMC). Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences et sont exprimées en unité relative de fluorescence (URF).

4. 7. Etude du clivage de PARP après traitement des cellules par les stéroïdes

L'activation des caspases représente la phase d'exécution de l'apoptose. Celle-ci est caractérisée par le clivage de nombreux substrats des caspases comme celui de la PARP qui est une enzyme de réparation. Le clivage de la PARP a été analysé sur les cellules 1547 après 24 h de traitement par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μ M. L'étude du clivage s'est fait par western blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant à la fois la protéine native de 112 kDa et le fragment de 85 kDa obtenu après clivage. De plus, une analyse par immunohistochimie a été réalisée afin de mettre en évidence la présence du fragment de 85 kDa dans les cellules.

Bien que la caspase-3 soit induite par la diosgénine, aucun clivage de PARP n'a été observé aussi bien par western blot que par immunohistochimie (Figure RI-16A et B). Le traitement des cellules par l'hécogénine ou la tigogénine n'induit pas le clivage de PARP comme le montre le résultat par western blot. Pour cette raison et en tenant compte du résultat similaire obtenu pour la diosgénine, nous n'avons pas réalisé d'immunohistochimie dans ces conditions.

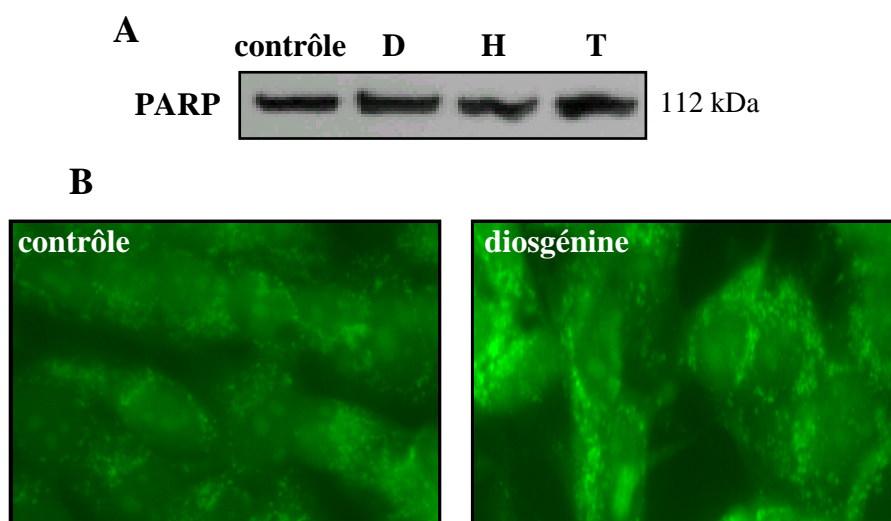


Figure RI-16 : Analyse du clivage de PARP dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine. (A) Western blot réalisé sur les cellules 1547 traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D), l'hécogénine (H) et la tigogénine (T) pendant 24 h. **(B)** Immunohistochimie réalisée sur les cellules adhérentes traitées ou non (contrôle) par la diosgénine à 40 μ M pendant 24 h. Les photographies ont été prises avec un microscope Nikon (grossissement \times 500).

4. 8. Implication de Bid dans l'apoptose induite dans les cellules 1547 par les stéroïdes

La protéine Bid qui est le plus souvent clivée par la caspase-8 lors de la phase d'initiation de l'apoptose a été étudiée par western blot après 6 h de traitement. L'anticorps utilisé reconnaît, comme dans le cas de PARP, la protéine native de 22 kDa et la protéine tronquée de 15 kDa. Les résultats obtenus sur les cellules 1547 après 6 h de traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine montre uniquement la présence de la protéine native. Bid ne semble donc pas être clivée dans ces cellules (Figure RI-17).

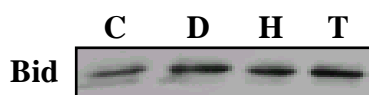


Figure RI-17 : Analyse du clivage de Bid dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine. Western blot réalisé sur les cellules 1547 traitées ou non (C, contrôle) par la diosgénine (D), l'hécogénine (H) et la tigogénine (T) pendant 6 h.

5. Expression et activité cyclooxygénase

L'expression des ARNm de COX-1 et de COX-2 a été analysée par RT-PCR à partir des ARNm extraits des cellules traitées ou non par la diosgénine (6, 12 et 24 h), l'hécogénine (12 et 24 h) et la tigogénine (12 et 24 h) à 40 μ M. Les résultats indiquent que l'expression de l'ARNm de COX-1 n'est pas modifiée de façon significative au cours du traitement par la diosgénine alors que l'expression de l'ARNm de COX-2 est diminuée au cours du temps. Le traitement par l'hécogénine diminue l'expression de COX-1 à 24 h et augmente celle de COX-2 tandis que la tigogénine provoque une augmentation de l'expression de l'ARNm de COX-1 après 24 h de traitement et augmente l'expression de COX-2 au cours du temps (Figure RI-18A).

L'analyse de l'expression de la protéine COX-2 ne confirme pas les résultats obtenus par les RT-PCR. En effet, COX-2 est fortement induite par la diosgénine après 24 h de traitement (3,8 fois plus importante par rapport au contrôle, $P < 0,05$), elle est diminuée après traitement par l'hécogénine (1,5 fois moins importante par rapport au contrôle, $P < 0,05$) et elle est inchangée avec la tigogénine (Figure RI-18B).

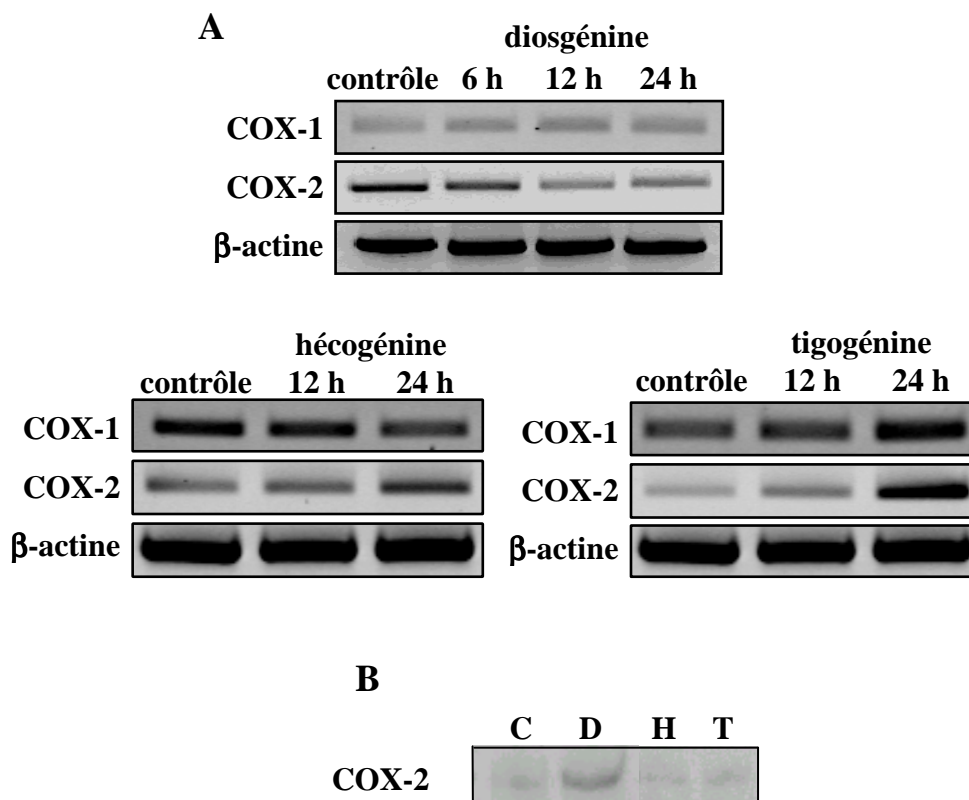


Figure RI-18 : Effet des stéroïdes sur l'expression des COXs dans les cellules 1547.

(A) RT-PCR réalisées sur les cellules 1547 contrôles ou traitées par la diosgénine (6, 12 et 24 h), l'hécogénine (12 et 24 h) et la tigogénine (12 et 24 h) à 40 μ M. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne. (B) Western blot de COX-2 réalisé sur les cellules 1547 traitées ou non (C, contrôle) par la diosgénine (D), l'hécogénine (H) et la tigogénine (T) pendant 24 h.

Le dosage de la PGE₂ a été réalisé par ELISA après 6, 12 et 24 h de traitement par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine. Après 6 h de traitement par la diosgénine, la production de PGE₂ est doublée (2,1 fois plus importante par rapport au contrôle, P<0,05) puis elle augmente au cours du temps (3,1 fois et 4,6 fois à 12 et 24 h respectivement par rapport au contrôle, P<0,05). Contrairement à la diosgénine, la production de PGE₂ est fortement diminuée après 24 h de traitement par l'hécogénine et la tigogénine : 2,4 fois et 2,8 fois moins élevée respectivement par rapport au contrôle (P<0,05) (Figure RI-19).

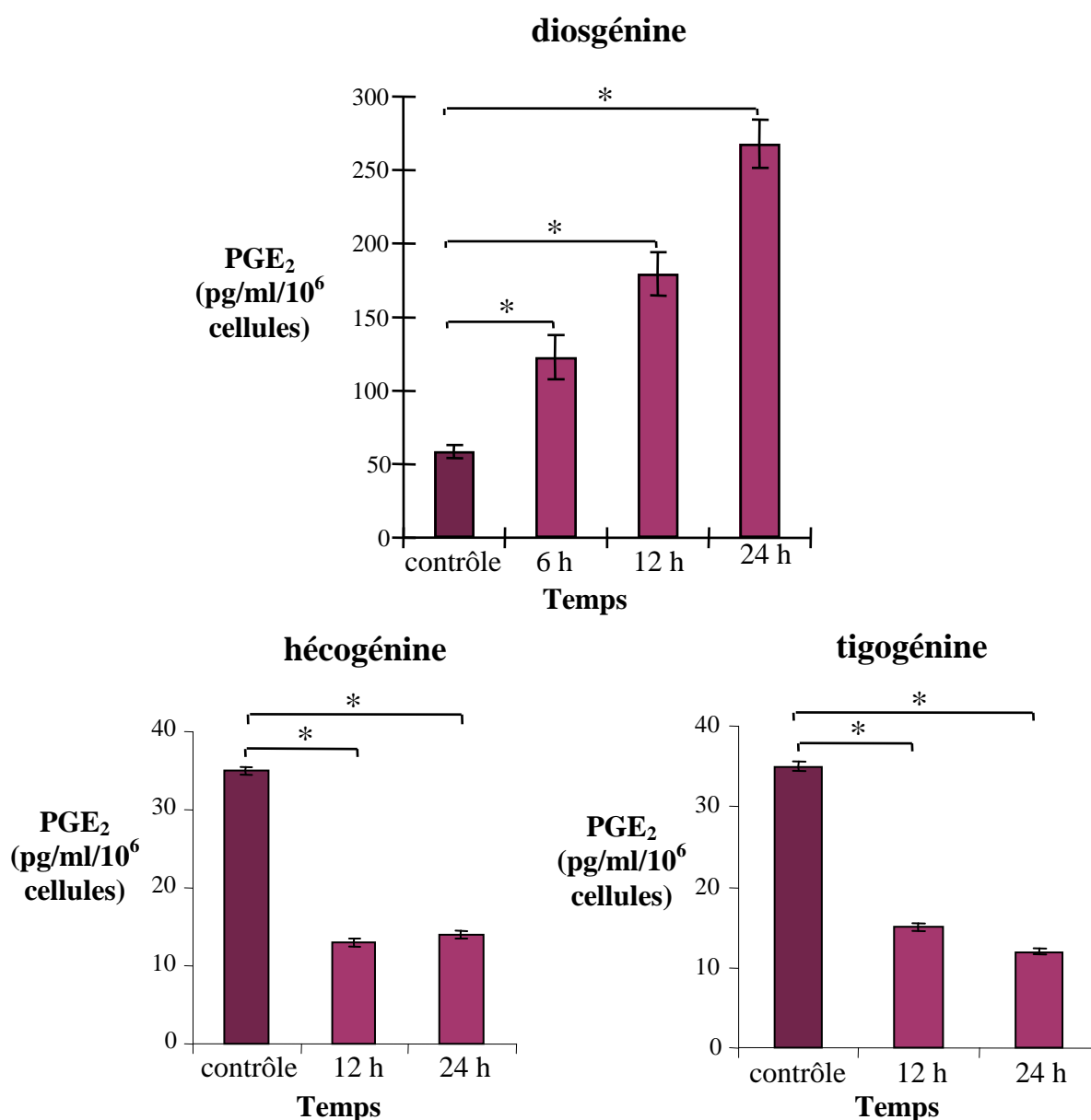


Figure RI-19 : Effet des stéroïdes sur l'activité des COXs dans les cellules 1547. La production de PGE₂ a été dosée à partir des surnageants des cellules contrôles ou traitées par la diosgénine (6, 12 et 24 h), l'hécogénine (12 et 24 h) et la tigogénine (12 et 24 h) à 40 μM. La quantité de PGE₂ a été ramenée aux nombres de cellules viables. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences (* P<0,05) et sont exprimées en pg/ml/10⁶ cellules.

6. Rôle de NF- κ B et des PPARs dans l'apoptose induite par les stéroïdes

6. 1. Rôle de NF- κ B

Afin de déterminer si NF- κ B joue un rôle dans l'apoptose induite par les stéroïdes, nous avons transfecté les cellules avec un plasmide contenant le gène de la luciférase sous la dépendance de l'élément de réponse à NF- κ B. Après transfection, les cellules ont été traitées pendant 24 h avant que l'activité luciférase ne soit évaluée. Mais les valeurs obtenues après traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine sont similaires aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles (Figure RI-20).

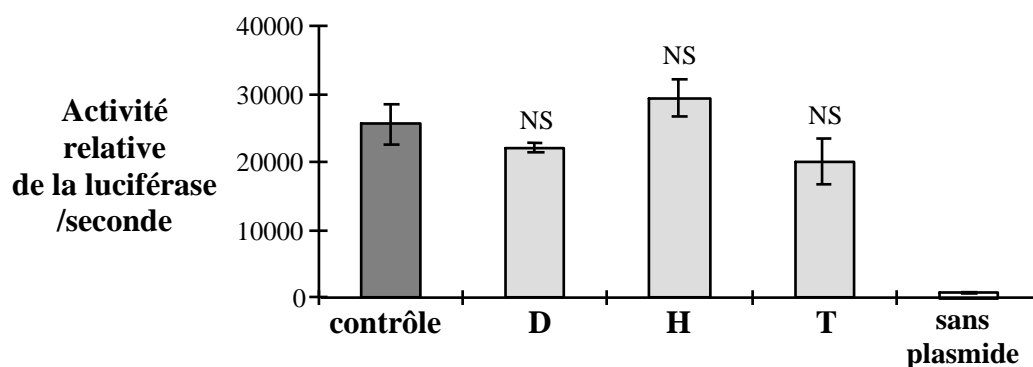


Figure RI-20 : Induction de NF- κ B dans les cellules 1547. Transfection transitoire des cellules par les plasmides pGL3-NF- κ B-Luc et pCMV- β -gal afin de déterminer l'activité luciférase dépendante de NF- κ B. Après transfection, les cellules ont été traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D), l'hécogénine (H) et la tigogénine (T) à 40 μ M pendant 24 h. Un contrôle négatif (sans plasmide) a également été réalisé. L'activité luciférase a été rapportée à l'activité de la β -galactosidase. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences et sont exprimés en activité relative de luciférase par seconde (NS, non significatif par rapport au contrôle).

Une analyse de retard sur gel a ensuite été réalisée afin de confirmer l'expérience de transfection. Contrairement aux résultats obtenus précédemment, les trois stéroïdes induisent la liaison de NF- κ B à l'ADN comme le montre la Figure RI-21. Une incubation avec une sonde non marquée 100 fois plus concentrée permet de vérifier la spécificité de liaison de NF- κ B. De plus, les extraits protéiques nucléaires ont été soumis à une analyse par western blot afin de déterminer les sous-unités du complexe NF- κ B. Cette analyse montre que le complexe activé par la

diosgénine est un hétérodimère formé de p50 et de p65 (Figure RI-21A).

Etant donné que la liaison de NF- κ B à l'ADN est élevée dans les cellules contrôles, nous avons utilisé un inhibiteur du protéasome 26S, le MG132, connu pour inhiber l'activation de NF- κ B afin de déterminer le rôle de NF- κ B sur l'induction de certains gènes. En présence de MG132 à 3 μ M pendant 24 h, l'activation de NF- κ B est complètement inhibée comme le montre l'analyse de retard sur gel et l'expression des ARNm de p53 et de p21 diminue fortement après 24 h de traitement (Figure RI-21A et B).

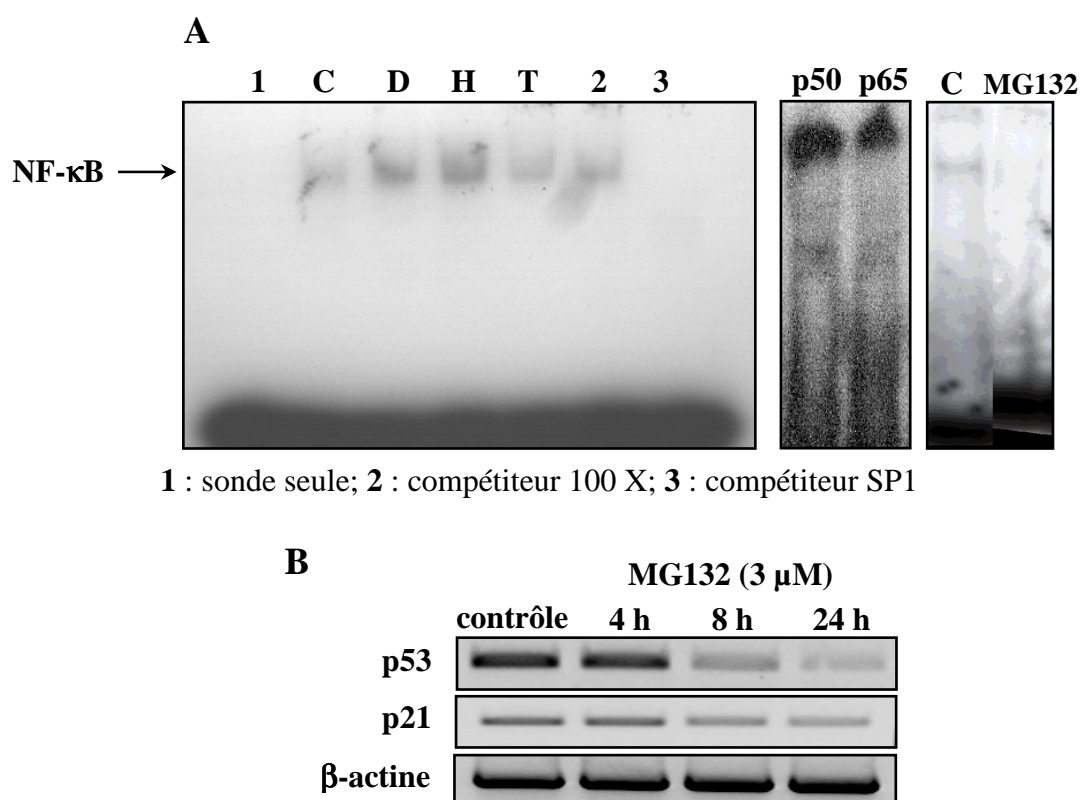


Figure RI-21 : Induction de NF- κ B dans les cellules 1547 traitées par les stéroïdes. (A) Analyse de l'activation de NF- κ B par gel retard. Les cellules ont été traitées ou non (contrôle, C) par la diosgénine (D), l'hécogénine (H) et la tigogénine (T) à 40 μ M pendant 24 h ou par le MG132 à 3 μ M pendant 4 h. **(B)** Analyse des ARNm de p53 et p21 après traitement par 3 μ M de MG132 pendant 4, 8 et 24 h. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne.

6. 2. Rôle des PPARs

Plusieurs travaux ont montré que les PPARs jouaient un rôle important dans l'apoptose, c'est pourquoi nous avons étudié l'expression des ARNm et des protéines des deux isoformes les plus connues, PPAR γ et PPAR α . Le niveau de transcription de PPAR α est fortement augmenté après traitement par la diosgénine pendant 24 h (6,3 fois par rapport au contrôle, $P < 0,05$) et induit modérément avec l'hécogénine et la tigogénine (1,3 fois et 1,75 fois par rapport au contrôle respectivement, $P < 0,05$). Au contraire, l'expression de l'ARNm de PPAR γ n'est pas modifiée par les différents traitements (Figure RI-22A).

Contrairement aux résultats des RT-PCR et après 24 h de traitement par les stéroïdes, l'expression de la protéine PPAR γ est fortement augmentée (1,6 fois, 2,4 fois et 3,3 fois plus importante par rapport au contrôle avec la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine respectivement, $P < 0,05$) alors que l'expression de PPAR α est inchangée après traitement par les stéroïdes (Figure RI-22B).

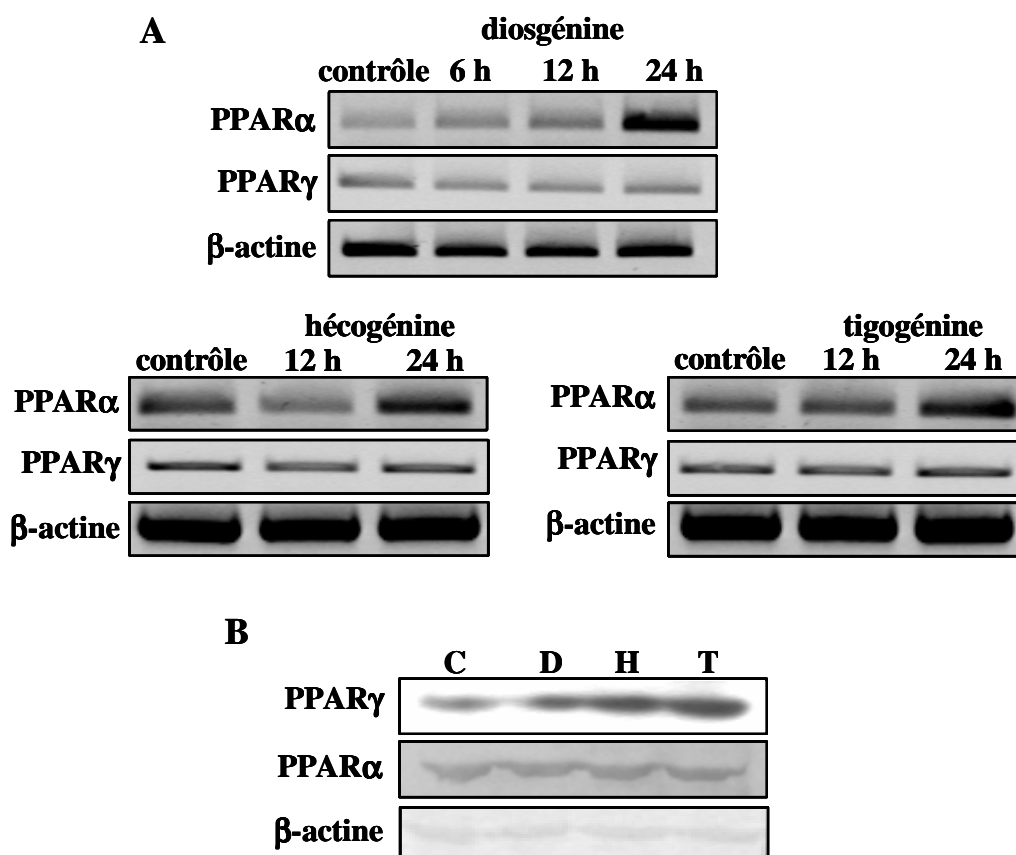


Figure RI-22 : Expression des ARNm et des protéines PPAR α et PPAR γ dans les cellules 1547 traitées par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine. (A) RT-PCR réalisées sur les cellules 1547 contrôles ou traitées par la diosgénine (6, 12 et 24 h), l'hécogénine (12 et 24 h) et la tigogénine (12 et 24 h) à 40 μ M. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne. (B) Western blot réalisé sur les cellules 1547 traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D), l'hécogénine (H) et la tigogénine (T) à 40 μ M pendant 24 h. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne.

Afin de déterminer si PPAR γ agit en tant que facteur de transcription, nous avons transfecté les cellules avec un plasmide contenant le gène de la luciférase sous la dépendance de l'élément de réponse PPRE. Après transfection, les cellules ont été traitées par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μ M pendant 24 h. Le dosage de l'activité luciférase montre qu'aucun des stéroïdes n'induit la transactivation de PPAR γ (Figure RI-23). De plus, l'analyse de retard sur gel a confirmé les résultats obtenus avec les expériences de transfection.

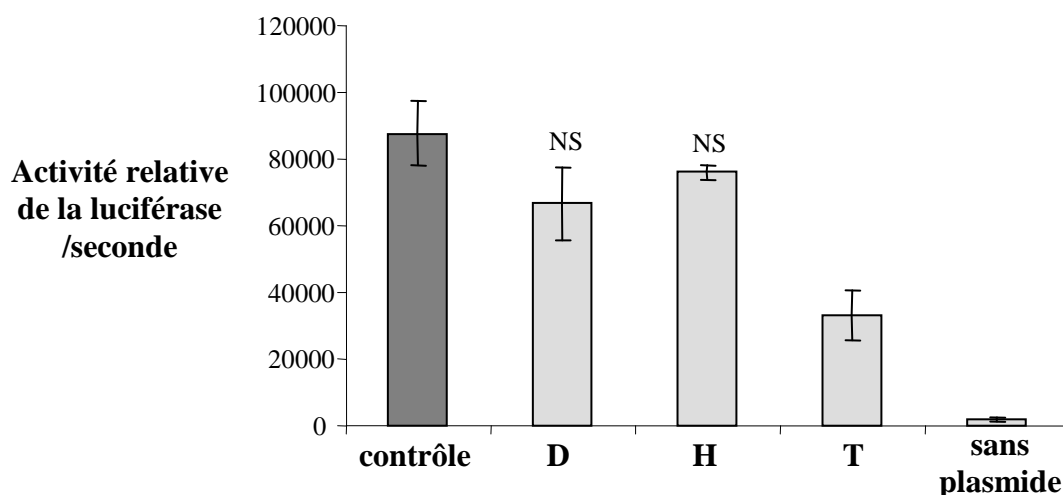


Figure RI-23 : Etude de la transactivation de PPAR γ dans les cellules 1547.

Transfection transitoire des cellules par les plasmides pGL3/ACO-PPRE-Luc et pCMV- β -gal afin de déterminer l'activité luciférase dépendante de PPAR. Après transfection, les cellules ont été traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D), l'hécogénine (H) et la tigogénine (T) à 40 μ M pendant 24 h. Un contrôle négatif (sans plasmide) a également été réalisé. L'activité luciférase a été rapportée à l'activité de la β -galactosidase. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences et sont exprimés en activité relative de luciférase par seconde (NS, non significatif par rapport au contrôle).

7. Utilisation du modèle 1547/diosgénine en SdFFF

L'induction de l'apoptose par la diosgénine dans les cellules 1547 a été utilisée afin de montrer que la SdFFF peut être utilisée comme outil de détection rapide de l'apoptose.

Le marquage des cellules au DAPI permet de visualiser la condensation des noyaux des cellules contrôles et des cellules traitées par la diosgénine pendant 24 h avant et après passage des cellules en SdFFF. Les résultats confirment que la SdFFF ne modifie pas le nombre de cellules apoptotiques.

Le dosage de la fragmentation de l'ADN a été réalisé sur les cellules 1547 après traitement par la diosgénine (40 μ M), l'hécogénine (40 μ M), la tigogénine (40 μ M), la staurosporine (0,1 μ M) et le MG132 (3 μ M) pendant 24 h. La staurosporine induit la plus forte fragmentation ($32,4 \pm 2,2$, $P < 0,05$), la diosgénine et le MG132 ayant un effet similaire sur la génération de fragments oligonucléosomiques ($5,5 \pm 1,2$ et $4,2 \pm 1,6$ respectivement, $P < 0,05$). L'hécogénine et la

tigogénine induisent une fragmentation moins importante comme cela a été décrit au paragraphe 3 ($1,3 \pm 0,1$ et $2,2 \pm 0,1$ respectivement, $P < 0,05$).

De plus, l'observation microscopique des cellules après traitement pendant 6 h par la diosgénine, le MG132 et la staurosporine montre que ces molécules provoquent des changements morphologiques par rapport aux cellules contrôles. L'hécogénine et la tigogénine n'induisent pas de tels changements comme cela a été montré auparavant. De plus, ces modifications ne sont pas les mêmes en fonction du traitement comme le montrent les photographies suivantes (Figure RI-24).

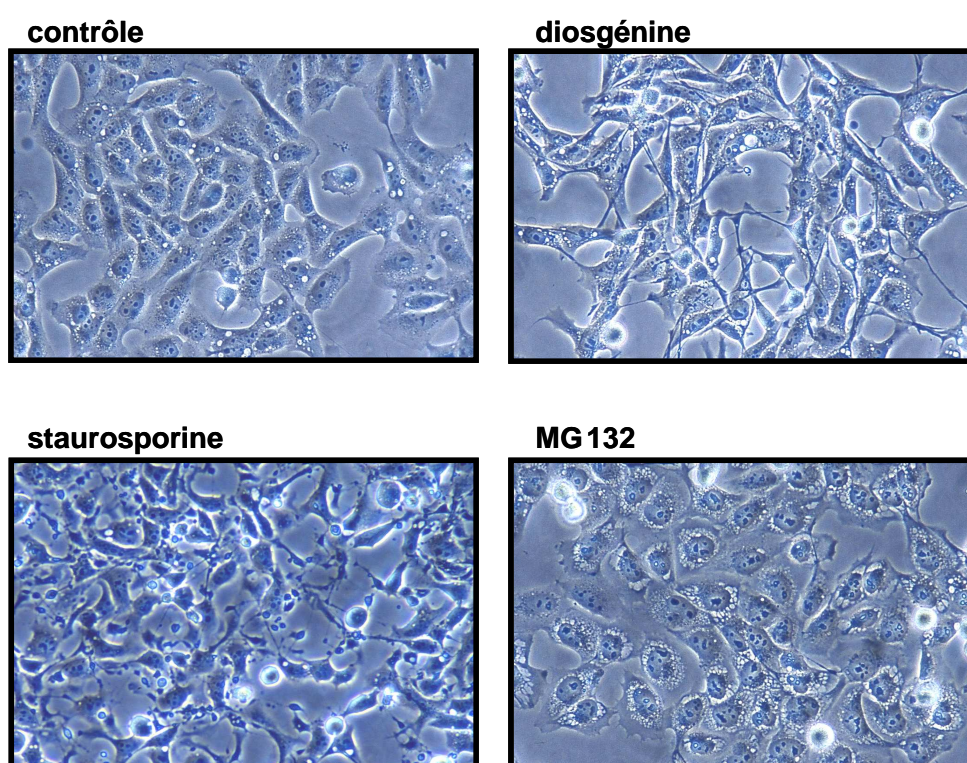


Figure RI-24 : Observation en microscopie optique des cellules 1547. Les cellules ont été traitées pendant 6 h par la diosgénine ($40 \mu\text{M}$), la staurosporine ($0,1 \mu\text{M}$) et le MG132 ($3 \mu\text{M}$) (grossissement $\times 400$).

Les fractogrammes obtenus montrent que la diosgénine induit un décalage du pic cellulaire vers la droite (Figure RI-25) alors que la staurosporine (Figure RI-25) et le MG132 (Figure RI-26) induisent un décalage vers la gauche. Ce décalage se produit après 6 h de traitement et s'accroît au cours du traitement. Le temps de rétention des cellules traitées par la diosgénine est donc augmenté contrairement aux temps de rétention des cellules traitées par la staurosporine et le

MG132. De plus, un pic intermédiaire de cellules apparaît après traitement par le MG132 (Figure RI-26).

Ces différences de profil apparaissent dès 6 h de traitement alors que la tigogénine n'induit qu'un faible décalage du pic après 24 h de traitement et que l'hécogénine ne modifie pas le profil d'éluion (Figure RI-26).

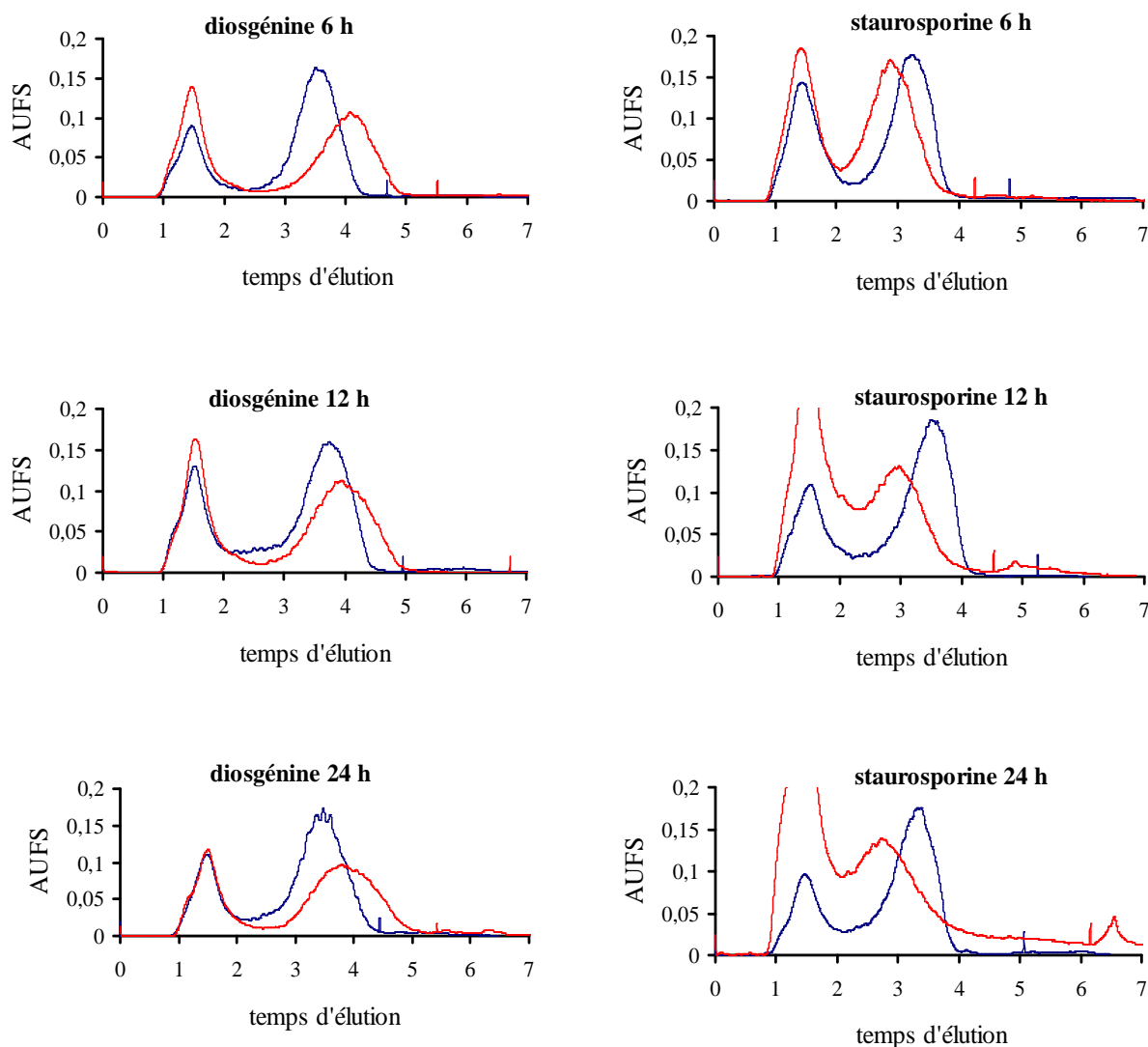


Figure RI-25 : Fractogrammes des cellules 1547 obtenus après SdFFF. Les cellules ont été traitées (en rouge) ou non (contrôle en bleu) pendant 6, 12 et 24 h par la diosgénine (40 μM) et la staurosporine (0,1 μM). Les conditions d'éluion sont les suivantes : 100 μl de suspension cellulaire injectés (2×10^6 cellules/ml), débit de la phase mobile (PBS, pH 7,4) : 0,6 ml/min, force du champ multigravitationnel : $40 \pm 0,03$ g, détection spectrophotométrique $\lambda = 254$ nm.

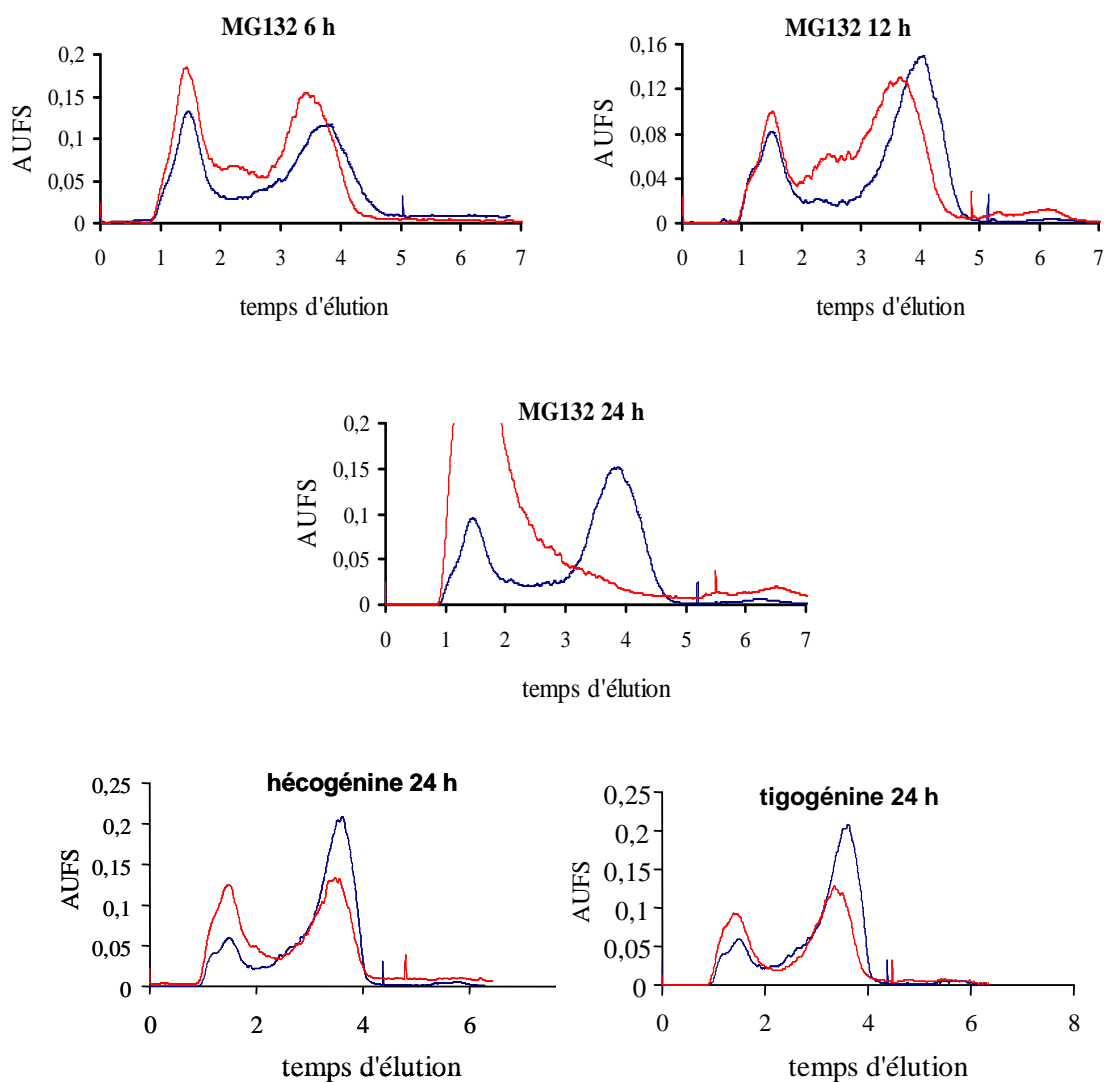


Figure RI-26 : Fractogrammes des cellules 1547 obtenus après SdFFF. Les cellules ont été traitées (en rouge) ou non (contrôle en bleu) pendant 6, 12 et 24 h par le MG132 (3 μM) et pendant 24 h par l'hécogénine (40 μM) et la tigogénine (40 μM). Les conditions d'élution sont les suivantes : 100 μl de suspension cellulaire injectés (2×10^6 cellules/ml), débit de la phase mobile (PBS, pH 7,4) : 0,6 ml/min, force du champ multigravitationnel : $40 \pm 0,03$ g, détection spectrophotométrique $\lambda = 254$ nm.

Si nous considérons travailler dans des conditions de densité équivalente, les différences observées pourraient s'expliquer par une modification de la taille des cellules induite par les molécules. Nous avons donc mesuré le diamètre des cellules traitées par la diosgénine, la staurosporine et le MG132 à l'aide d'un Coulter Counter. La détermination du diamètre des cellules montre qu'elles ont toutes une taille plus importante par rapport au contrôle dès 6 h de

traitement (Figure RI-27). La staurosporine augmente la taille des cellules de 2 μm après 24 h de traitement.

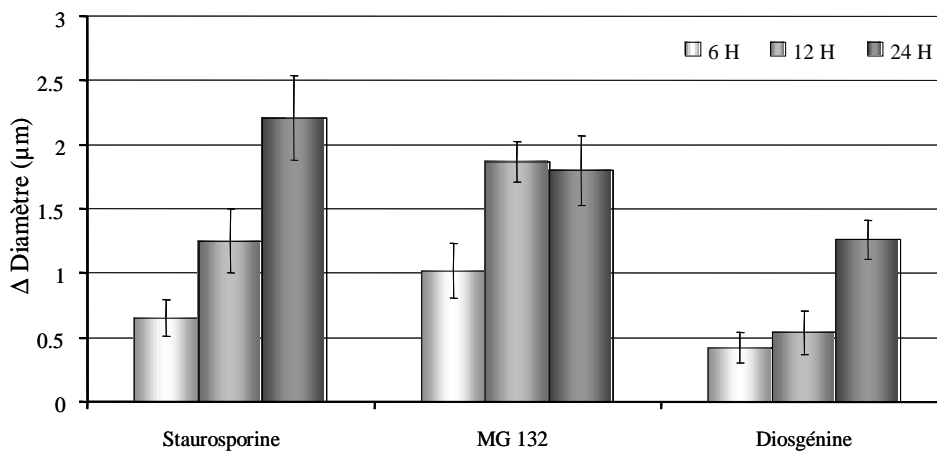


Figure RI-27 : Variation du diamètre des cellules 1547 au cours de l'apoptose. Les cellules ont été traitées ou non pendant 6, 12 et 24 h par la diosgénine (40 μM), la staurosporine (0,1 μM) et le MG132 (3 μM). Les résultats correspondent à la différence des moyennes des diamètres obtenus entre les cellules traitées et les cellules contrôles.

II- Effets de la diosgénine sur deux autres types cellulaires : les cellules HEP-2 et M4Beu

Nous avons précédemment montré que la diosgénine exerçait un effet anti-prolifératif plus important que l'hécogénine et la tigogénine sur les cellules 1547. Pour cette raison, nous avons uniquement travaillé avec la diosgénine pour la suite de nos travaux réalisés sur deux autres lignées cellulaires humaines, les cellules HEP-2 (laryngocarcinome) et les cellules M4Beu (mélanome).

1. Prolifération cellulaire

1. 1. Etude de la prolifération cellulaire par le MTT

Les cellules HEP-2 et M4Beu sont cultivées dans du milieu contenant 10 % de SVF pendant 72 h avant d'être traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 4 jours afin de déterminer si la diosgénine agit de la même façon que sur les cellules 1547. La prolifération cellulaire est estimée par le test au MTT.

Les résultats obtenus après 24 h de traitement montrent que la diosgénine à 40 μ M inhibe la prolifération de façon importante dans les deux types cellulaires (76 % et 91 % d'inhibition pour les cellules HEP-2 et M4Beu respectivement, $P < 0,05$) (Figure RII-1). Le résultat précédent a été confirmé par un comptage au bleu trypan afin de déterminer la viabilité des cellules après traitement par rapport au contrôle.

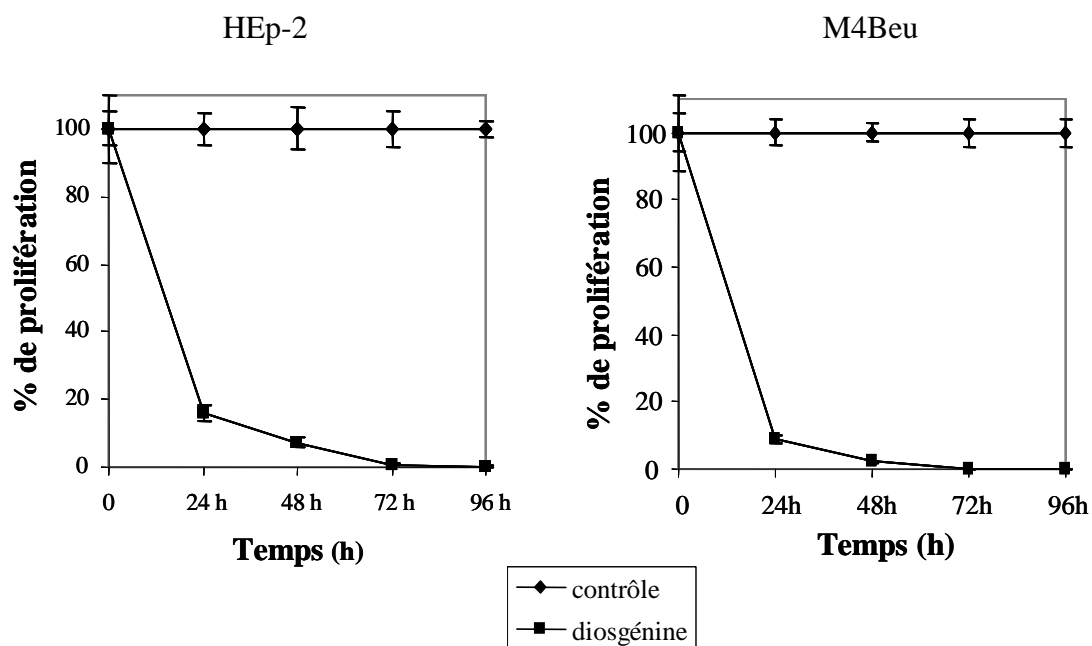


Figure RII-1 : Effets de la diosgénine sur la prolifération des cellules HEp-2 et M4Beu.

1. 2. Observation des cellules en microscopie optique

Les différences de morphologie induites ou non par la diosgénine sur les cellules HEp-2 et M4Beu ont été observées en microscopie optique. La figure correspondant aux cellules traitées par la diosgénine à 40 μ M montre la réduction de la taille des cellules, la condensation du cytoplasme et l'apparition de cellules arrondies comparées au contrôle (Figure RII-2).

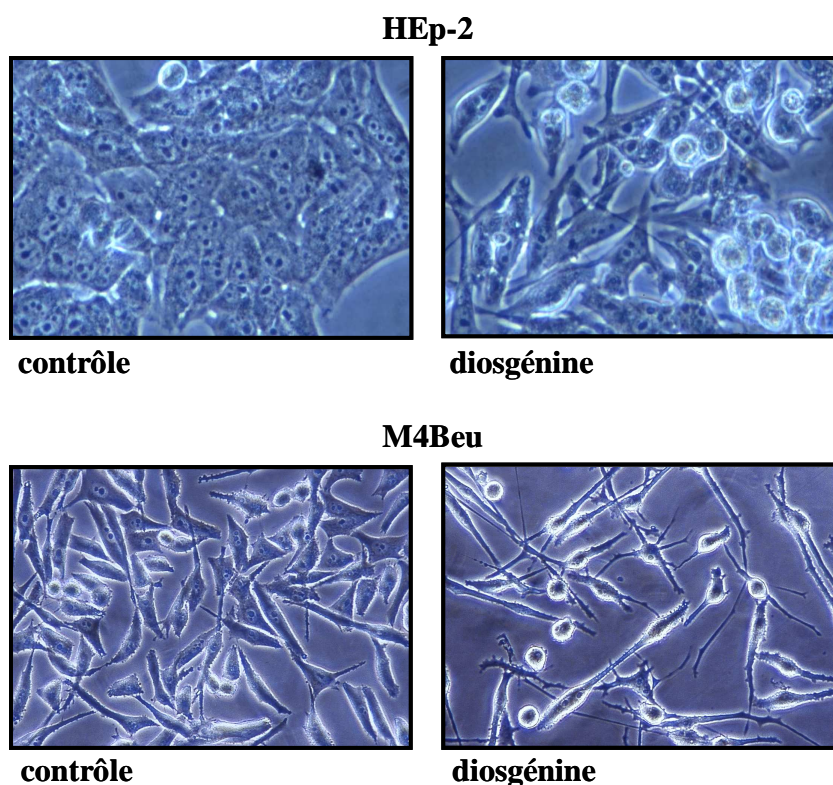


Figure RII-2 : Observation en microscopie optique des cellules HEp-2 et M4Beu traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 24 h (grossissement \times 400).

2. Etude du cycle cellulaire et étude de l'expression de p21 et p53

2. 1. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules HEp-2 et M4Beu ont été traitées par 40 μ M de diosgénine pendant 12 et 24 h. Après 12 h de traitement, le nombre de cellules HEp-2 en phase S diminue (26,5 % par rapport au contrôle (35 %), $P < 0,05$) alors que la répartition des cellules dans les autres phases du cycle cellulaire est similaire à celle des cellules contrôles. La distribution des cellules après 24 h de traitement par la diosgénine est significativement modifiée par rapport au contrôle. En effet, le nombre de cellules en phase G_0/G_1 est considérablement diminué : 23,6 % avec la diosgénine par rapport à 51,2 % pour les cellules contrôles ($P < 0,05$). A l'opposé, le nombre de cellules en phase S et en phase G_2/M est fortement augmenté : 49 % de cellules traitées en phase S par rapport à 32,5 % pour les cellules contrôles ($P < 0,05$) et 27,3 % de cellules traitées en phase G_2/M par rapport à 16,3 % pour les cellules contrôles ($P < 0,05$). Les cellules HEp-2 sont donc bloquées en phase S après traitement par la diosgénine. De plus, une population sub- G_1 apparaît après 24 h de traitement (Figure RII-3).

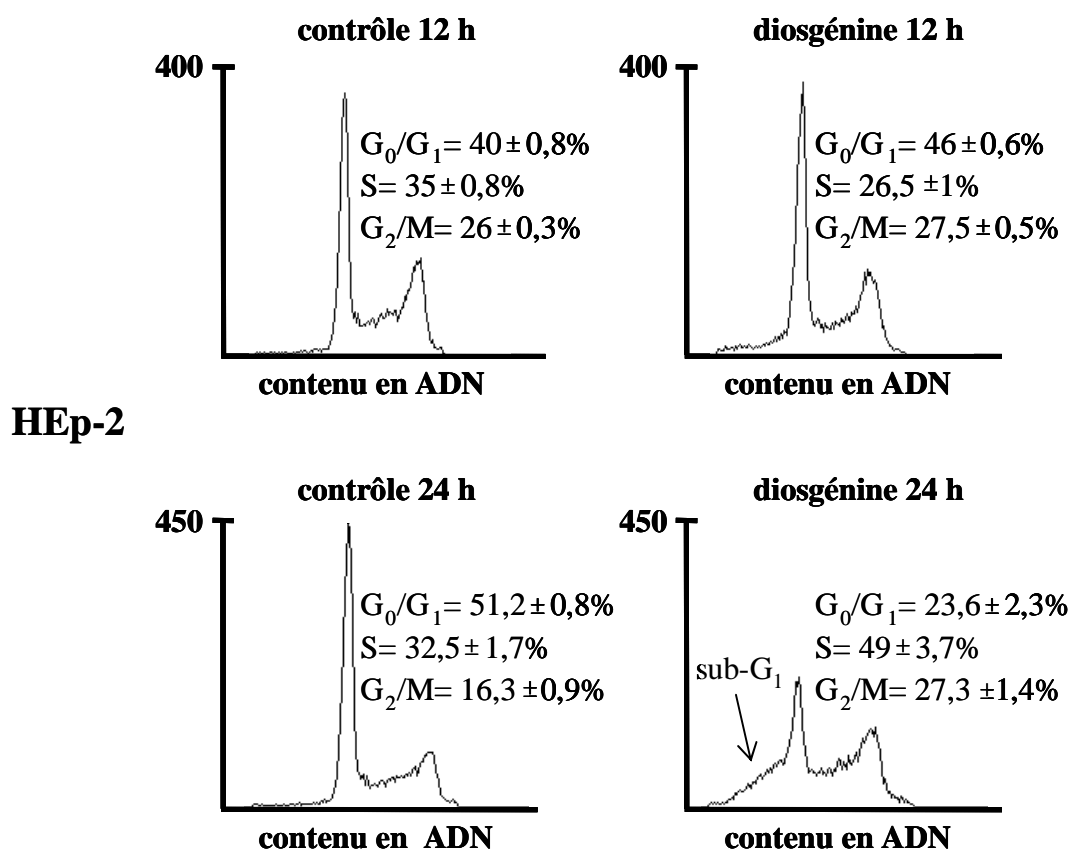


Figure RII-3 : Effets de la diosgénine sur la distribution des cellules HEp-2 dans le cycle cellulaire. Les cellules ont été traitées pendant 12 et 24 h par la diosgénine à 40 μ M avant d'être analysées en cytométrie en flux après un marquage à l'iodure de propidium. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences.

Après 12 h de traitement, le nombre de cellules M4Beu en phase G_0/G_1 et S n'est pas modifié par rapport au contrôle. A l'opposé, le nombre de cellules en phase G_2/M est fortement augmenté : 17,6 % de cellules traitées par rapport à 7 % pour les cellules contrôles ($P < 0,05$). La distribution des cellules après 24 h de traitement par la diosgénine est similaire à celle obtenue à 12 h mais le nombre de cellules en phase S est diminué (15 % pour les cellules traitées par rapport à 28,2 % pour les cellules contrôles, $P < 0,05$) et une population sub- G_1 apparaît. Les cellules M4Beu s'accablent donc en phase G_2/M après traitement par la diosgénine (Figure RII-4).

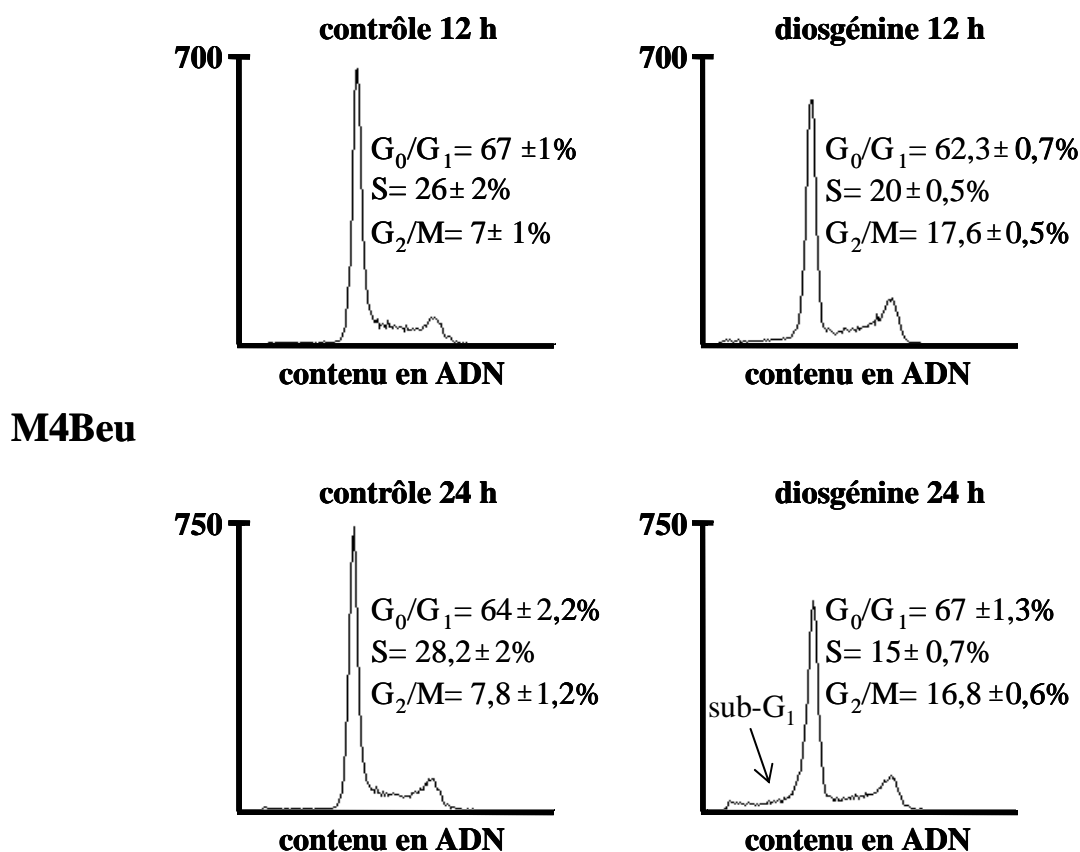


Figure RII-4 : Effets de la diosgénine sur la distribution des cellules M4Beu dans le cycle cellulaire. Les cellules ont été traitées pendant 12 et 24 h par la diosgénine à 40 μM avant d'être analysées en cytométrie en flux après un marquage à l'iodure de propidium. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences.

2. 2. Etude de certains régulateurs du cycle cellulaire

2. 2. 1. Expression de p21

L'expression du transcrite de p21 et de la protéine a été analysée par RT-PCR et western blot après traitement par la diosgénine à 40 μM .

Dans les cellules HEp-2, le traitement des cellules par la diosgénine ne modifie pas l'expression de l'ARNm de p21 mais le western blot montre qu'après 24 h de traitement par la diosgénine, l'expression de la protéine est diminuée par rapport au contrôle (7 fois moins importante, $P < 0,05$) (Figure RII-5). Dans les cellules M4Beu, la diosgénine ne modifie ni l'expression de l'ARNm de p21, ni l'expression de la protéine (Figure RII-5).

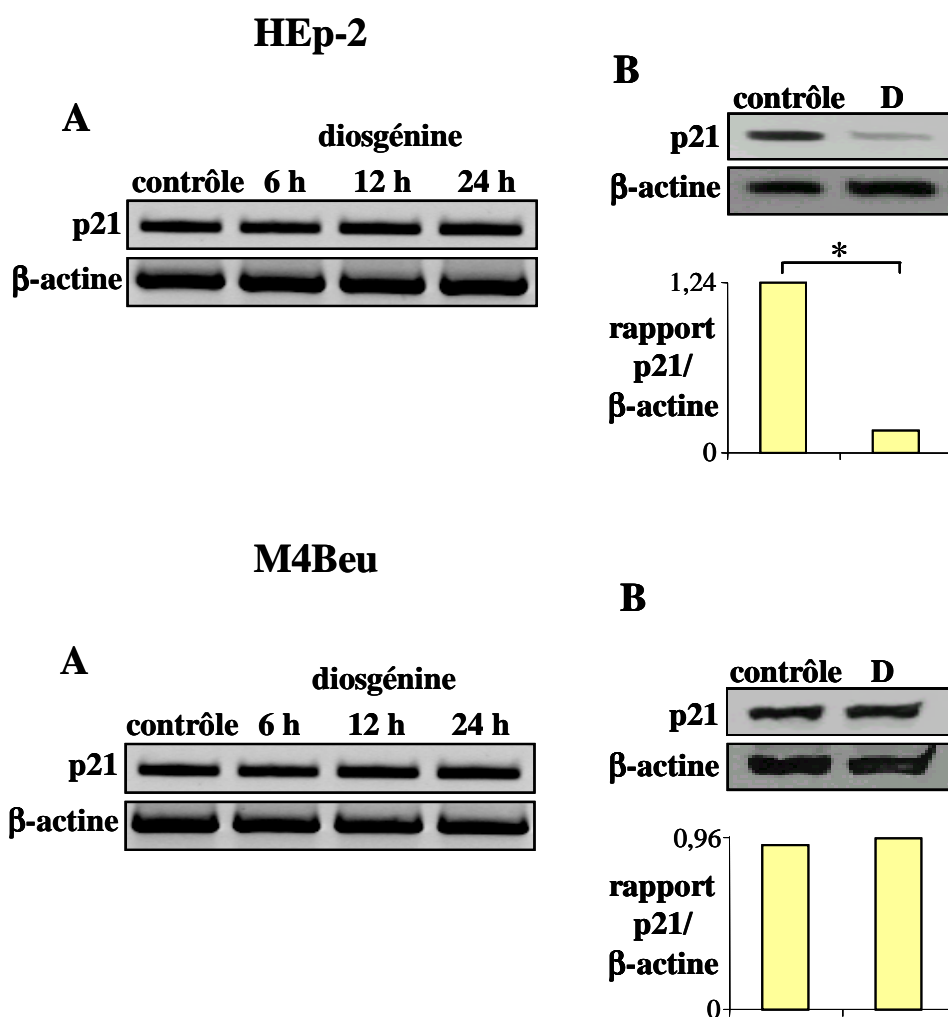


Figure RII-5 : Expression de l'ARNm et de la protéine p21 dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine. (A) RT-PCR réalisées sur les cellules contrôles ou traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h. (B) Western blots réalisés sur les cellules traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D) pendant 24 h. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne (* différence significative par rapport au contrôle, $P < 0,05$).

2. 2. 2. Expression de p53

L'expression de p53 après traitement par la diosgénine à 40 μ M a été analysée dans les cellules HEp-2 et M4Beu comme pour les cellules 1547 par RT-PCR ainsi que par western blot. De plus, la présence de la forme active de p53 a été étudiée par immunohistochimie. Dans les cellules HEp-2, la quantité d'ARNm et de protéine obtenue après traitement par la diosgénine ne varie pas par rapport à la quantité obtenue pour les cellules contrôles (Figure RII-6A et B).

Cependant, la forme active phosphorylée de p53 est présente dans les cellules HEp-2 traitées par la diosgénine pendant 24 h (Figure RII-6C).

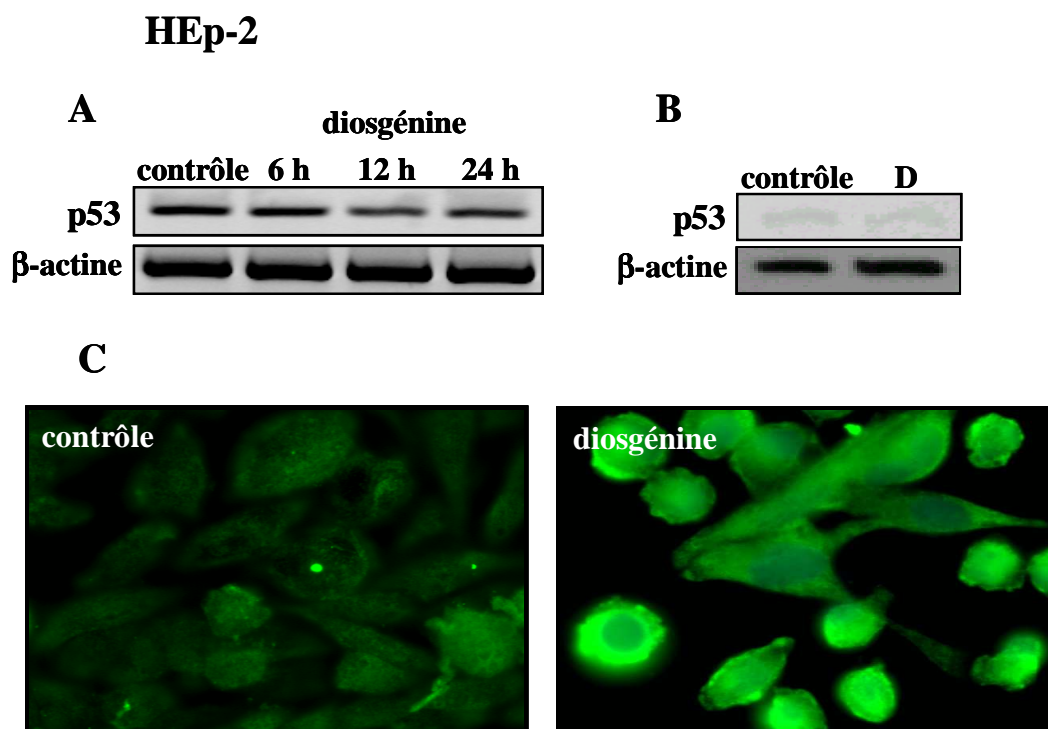


Figure RII-6 : Expression de l'ARNm et de la protéine p53 dans les cellules HEp-2 après traitement par la diosgénine. (A) RT-PCR réalisées sur les cellules contrôles ou traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h. (B) Western blots réalisés sur les cellules traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D) pendant 24 h. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne. (C) Immunohistochimie montrant l'expression de p53 phosphorylée sur la sérine 392. Les cellules ont été traitées ou non (contrôle) par la diosgénine à 40 μ M pendant 24 h. Les photographies ont été prises avec un microscope Nikon (grossissement \times 500).

Dans les cellules M4Beu, l'expression de l'ARNm de p53 n'est pas modifiée par la diosgénine mais la quantité de protéine est diminuée par rapport au contrôle (2 fois moins importante comparé au contrôle, $P < 0,05$) (Figure RII-7A et B). Cependant, l'étude de p53 par immunohistochimie montre que la forme active phosphorylée de p53 est présente dans les cellules M4Beu traitées par la diosgénine (Figure RII-7C).

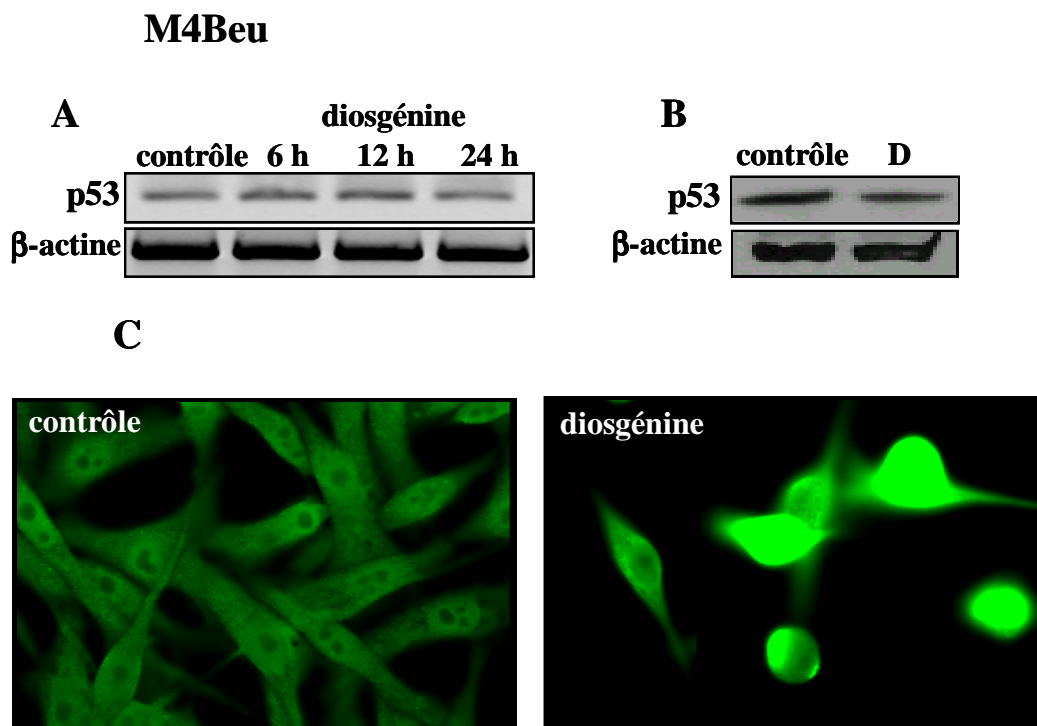


Figure RII-7 : Expression de l'ARNm et de la protéine p53 dans les cellules M4Beu après traitement par la diosgénine. (A) RT-PCR réalisées sur les cellules contrôles ou traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h. (B) Western blots réalisés sur les cellules traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D) pendant 24 h. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne. (C) Immunohistochimie montrant l'expression de p53 phosphorylée sur la sérine 392. Les cellules ont été traitées ou non (contrôle) par la diosgénine à 40 μ M pendant 24 h. Les photographies ont été prises avec un microscope Nikon (grossissement \times 500).

3. Induction de l'apoptose ; analyse de la fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN a été évaluée par un test ELISA réalisé sur la totalité des cellules (flottantes et adhérentes) traitées ou non par 40 μ M de diosgénine pendant 6, 12 et 24 h. Les tableaux suivants montrent la fragmentation de l'ADN dans les cellules HEP-2 et M4Beu au cours du traitement. Le ratio apoptotique (fragmentation de l'ADN dans les cellules traitées rapportée à celle de l'ADN dans les cellules témoins) indique que la diosgénine induit une forte fragmentation dès 6 h (6,7 fois plus importante par rapport au contrôle, $P < 0,05$) dans les cellules HEP-2. Puis, le ratio apoptotique diminue mais reste plus important comparé au contrôle : 2,5 pour les cellules traitées par la diosgénine pendant 12 et 24 h ($P < 0,05$) (Tableau RII-1).

Dans les cellules M4Beu, le ratio apoptotique indique que la diosgénine induit une très importante fragmentation dès 6 h (28,8 fois plus importante par rapport au contrôle, $P < 0,05$). Puis, le ratio apoptotique augmente avant de revenir à la valeur obtenue après 6 h de traitement : 51,6 et 23 pour les cellules traitées par la diosgénine pendant 12 et 24 h respectivement comparés aux contrôles ($P < 0,05$) (Tableau RII-1).

HEp-2			
Temps (h)	6 h	12 h	24 h
contrôle	1	1	1
diosgénine	$6,7 \pm 1,1$	$2,5 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,5$

M4Beu			
Temps (h)	6 h	12 h	24 h
contrôle	1	1	1
diosgénine	$28,8 \pm 11$	$51,6 \pm 17,3$	23 ± 7

Tableau RII-1 : Induction de la fragmentation de l'ADN (ratio apoptotique) dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine à 40 μ M.

4. Implication de la voie mitochondriale

4. 1. Etude de l'expression de Bcl-2 et Bax

Les expressions de Bcl-2 (anti-apoptotique) et de Bax (pro-apoptotique) ont été étudiées par RT-PCR et western blot après traitement des cellules HEp-2 et M4Beu par la diosgénine à 40 μ M.

Dans les cellules HEp-2 et après 24 h de traitement, l'expression de l'ARNm de bcl-2 n'est pas modifiée par rapport au contrôle alors que l'expression du transcrite de bax est augmentée (2 fois par rapport au contrôle, $P < 0,05$) (Figure RII-8A). La protéine anti-apoptotique Bcl-2 est exprimée de façon équivalente au contrôle alors que l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax est diminuée après 24 h de traitement par la diosgénine. Par conséquent, le rapport Bax/Bcl-2 obtenu pour les cellules traitées est moins élevé que celui obtenu pour les cellules contrôles (2,3 fois moins important par rapport au contrôle, $P < 0,05$) (Figure RII-8B).

Dans les cellules M4Beu, l'expression de l'ARNm de bcl-2 est diminuée par rapport au contrôle (1,2 fois moins importante par rapport au contrôle, $P < 0,05$) après 24 h de traitement alors que l'expression du transcrit de bax est augmentée (2,3 fois par rapport au contrôle, $P < 0,05$) (Figure RII-8A). La protéine anti-apoptotique Bcl-2 est exprimée de façon moins importante par rapport au contrôle alors que l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax est inchangée après 24 h de traitement par la diosgénine. Le rapport Bax/Bcl-2 obtenu pour les cellules traitées est donc plus élevé que celui obtenu pour les cellules contrôles (1,6 fois plus important par rapport au contrôle, $P < 0,05$) (Figure RII-8B).

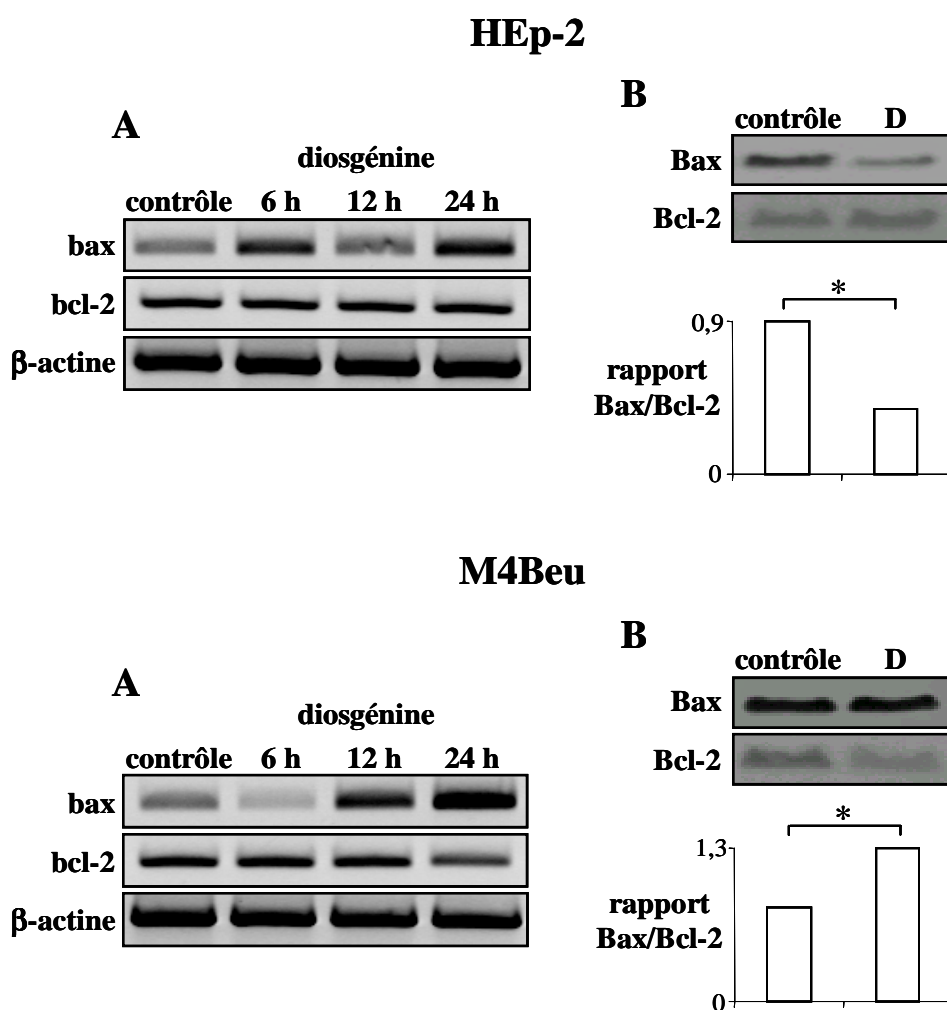


Figure RII-8 : Analyse des expressions de Bax et Bcl-2 dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine. (A) RT-PCR réalisées sur les cellules contrôles ou traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne. **(B)** Western blots réalisés sur les cellules traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D) pendant 24 h. Les histogrammes représentent le rapport Bax/Bcl-2 déterminé après analyse densitométrique des bandes.

4. 2. Analyse de la chute de potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

La chute de potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) a été analysée sur les cellules HEP-2 et M4Beu après 6 et 24 h de traitement par la diosgénine à 40 μM à l'aide de la sonde JC-1. Une fluorescence rouge indique que les cellules ont un potentiel membranaire intact alors qu'une fluorescence verte montre que les cellules ont un potentiel membranaire qui est altéré. Après 6 h de traitement, la diosgénine provoque une chute de potentiel dans les cellules HEP-2 traitées comparé aux cellules contrôle comme l'indique la fluorescence verte des cellules. Après 24 h de traitement, l'effet de la diosgénine reste similaire à celui obtenu à 6 h (Figure RII-9).

Contrairement aux cellules HEP-2, la diosgénine ne provoque pas de chute de potentiel dans les cellules M4Beu après 6 ou 24 h de traitement. En effet, les cellules contrôles et les cellules traitées présentent une fluorescence majoritairement rouge (Figure RII-9).

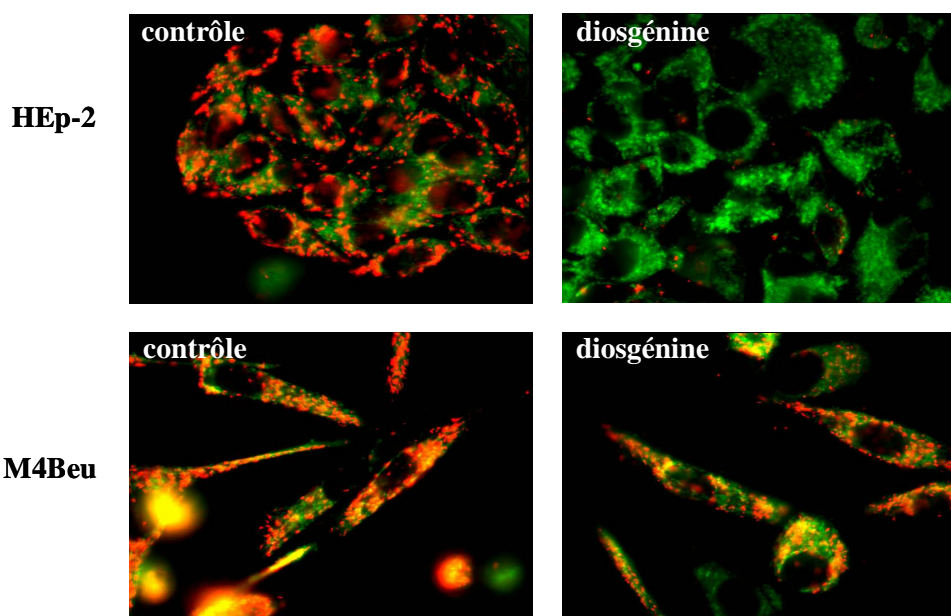


Figure RII-9 : Etude du $\Delta\Psi_m$ dans les cellules HEP-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine. Les cellules HEP-2 ont été traitées pendant 6 h et les cellules M4Beu pendant 24 h. La sonde JC-1 utilisée produit une fluorescence rouge lorsque le potentiel membranaire est intact car la sonde se retrouve sous forme d'agrégats. Au contraire, lorsque le potentiel est altéré, la mitochondrie ne peut concentrer la sonde. Celle-ci se retrouve sous forme de monomères qui produisent une fluorescence verte. Les photographies ont été prises avec un microscope Nikon (grossissement $\times 500$).

4. 3. Analyse de la quantité d'ATP

La production d'ATP par les cellules HEp-2 et M4Beu a été quantifiée dans les cellules traitées ou non par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h.

Les histogrammes suivants (Figure RII-10) montrent que la production d'ATP est augmentée après 6 h de traitement par la diosgénine dans les deux types cellulaires (1,5 fois et 1,7 fois plus importante pour les cellules HEp-2 et M4Beu par rapport au témoin, $P < 0,05$). Dans les cellules HEp-2, la quantité d'ATP intracellulaire est similaire au contrôle à 12 h mais après 24 h de traitement, la quantité d'ATP produite par les cellules traitées est de nouveau plus importante que celle produite par les cellules contrôles. Cependant, la production d'ATP par les cellules contrôles est très faible, c'est pourquoi nous ne tiendrons pas compte du résultat obtenu après 24 h de traitement. Dans les cellules M4Beu, la quantité d'ATP dans les cellules traitées n'est pas augmentée de façon significative par rapport au contrôle à 12 et 24 h.

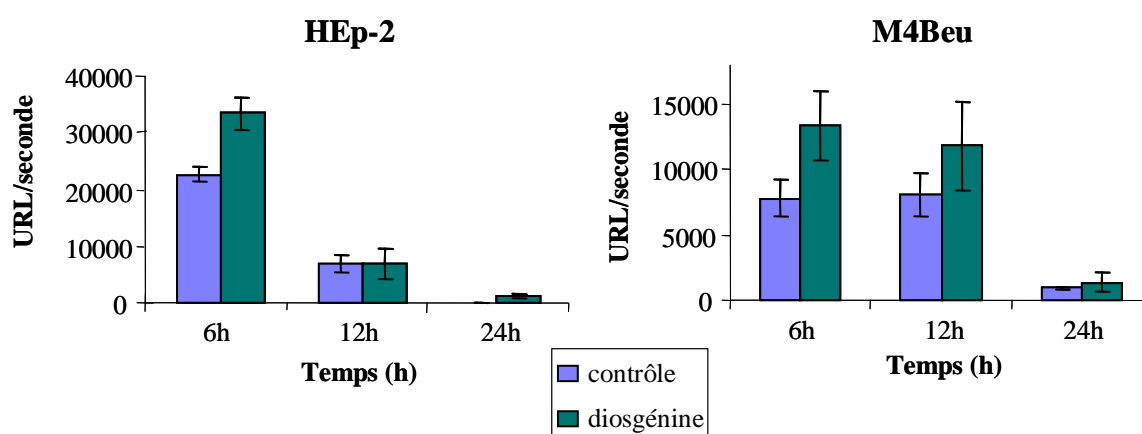


Figure RII-10 : Analyse de la production d'ATP dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine. La quantité d'ATP produit a été déterminée dans les cellules contrôles ou traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences et sont exprimés en unité relative de luminescence par seconde (URL/seconde).

4. 4. Etude de la redistribution subcellulaire du cytochrome c

L'étude, par western blot, des protéines cytosoliques et mitochondriales permet d'analyser le relargage du cytochrome c dans les cellules HEp-2 et M4Beu traitées ou non par la diosgénine à 40 μ M pendant 6 h.

Les western blots suivants (Figure RII-11) obtenus à partir des cellules HEp-2 et M4Beu montrent que le cytochrome c est présent en quantité identique dans les fractions mitochondriales des cellules contrôles et des cellules traitées alors que la quantité devrait être diminuée dans les cellules traitées. De plus, l'analyse des fractions cytosoliques montre que le cytochrome c est présent dans le cytosol des cellules contrôles et des cellules traitées. Les résultats obtenus sur les deux types cellulaires ne nous permettent donc pas de conclure que la diosgénine induit la libération du cytochrome c de la mitochondrie.

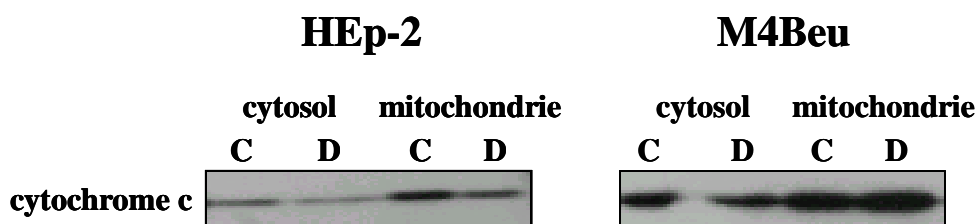


Figure RII-11 : Etude du relargage du cytochrome c dans les cellules HEp-2 et M4Beu après 6 h de traitement par la diosgénine. Les protéines cytosoliques (cytosol) et mitochondriales (mitochondrie) des cellules contrôles (C) et des cellules traitées par la diosgénine (D) ont été extraites puis soumises à une analyse par western blot.

4. 5. Localisation nucléaire de l'AIF

L'analyse de la distribution subcellulaire de l'AIF a été réalisée par western blot à partir des extraits cytosoliques, mitochondriaux et nucléaires des cellules HEp-2 et M4Beu traitées ou non par la diosgénine pendant 6 h. L'utilisation de la β -actine permet de vérifier que les extractions ont été réalisées correctement.

L'AIF est présent en grande quantité dans la mitochondrie (EM) comparé au cytosol (EC) comme le montre la Figure RII-12. Dans les deux types cellulaires et après 6 h de traitement par la diosgénine, l'AIF est retrouvé en quantité importante au niveau du noyau (EN) alors qu'il était absent ou peu présent dans les noyaux des cellules contrôles. De plus, la quantité d'AIF dans le cytosol des cellules traitées est faible comparée au contrôle.

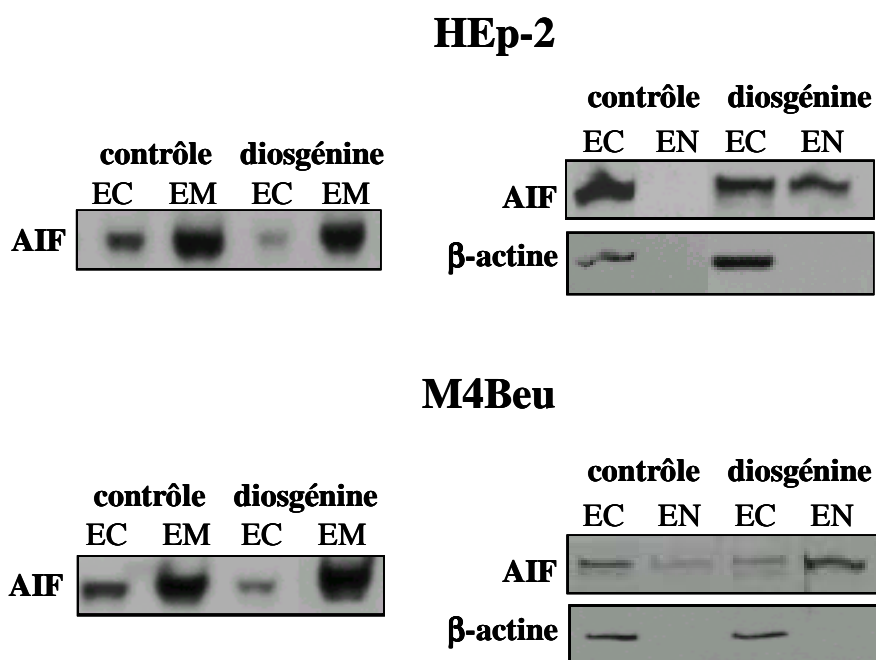


Figure RII-12 : Localisation de l'AIF dans les cellules HEp-2 et M4Beu après 6 h de traitement par la diosgénine. Les extraits cytosoliques (EC), mitochondriaux (EM) et nucléaires (EN) des cellules contrôles et des cellules traitées par la diosgénine ont été soumis à une analyse par western blot.

4. 6. Activation des caspases après traitement des cellules par la diosgénine

L'expression des ARNm et l'activité des caspases-8, -9 et -3 ont été analysées sur les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine.

Les RT-PCR ont été réalisées à partir des ARNm des cellules traitées ou non par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h. Dans les cellules HEp-2, l'expression des ARNm des caspases-8 et -9 augmente de façon modérée par rapport au contrôle (1,2 fois et 1,3 fois comparé au contrôle, $P < 0,05$) alors que l'expression du transcrite de la caspase-3 ne varie pas après 24 h de traitement (Figure RII-13). Dans les cellules M4Beu, l'expression des ARNm des caspases-8 et -9 diminue de façon modérée par rapport au contrôle (1,6 fois et 1,4 fois comparé au contrôle, $P < 0,05$) alors que l'expression du transcrite de la caspase-3 ne varie pas après 24 h de traitement (Figure RII-13).

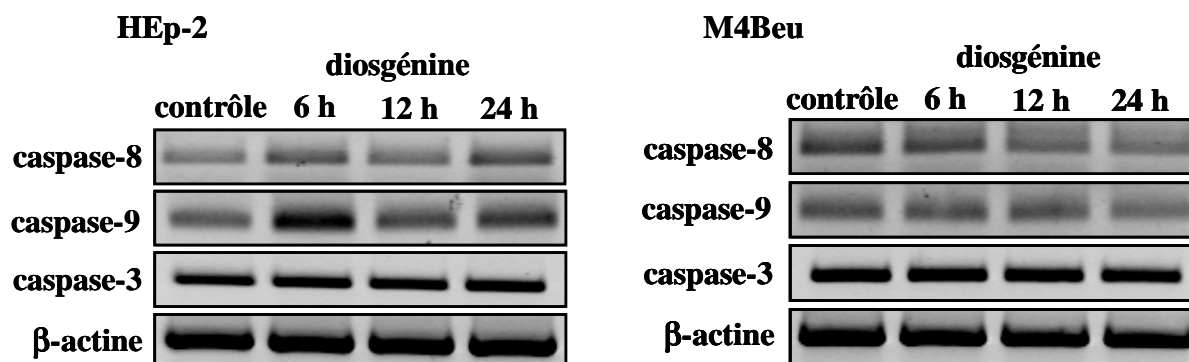


Figure RII-13 : Analyse des ARNm des caspases-8, -9 et -3 après traitement des cellules HEp-2 et M4Beu par la diosgénine. RT-PCR réalisées sur les cellules contrôles ou traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne.

L'activité enzymatique des caspases a été dosée après 12 et 24 h de traitement par la diosgénine à 40 μ M. Après 12 h de traitement, aucune modification de l'activité des caspases n'est observée par rapport au contrôle dans les cellules HEp-2 mais les activités des caspases-8, -9 et -3 sont augmentées de façon significative après 24 h de traitement par la diosgénine (respectivement 1,4 fois, 1,2 fois et 1,6 fois plus importante par rapport aux contrôles, $P < 0,01$) (Figure RII-14). Les activités des caspases-8 et -9 sont faiblement augmentées (1,4 et 1,3 fois plus importante comparé aux contrôles, $P < 0,01$) dans les cellules M4Beu traitées par la diosgénine pendant 12 h, alors que l'activité de la caspase-3 est largement induite par la diosgénine dès 12 h de traitement (3,4 fois par rapport au contrôle, $P < 0,01$). Les activités des caspases-8, -9 et -3 sont augmentées de façon significative après 24 h de traitement par la diosgénine : respectivement 1,2 fois ($P < 0,01$), 1,1 fois ($P < 0,05$) et 2,2 fois ($P < 0,01$) plus importante par rapport aux contrôles (Figure RII-14).

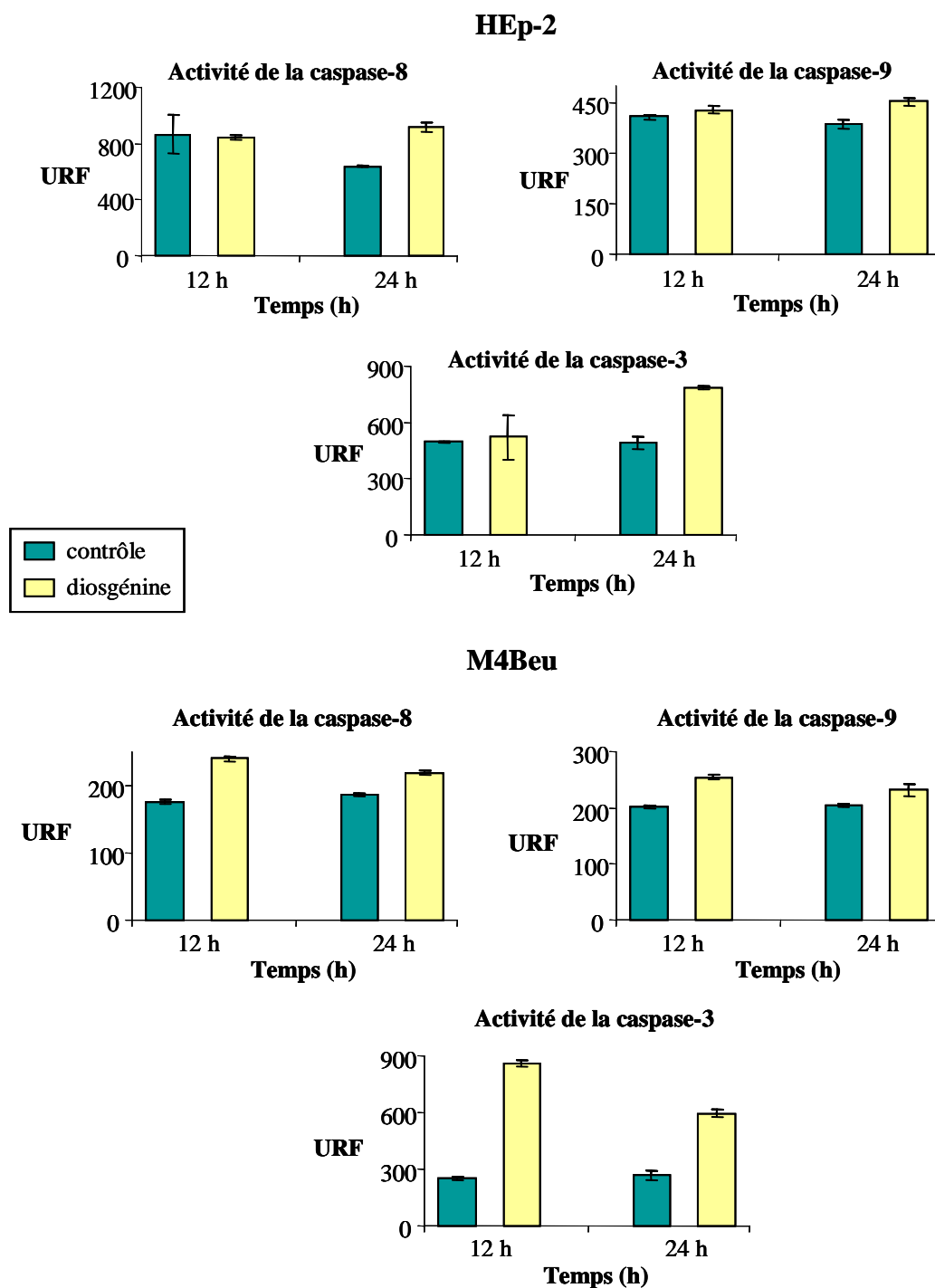


Figure RII-14 : Analyse des activités des caspases-8, -9 et -3 après traitement des cellules HEp-2 et M4Beu par la diosgénine. Les activités des caspases ont été dosées à partir des lysats cellulaires des cellules contrôles ou traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 12 et 24 h. Le dosage a été réalisé à l'aide des substrats de la caspase-8 (Ac-IETD-AMC), de la caspase-9 (Ac-LEHD-AMC) et de la caspase-3 (Ac-DEVD-AMC). Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences et sont exprimées en unité relative de fluorescence (URF).

4. 7. Etude du clivage de PARP après traitement des cellules par la diosgénine

Le clivage de PARP a été analysé sur les cellules HEp-2 et M4Beu après 24 h de traitement par la diosgénine à 40 μ M. L'étude du clivage s'est faite en révélant, par western blot, la présence de la protéine native de 112 kDa et du fragment de 85 kDa. Cette technique a été associée à une technique d'immunohistochimie mettant en évidence la présence du fragment de 85 kDa dans les cellules adhérentes.

Le western blot suivant (Figure RII-15) montre que PARP est partiellement clivée lors du traitement des cellules HEp-2 et M4Beu par la diosgénine pendant 24 h. En effet, la bande correspondant à la protéine native est d'intensité comparable à celle des cellules contrôles et la bande correspondant au fragment de 85 kDa est présente en faible quantité. Ce résultat a été confirmé par immunohistochimie comme le montre le fort marquage obtenu dans les cellules traitées par la diosgénine.

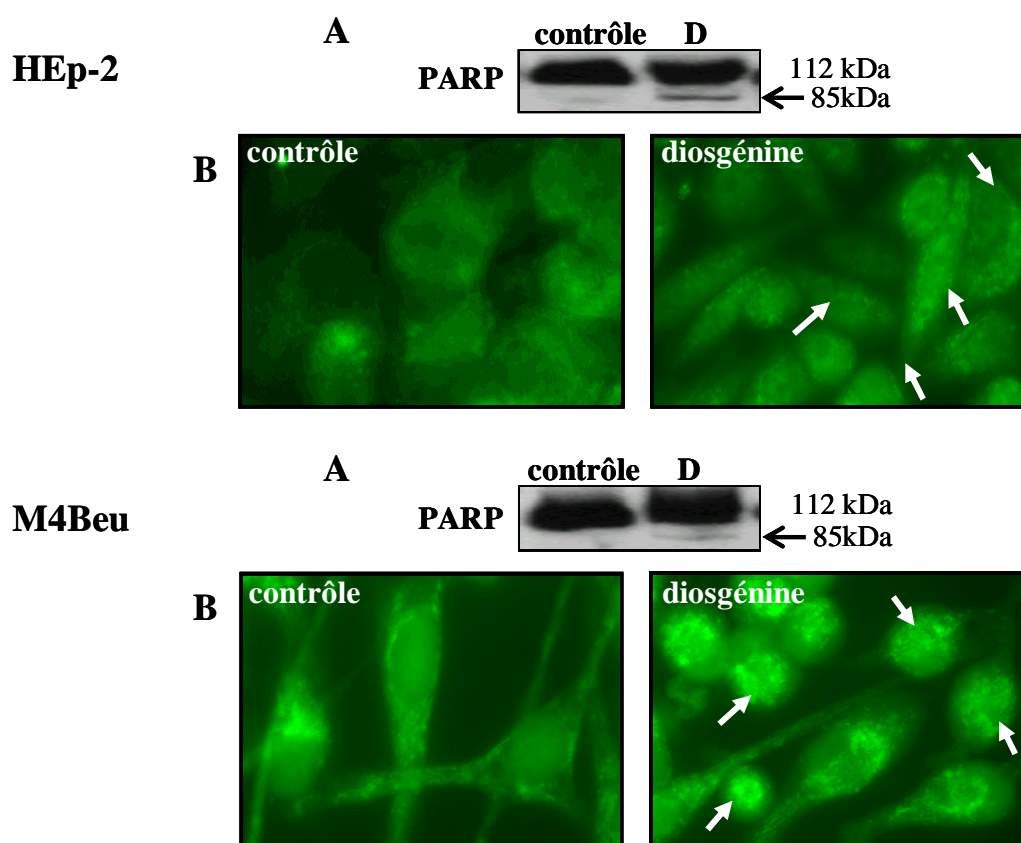


Figure RII-15 : Analyse du clivage de PARP dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine. (A) Western blots réalisés sur les cellules traitées ou non (contrôle) par la diosgénine (D) pendant 24 h. (B) Immunohistochimies réalisées sur les cellules adhérentes traitées ou non (contrôle) par la diosgénine à 40 μ M pendant 24 h. Les photographies ont été prises avec un microscope Nikon (grossissement \times 500).

4. 7. Implication de Bid dans l'apoptose induite par la diosgénine

Le clivage de Bid a été étudié par western blot dans les cellules HEp-2 et M4Beu après 6 h de traitement par la diosgénine. L'anticorps utilisé reconnaît la protéine native de 22 kDa et la protéine tronquée de 15 kDa. Seule la bande correspondant à la protéine native est présente sur le western blot réalisé à partir des protéines des cellules HEp-2 et M4Beu contrôles et des cellules traitées par la diosgénine (Figure RII-16).

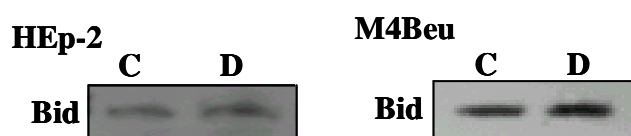


Figure RII-16 : Analyse du clivage de Bid dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine. Western blots réalisés sur les cellules traitées ou non (C, contrôle) par la diosgénine (D) à 40 μ M pendant 6 h.

5. Expression et activité cyclooxygénase

L'expression des ARNm de COX-1 et de COX-2 a été analysée par RT-PCR à partir des ARNm extraits des cellules HEp-2 et M4Beu traitées ou non par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h. Les résultats obtenus pour les cellules HEp-2 indiquent que l'expression de l'ARNm de COX-1 est faiblement augmentée après 24 h de traitement (1,45 fois par rapport au contrôle, $P < 0,05$) alors que l'expression de l'ARNm de COX-2 n'est pas modifiée au cours du traitement par la diosgénine (Figure RII-17A). Dans les cellules M4Beu, l'expression de l'ARNm de COX-1 est diminuée après 24 h de traitement (1,6 fois par rapport au contrôle, $P < 0,05$) alors que l'expression de l'ARNm de COX-2 est induite au cours du traitement par la diosgénine (3,7 fois après 6 h de traitement et 2 fois après 24 h de traitement comparé au contrôle) (Figure RII-17A).

L'analyse de l'expression de la protéine COX-2 dans les cellules HEp-2 ne confirme pas les résultats obtenus par RT-PCR. En effet, COX-2 est fortement induite par la diosgénine après 24 h de traitement (60 fois plus importante par rapport au contrôle, $P < 0,05$) (Figure RII-17B). L'expression de la protéine COX-2 dans les cellules M4Beu est très fortement induite par la diosgénine après 24 h de traitement puisque les cellules contrôles ne l'expriment pas comme le montre la Figure RII-17B.

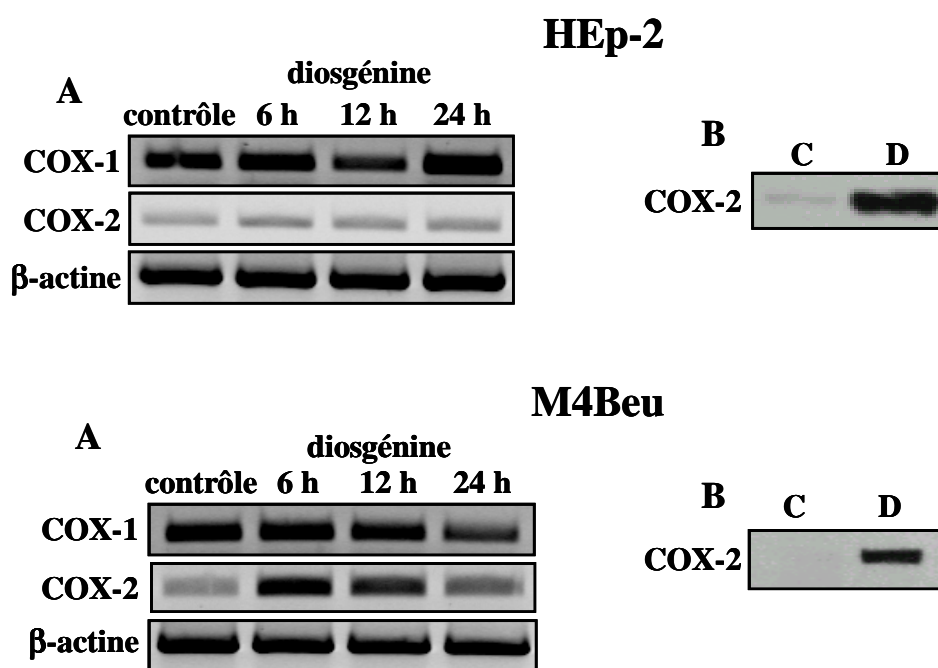


Figure RII-17 : Effet de la diosgénine sur l'expression des COXs dans les cellules HEp-2 et M4Beu. (A) RT-PCR réalisées sur les cellules contrôles ou traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant la β -actine comme contrôle interne. (B) Western blots de COX-2 réalisés sur les cellules traitées ou non (C, contrôle) par la diosgénine (D) pendant 24 h.

Le dosage de la PGE₂ a été réalisé par ELISA après 6, 12 et 24 h de traitement par la diosgénine à 40 μ M. Dans les cellules HEp-2 et après 6 h de traitement par la diosgénine, la production de PGE₂ est 2,5 fois plus importante par rapport au contrôle ($P < 0,05$) puis elle augmente très fortement au cours du temps (10,2 fois et 85 fois à 12 et 24 h respectivement par rapport au contrôle, $P < 0,05$) (Figure RII-18). La production de PGE₂ est également augmentée dans les cellules M4Beu au cours du traitement par la diosgénine (2,2 fois et 5 fois plus importante après 6 et 12 h de traitement par rapport au contrôle ($P < 0,05$) puis elle se stabilise (5 fois plus importante après 24 h de traitement par rapport au contrôle, $P < 0,05$) (Figure RII-18).

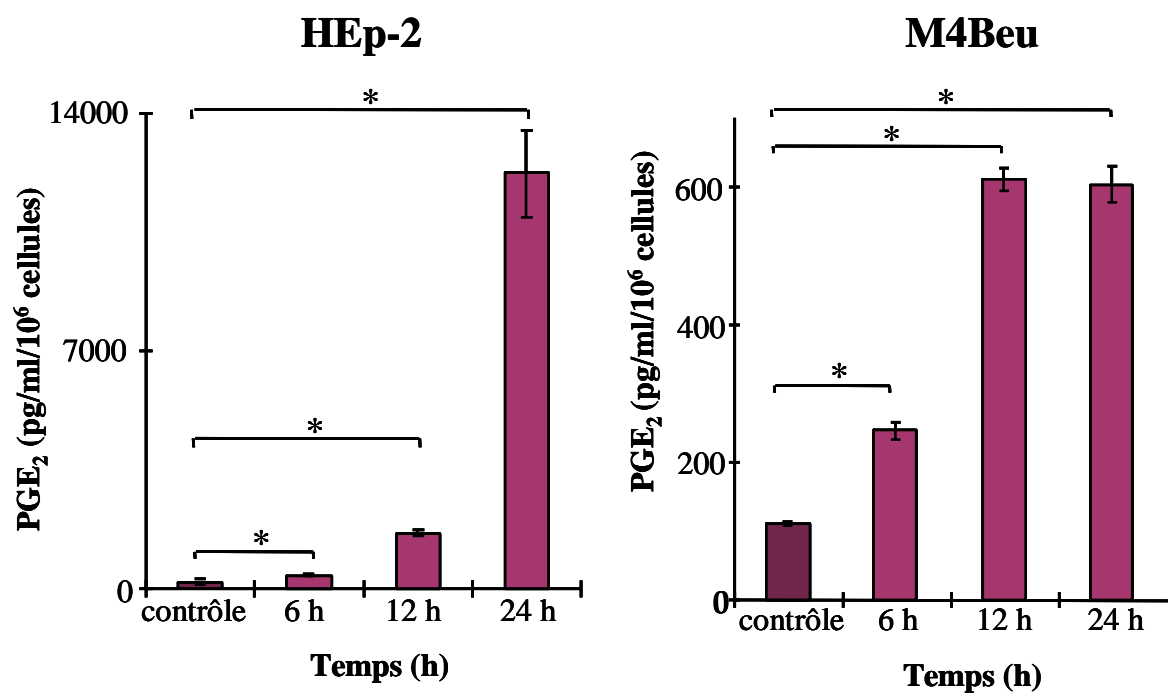


Figure RII-18 : Effet de la diosgénine sur la production de PGE₂ dans les cellules HEp-2 et M4Beu. La production de PGE₂ a été dosée à partir des surnageants des cellules contrôles ou traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 6, 12 et 24 h. La quantité de PGE₂ a été ramenée aux nombres de cellules viables. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences (* P<0,05) et sont exprimées en pg/ml/10⁶ cellules.

Discussion

L'apoptose est un processus physiologique au cours duquel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées de l'organisme. La mort cellulaire programmée est nécessaire au développement et au maintien du bon fonctionnement de tout organisme vivant. En effet, elle joue un rôle important dans l'embryogénèse, dans les changements morphologiques, dans l'homéostasie cellulaire, dans l'atrophie, dans le système immunitaire, dans la réparation des tissus mais aussi dans la régression des tumeurs (Raff et *al.*, 1993). Il est très important de comprendre les mécanismes de l'apoptose dans les cellules cancéreuses car l'apoptose est l'une des principales conséquences de traitement anti-cancéreux. De nombreuses études ont été réalisées afin d'induire l'apoptose dans ce type de cellules et favoriser le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ou préventives. En effet, des stimuli tels que les radiations (UV, gamma), des agents endommageant l'ADN, des antibiotiques (staurosporine, génistéine...) (Kroemer et *al.*, 1997), des bactéries ou des virus (O'Brien, 1998) ou encore des molécules d'origine végétale ont été utilisés pour induire l'apoptose.

Dans cette perspective, nous avons principalement étudié l'effet de la diosgénine, un stéroïde végétal, sur la prolifération de trois types de cellules cancéreuses, deux dérivant de l'ectoderme ou de l'endoderme (carcinome) et un dérivant du mésoderme (sarcome). Dans un premier temps, nous discuterons les résultats obtenus sur l'étude comparative de stéroïdes végétaux (la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine) réalisée sur les cellules humaines d'ostéosarcome (1547) puis nous discuterons les effets de la diosgénine obtenus sur les deux autres lignées cellulaires HEp-2 (laryngocarcinome) et M4Beu (mélanome).

Afin de vérifier si des composés voisins de la diosgénine ont les mêmes effets, nous avons utilisé deux autres stéroïdes végétaux de structure très proche de la diosgénine : la tigogénine qui se différencie de la diosgénine par une insaturation sur le carbone 5 (Fig. 19 p. 107) et l'hécogénine se différenciant de la diosgénine par une insaturation sur le carbone 5 et par la présence d'un groupement oxo sur le carbone 12.

Les résultats obtenus sur la prolifération des cellules 1547 traitées à la diosgénine nous ont amenés à travailler à une concentration de 40 μM , suffisante pour provoquer une forte inhibition de la prolifération (86 %) sans être cytotoxique. Les cellules 1547 ont donc été traitées par la diosgénine à 40 μM . Elles ont également été traitées par l'hécogénine et la tigogénine à la même concentration afin d'évaluer l'effet anti-prolifératif des stéroïdes végétaux utilisés.

La comparaison de l'effet anti-prolifératif des trois stéroïdes montre que la diosgénine exerce un effet plus important que l'hécogénine et la tigogénine utilisées à la même concentration (86 % avec la diosgénine, 38 et 53 % avec l'hécogénine et la tigogénine respectivement). De plus, l'observation des cellules en microscopie optique montre que seule la diosgénine altère la morphologie des cellules, ces modifications étant vraisemblablement associées à une forte diminution de la croissance cellulaire (Corbière et *al.*, 2003).

Pour comprendre les mécanismes par lesquels la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine provoquent une inhibition de la prolifération, nous avons étudié la distribution des cellules traitées dans le cycle cellulaire comparée à la distribution des cellules non traitées (contrôles). Nous avons également étudié l'apoptose, deuxième mécanisme par lequel ces molécules peuvent exercer leur activité anti-proliférative et plus particulièrement la voie mitochondriale ou voie intrinsèque.

L'inhibition de la prolifération cellulaire provoquée par ces stéroïdes végétaux peut s'expliquer par un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire. Il est clairement établi que la protéine de suppression des tumeurs p53 inhibe la croissance cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose (Levine, 1997). Cette protéine peut interagir avec d'autres protéines ou fonctionner après phosphorylation comme facteur de transcription (El-Deiry et *al.*, 1993 ; Contente et *al.*, 2002). En effet, l'arrêt du cycle cellulaire en G₁ s'effectue en partie par l'activation transcriptionnelle de p21 par p53 (El-Deiry et *al.*, 1993). La protéine p21 est un inhibiteur du cycle cellulaire (CKI) de la famille Cip/Kip qui contrôle le point de transition G₁/S en inhibant l'activité des complexes cycline D/CDK (Brugarolas et *al.*, 1995 ; Deng et *al.*, 1995 ; Levine, 1997 ; Kim, 1997).

Dans notre étude, la prolifération des cellules 1547 est inhibée de façon temps-dépendante après traitement par la diosgénine à 40 µM. Cette inhibition s'explique par un arrêt du cycle cellulaire en G₀/G₁ qui est accompagné d'une augmentation de l'expression de la protéine p21 ainsi que d'une augmentation de l'expression de la protéine p53 et de son activité transcriptionnelle (p53 phosphorylée) (Moalic et *al.*, 2001a ; Corbière et *al.*, 2003). La phosphorylation de p53 joue un rôle important dans la stabilisation de la protéine et dans son activation (Shieh et *al.*, 1997). Katayose et *al.* (1995) ont montré que des cellules transfectées par un vecteur exprimant p53 induisaient p21, ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire en G₁ et une accumulation des cellules en sub-G₁ (cellules associées à une population apoptotique). Levine (1997) a également décrit que p53 activée provoquait un arrêt du cycle cellulaire en G₁ en induisant l'expression de p21, protéine qui inhibe l'activité des complexes cycline D/CDK

indispensables au déroulement du cycle cellulaire. D'autres travaux ont montré le lien étroit entre p53, p21 et l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, Gupta et *al.* (2002) ont démontré qu'un traitement des cellules LNCaP par l'apigénine provoquait un arrêt du cycle cellulaire en G₁ accompagné d'une induction de p21. La régulation de l'expression de p21 par p53 se fait au niveau de la transcription.

Sur la même lignée (cellules 1547), l'hécogénine et la tigogénine entraînent une inhibition modérée de la prolifération comparée à celle causée par la diosgénine et ne provoquent pas d'arrêt du cycle cellulaire. De plus, la forme phosphorylée de p53 n'est pas présente dans ces cellules (Corbière et *al.*, 2003).

Dans nos conditions expérimentales, p53 semble être fortement impliquée dans l'inhibition de la prolifération causée par la diosgénine ; inversement la baisse de prolifération provoquée par l'hécogénine et la tigogénine semble être indépendante de p53.

Le fait que l'hécogénine et la tigogénine n'induisent pas d'arrêt du cycle cellulaire n'explique pas l'inhibition de la prolifération cellulaire observée. Pour analyser ce phénomène ainsi que la forte inhibition de la croissance cellulaire provoquée par la diosgénine, nous avons étudié l'apoptose sous l'effet de ces molécules.

L'analyse de la fragmentation de l'ADN qui est la dernière étape de l'apoptose (Samejima et *al.*, 2001) montre que les trois stéroïdes induisent l'apoptose. La diosgénine conduit à une fragmentation plus importante que l'hécogénine et la tigogénine (Moalic et *al.*, 2001a ; Corbière et *al.*, 2003). Nous pouvons remarquer que la tigogénine, molécule très proche de la diosgénine au niveau structural induit une plus forte fragmentation que l'hécogénine qui a une structure plus éloignée. L'effet anti-prolifératif modéré de l'hécogénine et de la tigogénine s'explique donc par le fait que certaines cellules poursuivent leur cycle cellulaire et que d'autres entrent en apoptose. La diosgénine provoque, au contraire, un blocage du cycle cellulaire et une induction de l'apoptose expliquant l'importante inhibition de la prolifération.

Puisque l'apoptose est induite dans les cellules 1547 après traitement par les trois stéroïdes, nous avons étudié l'une des voies d'induction de l'apoptose qui est la voie intrinsèque ou mitochondriale. Cette voie d'induction est fortement régulée par les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Oltvai et *al.*, 1993). Nous avons analysé l'expression de Bcl-2 (anti-apoptotique) et de Bax (pro-apoptotique) qui sont deux des protéines de cette famille les plus étudiées. Nos résultats montrent que les trois stéroïdes augmentent le rapport Bax/Bcl-2 qui est un marqueur déterminant de l'apoptose. De plus, l'hécogénine et la tigogénine ont un effet plus

important que la diosgénine sur l'expression de ces protéines puisque l'expression de Bcl-2 est fortement diminuée alors que celle de Bax est augmentée (Moalic *et al.*, 2001a ; Corbière *et al.*, 2003). L'apoptose induite par ces molécules est donc dépendante de Bax et l'est davantage lorsque les cellules sont traitées par l'hécogénine et la tigogénine.

Lorsque la protéine Bax est impliquée dans l'apoptose, elle s'insère le plus souvent dans la membrane mitochondriale et peut provoquer une chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) (Jürgensmeier *et al.*, 1998 ; Marzo *et al.*, 1998). Curieusement, l'hécogénine et la tigogénine induisent fortement l'expression de Bax mais n'induisent pas de chute de $\Delta\Psi_m$ contrairement à la diosgénine. Cette dernière n'induit pas la chute de $\Delta\Psi_m$ après 6 h de traitement mais après 24 h alors que la perte de fonctionnalité de la mitochondrie est le plus souvent un évènement précoce qui initie l'apoptose. En effet, dans plusieurs lignées cellulaires lymphoblastoïdes, la dépolarisation de la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome c sont des étapes précoces de la cascade apoptotique (Liu *et al.*, 1996 ; Yang *et al.*, 1997 ; Kluck *et al.*, 1997). Cependant, d'autres travaux ont montré que la staurosporine provoquait successivement une augmentation puis une diminution du $\Delta\Psi_m$ (Vander Heiden *et al.*, 1999). Dans les cellules d'ostéosarcome 143B, l'apoptose induite par la staurosporine est accompagnée d'une augmentation du $\Delta\Psi_m$ (Dey et Moraes, 2000). La modification du $\Delta\Psi_m$ dépend donc de la nature du stimulus pro-apoptotique et du type cellulaire étudié.

De nombreuses études rapportent une diminution de la production d'ATP lors de l'induction de l'apoptose. En effet, l'altération du gradient transmembranaire de protons normalement maintenu par la mitochondrie provoque une diminution de la quantité d'ATP intracellulaire (Kowaltowski *et al.*, 2001). Le traitement des cellules 1547 par la diosgénine et la tigogénine provoque une forte diminution de la production d'ATP dès 6 h de traitement alors que l'hécogénine ne modifie pas la quantité d'ATP intracellulaire. Le plus souvent, une chute de $\Delta\Psi_m$ provoque un découplage de la chaîne respiratoire et donc une diminution de la production d'ATP. Cependant, Vander Heiden *et al.* (1999) suggèrent que la rupture de la membrane mitochondriale est une conséquence d'une augmentation du $\Delta\Psi_m$ résultant d'une incapacité d'échange entre l'ADP cytosolique et l'ATP mitochondrial. L'apoptose est un processus nécessitant de l'énergie pour la formation de l'apoptosome, pour la condensation de la chromatine, pour la fragmentation de l'ADN mais aussi pour le transport de protéines vers le noyau (Kass *et al.*, 1996 ; Cain *et al.*, 2001). Néanmoins, une diminution trop importante d'ATP intracellulaire peut être due à une activité plus importante de certaines enzymes ATP-dépendantes comme PARP, enzyme de réparation de l'ADN (Tafani *et al.*, 2002). De plus, il a été suggéré que la quantité d'ATP était un facteur déterminant dans l'induction de la mort par nécrose ou par apoptose (Bradbury *et al.*,

2000). En effet, la cellule meurt par nécrose lorsque le niveau d'ATP diminue de façon très importante provoquant la rupture de la membrane plasmique. Lorsque la quantité d'ATP est partiellement maintenue dans la cellule, celle-ci induit la mort cellulaire par apoptose (Lemasters *et al.*, 2002).

Lorsque l'apoptose est initiée par la mitochondrie, de nombreuses protéines présentes dans l'espace intermembranaire mitochondrial sont libérées (van Gurp *et al.*, 2003). C'est le cas du cytochrome c ou de l'AIF. La libération de ces protéines est le plus souvent induite par la chute de $\Delta\Psi_m$, c'est pourquoi nous avons étudié cet évènement après 6 h de traitement par la diosgénine. L'analyse de l'expression du cytochrome c montre qu'il est présent en faible quantité dans le cytosol des cellules contrôles et des cellules traitées. La libération du cytochrome c permet, en présence d'ATP, la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-9. Cependant, quelques travaux montrent qu'il peut y avoir une chute de $\Delta\Psi_m$ sans qu'il y ait relargage du cytochrome c (Dey et Moraes, 2000 ; Basu *et al.*, 2002). Après traitement des cellules 1547 par la diosgénine, l'AIF reste localisé majoritairement dans la mitochondrie. Dans ce type cellulaire, l'apoptose n'implique pas le cytochrome c ou la voie que l'on nomme caspase-indépendante qui est la voie médiée par l'AIF.

Afin de comprendre comment l'apoptose est induite dans les cellules 1547, nous avons étudié l'activité de certaines caspases : la caspase-9 impliquée dans la voie apoptotique mitochondriale, la caspase-8 impliquée dans la voie des récepteurs et enfin la caspase-3 qui est la principale caspase exécutive (Green et Kroemer, 1998). L'expression des ARNm des caspases n'est pas modifiée alors que leur activité est induite. Après traitement par la diosgénine, l'activation des caspases-8, -9 et -3 est significative mais modérée et n'est observée qu'après 24 h de traitement. En général, les caspases-8 et -9 qui sont des caspases initiatrices sont activées plus tôt. De plus, le fait qu'il y ait un faible taux de caspase-9 active peut être associé à la faible quantité de cytochrome c présent dans le cytosol. En effet, le cytochrome c est localisé dans le cytosol des cellules témoins et n'est pas libéré de façon plus importante après traitement. La caspase-12 activée après un stress au niveau du réticulum endoplasmique (RE) pourrait être impliquée dans l'induction de l'apoptose (Oyadomari *et al.*, 2002). L'apoptose induite par la caspase-12 a également été démontrée dans les fibroblastes traités par de l'anisomycine. Il semblerait que la caspase-12 active la caspase-3 exécutive sans faire intervenir le complexe Apaf-1 et sans qu'il y ait de stress au niveau du RE (Hoppe *et al.*, 2002). Cependant, Morishima *et al.* (2002) ont décrit que le stress au niveau du RE conduisait à une cascade d'activation de caspases initiée par la caspase-12 et faisant intervenir la caspase-9 puis la caspase-3 mais sans impliquer le cytochrome c. Curieusement, le traitement par l'hélogénine diminue l'activité basale des caspases

après 12 h de traitement alors que la tigogénine induit l'activité de la caspase-3 uniquement. L'implication d'autres caspases comme la caspase-12 est à envisager pour expliquer l'apoptose induite par la tigogénine et l'hécogénine dans les cellules 1547.

La caspase-8 étant active après traitement par la diosgénine, elle peut initier l'apoptose directement ou agir en synergie avec la caspase-9. La protéine Bid est un substrat de la caspase-8 qui, une fois clivée, sert de médiateur et amplifie l'action de la voie des récepteurs (Luo et al., 1998 ; Gross et al., 1999). En effet, elle s'insère dans la membrane mitochondriale et permet la libération du cytochrome c par un mécanisme indépendant du pore de transition de perméabilité et induit l'activation de la caspase-9 (Kim et al., 2000b). D'autre part, Tafani et al. (2002) ont montré que Bid pouvait également se transloquer dans la mitochondrie, favoriser l'ouverture du pore et induire la libération du cytochrome c lors de l'apoptose induite par Fas. Dans l'apoptose induite par TRAIL, l'activation de la caspase-8 provoque le clivage de Bid qui, une fois dans la mitochondrie, va provoquer une chute de $\Delta\Psi_m$ et la libération du cytochrome c (Luo et al., 1998 ; Suliman et al., 2001). Ainsi Bid relie les deux voies, extrinsèque et intrinsèque. Dans notre étude, le traitement des cellules 1547 par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine n'induit pas le clivage de Bid. Ce résultat était attendu pour la tigogénine et l'hécogénine qui n'activent pas la caspase-8. De plus, l'absence de relargage du cytochrome c dans les cellules 1547 lors du traitement par la diosgénine pourrait s'expliquer par le fait que Bid ne soit pas clivé par la caspase-8. Lors de l'apoptose induite par la diosgénine, la voie des récepteurs (caspase-8) et la voie mitochondriale (caspase-9) pourraient agir indépendamment l'une de l'autre sans que Bid ne soit impliquée (Decker et al., 2001). En effet, Zhang et al. (2003) ont décrit que l'IFN γ interagissait avec le nouveau récepteur de mort nommé LIGHT, ce qui augmente l'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, diminue l'expression des protéines anti-apoptotiques, active les caspases-8, -9 et -3 sans qu'il y ait de clivage de Bid.

Lors de la phase d'exécution de l'apoptose, de nombreux substrats des caspases sont clivés, c'est le cas des lamines (Buendia et al., 1999), de l'inhibiteur du DFF (facteur de fragmentation de l'ADN) (Samejima et al., 2001) mais aussi de PARP, enzyme de réparation de l'ADN (Green et Amarante-Mendes, 1998 ; Srivastava et al., 1999). Pour réparer l'ADN, la PARP utilise le groupement NAD comme cofacteur (Tafani et al., 2002). Une activité enzymatique excessive de la PARP provoque alors une diminution du taux de NAD et d'ATP. Katz et al. (2001) ont montré que l'apoptose médiée par la voie des récepteurs était la conséquence d'une dépolarisation de la membrane mitochondriale et d'une diminution de la production de l'ATP. Lors de cette apoptose, le cytochrome c n'est pas relargué et PARP n'est pas clivée. Dans les cellules 1547, PARP n'est pas clivée après 24 h de traitement par la diosgénine malgré l'activité

de la caspase-3. Les autres traitements n'induisent aucun clivage, ce qui est pour l'hérogénine corrélé à l'inactivité de la caspase-3. Le fait que PARP ne soit pas clivée par la diosgénine signifie que son activité n'est pas altérée. La consommation d'ATP obtenue avec la diosgénine est corrélée à l'activité de la PARP. En effet, l'activation excessive de PARP contribuerait à l'exécution de la mort cellulaire en diminuant la quantité intracellulaire de NAD et d'ATP (Ikejima *et al.*, 1987 ; D'Amours *et al.*, 1999 ; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999).

Les cyclooxygénases ou COXs sont des enzymes clés dans la conversion de l'acide arachidonique (AA) en prostanoides qui sont impliqués dans l'apoptose, l'inflammation, la carcinogénèse et l'immunomodulation. Deux principales isoformes de COX sont étudiées : COX-1 est la forme dite « constitutive » qui joue un rôle dans les fonctions normales de la cellule et COX-2 est la forme dite « inducible » (Seibert *et al.*, 1997 ; Harizi *et al.*, 2001). COX-2 est peu exprimée à l'état basal et est fortement induite par des facteurs de croissance, des cytokines ou des mitogènes (de Leval *et al.*, 2000). Afin de déterminer l'activité des COXs dans les cellules 1547 après traitement par les stéroïdes, nous avons quantifié le taux de PGE₂ représentant la production de prostaglandines (PG) car c'est le principal métabolite synthétisé par la COX-2. L'expression des ARNm de COX-1 et de COX-2 est respectivement inchangée ou diminuée par rapport aux contrôles après traitement par la diosgénine. Cependant, l'analyse de la protéine COX-2 montre qu'elle est très fortement exprimée avec la diosgénine, ce qui est corrélé à la forte production de PGE₂ observée. En général, l'expression de COX-2 est forte dans les cellules cancéreuses (Prescott et Fitzpatrick, 2000 ; Smith *et al.*, 2000a ; Moalic *et al.*, 2001a) et, lorsqu'elle est inhibée, l'apoptose peut être induite (Gupta et DuBois, 2001). Nos résultats sont contradictoires avec ces données mais, dans les cellules 1547 contrôles, l'expression de COX-2 est très faible comme le montre le western blot. Dans la maladie d'Alzheimer, COX-2 semble être impliquée dans la dégénérescence des cellules neuronales liée à la production de radicaux libres (Ho *et al.*, 1998). Nous pouvons supposer que la COX-2 est impliquée dans l'apoptose, mais nous ne pouvons déterminer si elle en est la cause ou si l'augmentation de son activité est une conséquence de celle-ci. En revanche, COX-2 pourrait également être induite afin de lutter contre l'apoptose comme l'ont supposé Surette *et al.* (1996 et 1999). En effet, ces auteurs ont montré que l'AA pouvait stimuler la conversion de la sphingomyéline en céramide (molécule pro-apoptotique) lors d'une activation importante de la PLA₂. Ils ont émis l'hypothèse que COX-2 serait induite afin de métaboliser l'AA en PG et non en céramide et ainsi permettre à la cellule de lutter contre la mort cellulaire. De plus, Katz *et al.* (2001) ont montré que l'induction de l'apoptose dans les lymphocytes B immatures de lymphomes était associée à une forte activation de la PLA₂ mitochondriale, à une diminution du $\Delta\Psi_m$ et à une chute importante de l'ATP intracellulaire sans

qu'il y ait libération de cytochrome c. L'activation de la PLA₂ mitochondriale provoque une accumulation de l'acide arachidonique au niveau de la membrane interne mitochondriale, altère la perméabilité de la membrane et conduit à une chute de $\Delta\Psi_m$. Contrairement à la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine provoquent une diminution ou ne modifient pas l'expression de la protéine COX-2 bien qu'elles augmentent l'expression de son ARNm. La production de PGE₂ par les cellules 1547 après traitement par ces molécules est corrélée à l'expression de la protéine. Ces résultats sont proches des données bibliographiques qui rapportent une diminution de COX-2 et une induction de l'apoptose (Qiao *et al.*, 1997 ; Marnett, 2002). Cependant, il faut noter que ces deux molécules qui ont un pouvoir pro-apoptotique modéré par rapport à la diosgénine ont un effet opposé à celle-ci sur l'expression et l'activité de COX-2.

Afin de déterminer quelle voie de signalisation était induite par ces molécules, nous avons étudié l'activation du facteur de transcription NF- κ B et l'implication des récepteurs nucléaires PPAR. NF- κ B est souvent considéré comme un facteur anti-apoptotique (Baldwin, 1996 ; Barkett et Gilmore, 1999) mais parfois il peut favoriser l'apoptose (DeMeester *et al.*, 1997 ; Ryan *et al.*, 2000). C'est un facteur qui agit sur de nombreux gènes notamment p53 et COX-2. Les PPARs sont des récepteurs nucléaires régulant l'expression de nombreux gènes. PPAR γ est l'isoforme la plus étudiée et est exprimé dans de nombreux types de cancers. En effet, PPAR γ est fortement exprimé dans les cancers colorectaux et le traitement de cellules de cancer du côlon par des ligands spécifiques provoque une forte diminution de la prolifération suggérant une fonction anti-tumorale de PPAR γ (Shimada *et al.*, 2002). D'autres études ont montré que l'activation de PPAR γ induisait l'apoptose dans des cellules leucémiques (Yamakawa-Karakida *et al.*, 2002), provoquait une inhibition de la croissance de cellules cancéreuses du pancréas (Toyota *et al.*, 2002) ou de cellules cancéreuses gastriques (Takahashi *et al.*, 1999 ; Sato *et al.*, 2000) ou encore de cellules cancéreuses de la glande salivaire (Begum *et al.*, 2002).

Le traitement des cellules 1547 par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine n'induit pas la transactivation de NF- κ B comme le montrent les résultats obtenus par transfection. Cependant, ces trois molécules favorisent la liaison de NF- κ B à l'ADN (retard sur gel). NF- κ B est donc activé dans nos conditions. L'utilisation du MG132 a permis de confirmer qu'il existe un lien entre NF- κ B et l'induction de p53 et de p21. En effet, il est connu que le MG132 qui est un inhibiteur du protéasome 26S bloque l'activation de NF- κ B (Tabata *et al.*, 2001). De plus, Ryan *et al.* (2000) ont montré que l'activité de p53 était modulée par NF- κ B. Le promoteur du gène de p21 possède également, en plus de son élément de réponse à p53, un élément de réponse à NF- κ B (Hellin *et al.*, 2000). La diosgénine active NF- κ B et agit par son intermédiaire sur l'expression de

p53 et de COX-2. Cependant, l'hécogénine et la tigogénine activent également NF- κ B sans induire l'expression de p53 et COX-2. Ceci suggère que l'induction de p53 et COX-2 n'est pas uniquement régulée par NF- κ B. L'apoptose induite par ces deux molécules et par conséquent l'inhibition de la prolifération est probablement due à l'activation de NF- κ B ainsi qu'aux protéines de la famille Bcl-2.

La diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine induisent l'expression de PPAR γ et non celle de PPAR α . En revanche, aucune des molécules n'induit l'activation de PPAR γ comme le montrent les résultats obtenus par les études de transfection et de retard sur gel. Récemment, Haydon *et al.* (2002) ont montré que le traitement de quatre lignées cellulaires d'ostéosarcome humain par des ligands de PPAR γ réduisait de façon significative la prolifération des cellules et leur viabilité en induisant l'apoptose. Une autre étude réalisée sur des chondrosarcomes décrit cette induction de l'apoptose après traitement des cellules par des ligands de PPAR γ (Nishida *et al.*, 2002). Cependant, Lucarelli *et al.* (2002) ont montré que la troglitazone, un agoniste de PPAR γ , augmentait la survie cellulaire d'ostéosarcome humain.

La comparaison des trois stéroïdes (diosgénine, hécoogénine et tigogénine) a permis de montrer que la diosgénine avait un effet anti-prolifératif plus important que les deux autres stéroïdes. En effet, elle induit un arrêt du cycle cellulaire et une forte apoptose. Ces événements semblent être dépendants de p53 mais aussi de NF- κ B. L'apoptose induite par la diosgénine pourrait impliquer la mitochondrie comme le montrent la chute de $\Delta\Psi_m$ et la chute d'ATP. Cependant, l'activation de la caspase-9 observée n'est probablement pas due à la formation de l'apoptosome Apaf-1/cytochrome c/procaspase-9 puisque le cytochrome c est très peu libéré de la mitochondrie. L'activation de la caspase-9 et de la caspase-3 pourrait s'expliquer par l'induction d'une autre voie comme celle du réticulum endoplasmique. De plus, la diosgénine induit une forte expression de COX-2 et augmente la production de PGE₂, cette activité pouvant être la cause ou la conséquence de cette mort cellulaire.

La forte activité pharmacologique de la diosgénine semble être liée à la présence de la double liaison en C5 puisque les deux molécules de structure voisine ont une activité modérée comparée à celle de la diosgénine. La tigogénine provoque une inhibition de la prolifération plus importante que celle induite par l'hécogénine. Une étude est actuellement en cours, en collaboration avec le laboratoire de Biophysique de la Faculté de Pharmacie, sur la structure des

molécules dans l'espace afin de déterminer une relation entre l'effet anti-prolifératif et la structure de ces stéroïdes.

Après avoir montré que la diosgénine avait un effet anti-prolifératif beaucoup plus important que l'hécogénine et la tigogénine, nous avons étudié son effet sur deux autres lignées cancéreuses, les cellules HEP-2 et les cellules M4Beu. Comme pour les cellules 1547, les effets de la diosgénine sur ces deux types cellulaires ont été étudiés sur la prolifération, le cycle cellulaire et l'apoptose (voie mitochondriale), ainsi que sur l'activité des cyclooxygénases.

Comme pour les cellules 1547, la diosgénine provoque dans les deux autres lignées une forte inhibition de la prolifération (respectivement 76 et 91 % pour les cellules HEP-2 et M4Beu). Les cellules HEP-2 sont des cellules qui prolifèrent en amas contrairement aux cellules 1547 et M4Beu. Elles sont donc moins exposées à la molécule, ce qui peut expliquer l'inhibition de 76 %. De plus, les observations en microscopie optique révèlent que la morphologie des cellules HEP-2 et M4Beu est altérée après traitement par la diosgénine (condensation du cytoplasme, cellules arrondies se décollant du flacon de culture).

La diosgénine agit sur ces cellules comme sur les cellules 1547 en bloquant le cycle cellulaire et en induisant l'apoptose. En effet, les cellules HEP-2 sont bloquées en phase S et les cellules M4Beu en phase G₂/M. Une population sub-G₁ apparaît après 24 h de traitement dans les deux types cellulaires. La diosgénine provoque un arrêt du cycle cellulaire dans les trois lignées mais ne bloque pas les cellules dans les mêmes phases puisque le cycle cellulaire des cellules 1547 est arrêté en phase G₀/G₁. Contrairement aux cellules 1547 dans lesquelles p21 est fortement exprimée après traitement par la diosgénine, p21 ne semble pas impliquée dans cet arrêt du cycle cellulaire étant donné que son expression est diminuée (cellules HEP-2) ou inchangée (cellules M4Beu). De plus, l'expression de la protéine p53 est peu ou pas modifiée par la diosgénine dans ces cellules. La régulation de l'activité de p53 se fait par différents mécanismes dont le plus connu est sa phosphorylation (Meek, 1998), c'est pourquoi nous avons analysé l'une des phosphorylations de p53 (phosphorylation sur la sérine 392). Les résultats montrent que la forme phosphorylée active est bien présente quel que soit le type cellulaire.

Les phases de transition du cycle cellulaire sont hautement régulées par les complexes cyclines/CDK (MacLachlan et *al.*, 1995). En effet, les complexes cycline D/CDK 4 ou 6 régulent le point de transition G₁/S, les complexes cycline E/Cdc2 contrôlent l'entrée des cellules en phase S et le complexe cycline A/Cdc2 initie la réplication de l'ADN (Sherr, 1993 ; Sherr et Roberts, 1999 ; Pucci et *al.*, 2000). Dans les cellules HEP-2, la diosgénine pourrait modifier l'expression

des complexes cyclines/CDK impliqués dans le déroulement de la phase S. Elle pourrait également agir sur la protéine pRb. Sous sa forme phosphorylée, pRb permet la transition des cellules en phase S (Zheng et Lee, 2001). La diosgénine pourrait empêcher la phosphorylation de pRb et ainsi bloquer cette transition. De plus, la stabilité de ces complexes peut être régulée négativement par des inhibiteurs de CDK comme les membres de la famille Cip/Kip (p21, p27) qui inhibent les complexes cycline E/Cdc2 et cycline A/Cdc2 ou les membres de la famille INK4 (p16) qui empêchent la liaison de la cycline D au CDK4 ou 6 (Harper et Elledge, 1996 ; Shapiro et *al.*, 2000). L'arrêt du cycle cellulaire en G₂/M provoqué par la diosgénine sur les cellules M4Beu pourrait s'expliquer par l'inhibition de l'expression des complexes cyclines/CDK impliqués dans la poursuite du cycle en mitose (cycline B/Cdc2). De plus, Hermeking et *al.* (1997) ont montré que l'induction du facteur 14-3-3 par p53 était impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en G₂/M.

La protéine p53 est probablement impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire provoqué par la diosgénine mais elle n'induit pas l'expression de p21. Cependant, p53 peut induire l'expression d'autres régulateurs comme p27, la cycline D ou le cofacteur 14-3-3 (Bargonetti et Manfredi, 2002). En effet, p53 est impliquée dans le contrôle de l'entrée en mitose lorsque l'ADN des cellules en G₂ est endommagé ou lorsqu'elles sont arrêtées en phase S lors de l'altération de la synthèse d'ADN (Taylor et Stark, 2001). L'un des mécanismes par lequel p53 bloque le cycle cellulaire en G₂ est l'inhibition de Cdc2, une CDK indispensable à l'entrée des cellules en mitose. Cdc2 est inhibée simultanément par Gadd45, p21 et 14-3-3 qui sont des protéines dont l'expression est régulée par p53 (Taylor et *al.*, 2001). Frey et Singletary (2001) ont montré que la génistéine, une isoflavone, provoquait un arrêt du cycle cellulaire en G₂/M par l'induction de p53, de p27, de p21 et de Cdc2. De plus, p53 a un rôle important dans l'induction de l'apoptose. Plusieurs auteurs ont montré que divers signaux apoptotiques étaient médiés par p53 afin d'induire la mort cellulaire (Moll et Zaika, 2001 ; Blagosklonny, 2002). En effet, en réponse à différents stress, p53 est activée et va induire l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, dans la réparation de l'ADN mais aussi dans l'induction de l'apoptose (Oren, 2003).

L'apoptose est caractérisée par une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN (Hengartner, 2000). Le niveau de fragmentation de l'ADN montre que la diosgénine provoque une importante formation de mono- ou d'oligo-nucléosomes dans les cellules HEP-2 et M4Beu dès 6 h de traitement. Puisque cette molécule induit l'apoptose dans les cellules HEP-2 et M4Beu comme dans les cellules 1547, nous avons étudié la voie apoptotique mitochondriale dans ces deux types cellulaires afin de déterminer si son mode d'action était similaire à celui induit dans les cellules 1547. L'implication de Bcl-2, Bax et Bid, la chute de $\Delta\Psi_m$, la production d'ATP,

l'implication du cytochrome c et de l'AIF, l'activité des caspases ont donc été analysées après traitement par la diosgénine.

Le rapport Bax/Bcl-2 déterminé à partir de l'expression des protéines donne des résultats opposés en fonction de la lignée cancéreuse. En effet, l'expression de la protéine Bax diminue dans les cellules HEP-2 contrairement aux cellules M4Beu qui présentent, comme les cellules 1547, un rapport Bax/Bcl-2 élevé par rapport au contrôle. Les résultats obtenus sur les cellules M4Beu suggèrent qu'il existe une corrélation entre un rapport Bax/Bcl-2 élevé et une forte fragmentation de l'ADN. Une observation similaire montrant que l'apoptose médiée par le récepteur Fas était corrélée au rapport Bax/Bcl-2 a été rapportée dans d'autres cellules de mélanomes (Raisova et *al.*, 2001). Contrairement aux cellules M4Beu, Bax ne semble pas impliquée dans l'apoptose induite par la diosgénine dans les cellules HEP-2. Cependant, sa répartition subcellulaire permettrait de confirmer ou non cette hypothèse. En effet, l'expression de la protéine Bax peut être inchangée alors qu'elle se transloque dans la mitochondrie et induit une chute de $\Delta\Psi_m$ (Park et *al.*, 2003).

Malgré la forte expression de Bax dans les cellules M4Beu traitées par la diosgénine, aucune chute de $\Delta\Psi_m$ n'a été observée alors que les cellules HEP-2 traitées à la diosgénine pendant 6 h possèdent déjà des mitochondries altérées. Contrairement aux cellules 1547 qui présentent une chute de $\Delta\Psi_m$ après 24 h de traitement, la chute de $\Delta\Psi_m$ se produit plus tôt dans les cellules HEP-2. Etant donné que la protéine Bax est peu exprimée dans les cellules HEP-2, nous pouvons supposer que d'autres protéines de la famille Bcl-2 sont impliquées dans la chute de $\Delta\Psi_m$. En effet, plusieurs auteurs ont décrit que des protéines de la famille Bcl-2 telles que Bim et Bak induisaient l'apoptose (Kiefer et *al.*, 1995 ; O'Connor et *al.*, 1998).

La corrélation obtenue entre la chute de $\Delta\Psi_m$ et la production d'ATP dans les cellules 1547 n'est pas retrouvée pour les cellules HEP-2. En effet, malgré une chute de $\Delta\Psi_m$ se produisant rapidement, la production d'ATP est augmentée dans ces cellules. Un taux important d'ATP est nécessaire pour induire et exécuter l'apoptose, contrairement à la nécrose. Mais le potentiel membranaire mitochondrial est très souvent diminué lors de l'induction de l'apoptose. Oberdanner et *al.* (2002) ont montré que le $\Delta\Psi_m$ des cellules était diminué lors de l'apoptose induite par une thérapie photodynamique alors que la quantité d'ATP intracellulaire était maintenue pendant les premières heures suivant le traitement. De plus, ce traitement active la caspase-3 et induit une fragmentation importante de l'ADN. Ces auteurs ont également montré que la glycolyse anaérobie permettait de maintenir la quantité d'ATP cellulaire à un niveau suffisant pour induire l'apoptose lorsque la production d'ATP par la mitochondrie était altérée

(chute de $\Delta\Psi_m$) (Colquhoun et Schumacher, 2001). La diosgénine n'induisant pas de chute de $\Delta\Psi_m$ dans les cellules M4Beu, il n'est pas surprenant d'obtenir une forte production d'ATP dans ces cellules.

L'induction de l'apoptose par la voie mitochondriale est très souvent dépendante de la libération du cytochrome c de l'espace intermitochondrial vers le cytosol (Martinou et *al.*, 2000). Dans les cellules HEP-2 et M4Beu comme dans les cellules 1547, le cytochrome c ne semble pas impliqué dans l'induction de l'apoptose par la diosgénine. Une autre protéine, l'AIF, peut être libérée de la mitochondrie et agir indépendamment de la voie mitochondriale (Susin et *al.*, 1999 ; Daugas et *al.*, 2000). Contrairement aux résultats obtenus pour les cellules 1547, la diosgénine induit une redistribution de l'AIF dans les cellules HEP-2 et M4Beu. En effet, les analyses par western blot montrent que l'AIF est fortement présent dans les noyaux des cellules traitées. Récemment, Diaz et *al.* (2003) ont montré que la chlorophylline provoquait une diminution de $\Delta\Psi_m$ sans entraîner de libération du cytochrome c mais en provoquant la libération de l'AIF et sa translocation dans le noyau. Les mêmes phénomènes se produisent dans les cellules HEP-2 traitées par la diosgénine. Dans ces cellules, la diosgénine induit donc une apoptose indépendante des caspases mais impliquant la mitochondrie puisque le $\Delta\Psi_m$ est altéré. La présence de l'AIF dans les noyaux des cellules HEP-2 et M4Beu traitées par la diosgénine pourrait expliquer la forte fragmentation de l'ADN observée dès 6 h de traitement. La mitochondrie participe également à l'apoptose induite dans les cellules 1547 mais son rôle reste encore à déterminer dans les cellules M4Beu.

Après avoir étudié le rôle de la mitochondrie dans l'induction de l'apoptose, nous avons analysé l'expression et l'activité de la caspase-9 lors de l'induction de la voie mitochondriale (Salvesen et Dixit, 1997) ainsi que la caspase-3 exécutive (Alnemri et *al.*, 1996). Nous avons également analysé l'activité de la caspase-8 impliquée dans la voie apoptotique des récepteurs (Amarante-Mendes et Green, 1999 ; Gupta, 2003). Le traitement des cellules HEP-2 par la diosgénine augmente l'activité des caspases-9 et -3 de façon modérée après 24 h alors que la chute de $\Delta\Psi_m$ se produit dès 6 h. De plus, l'activité de la caspase-8 est augmentée. La diosgénine induit donc, dans ces cellules, une apoptose dépendante des caspases et une apoptose indépendante des caspases comme le montre le résultat obtenu pour l'AIF. La même conclusion peut être faite pour les cellules M4Beu puisque l'AIF est présent dans le noyau des cellules traitées et que les caspases-8, -9 et -3 sont fortement activées. En effet, bien que l'expression des ARNm ne soit pas augmentée, l'activité des trois caspases est augmentée par rapport aux contrôles dès 12 h de traitement. Cette forte activité peut expliquer la forte inhibition de la prolifération. Dans ces deux types cellulaires comme dans les cellules 1547, l'activation de la caspase-9 n'est pas dépendante

du cytochrome c. Récemment, il a été montré qu'un inhibiteur de la protéine kinase C, la rottlérine, induisait la libération de l'AIF de la mitochondrie, augmentait l'activation de la caspase-9 et de la caspase-8 sans que le cytochrome c ne soit relargué (Basu *et al.*, 2002). De plus, Susin *et al.* (1999) ont décrit que l'AIF induisait la libération de la caspase-9 par des mitochondries purifiées. Il est donc possible que l'AIF induise une boucle de régulation activant cette caspase. L'AIF qui est un facteur indépendant des caspases pourrait amplifier la voie dépendante des caspases par une boucle de régulation positive. Marzo *et al.* (2001) ont suggéré que l'apoptose induite par la cladribine se déroulait en deux étapes. Premièrement, un facteur caspase-indépendant agirait au niveau de la mitochondrie et provoquerait une réduction partielle du $\Delta\Psi_m$ suffisante pour induire la mort des cellules. Ensuite, après la libération d'une faible quantité de cytochrome c, les caspases-9 et -3 seraient activées ce qui amplifierait la chute de $\Delta\Psi_m$ et provoquerait une libération importante d'AIF et une activation encore plus importante des caspases. Ainsi, les caspases s'engageraient dans une boucle d'amplification (Chen *et al.*, 2000). Il est également possible que d'autres caspases comme la caspase-12 soient impliquées. En effet, Xie *et al.* (2002) ont montré que la thapsigargine provoquait l'apoptose de lignées de cellules hépatiques en induisant une activation de la caspase-12 et une activation des caspases-3 et -7 sans qu'il y ait de chute du $\Delta\Psi_m$. Cette hypothèse est à envisager pour expliquer les résultats obtenus sur les cellules M4Beu.

Comme dans les cellules 1547, la protéine Bid ne semble pas impliquée dans l'apoptose induite par la diosgénine dans les cellules HEp-2 et M4Beu. La voie des récepteurs est probablement induite par la diosgénine étant donné que la caspase-8 est activée dans les trois types cellulaires, sans être amplifiée par la voie mitochondriale puisque Bid n'est pas clivée. Cependant, les deux voies peuvent être induites sans interagir. En effet, Park *et al.* (2003) ont montré que la phytosphingosine provoquait une fragmentation de l'ADN et un clivage de PARP en activant les caspases-8, -9 et -3 sans impliquer la protéine Bid.

Il est désormais bien connu que PARP, une enzyme de réparation de l'ADN, est clivée et inactivée par la caspase-3 lors de l'apoptose (Nicholson, 1999). Nos résultats montrent qu'il existe un lien entre l'activité de la caspase-3 dans les cellules HEp-2 et M4Beu traitées par la diosgénine et le clivage de PARP. Ces résultats sont en opposition avec ceux obtenus pour les cellules 1547 mais plusieurs études ont montré une corrélation entre l'activation de la caspase-3 et le clivage de PARP (Jiang *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2003).

Le rôle éventuel des COXs dans l'apoptose induite par la diosgénine dans les cellules HEp-2 et M4Beu a été étudié comme dans les cellules 1547. Dans les cellules HEp-2 traitées, l'expression de l'ARNm de COX-1 augmente alors que celle de COX-2 n'est pas modifiée.

Cependant, la protéine COX-2 est fortement exprimée et est corrélée à une forte production de PGE₂. La diosgénine provoque une diminution de l'expression de l'ARNm de COX-1 et une augmentation de celle de COX-2 dans les cellules M4Beu, l'expression de la protéine COX-2 confirmant le résultat obtenu par RT-PCR. Comme dans les cellules 1547 et HEP-2, la production de PGE₂ est fortement induite dans les cellules M4Beu dès 6 h de traitement. Le fait que l'expression de COX-2 soit induite après traitement par la diosgénine dans trois types cellulaires différents et que la production de PGE₂ soit très élevée suggère que les COXs ont réellement un rôle dans l'apoptose induite par la diosgénine. Dans notre modèle, les COXs pourraient favoriser l'apoptose (contrairement aux données bibliographiques) ou être induites pour lutter contre l'apoptose. L'inhibition de l'activité COX permettrait de préciser le rôle joué par ces enzymes lors de l'apoptose induite par la diosgénine.

Nous avons donc montré que la diosgénine provoquait une inhibition importante de la prolifération des cellules HEP-2 et M4Beu. Cette inhibition s'explique par un arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose et semble être dépendante de l'activation de p53. De plus, l'action de la diosgénine dans ces cellules dépend de la caspase-3 et de l'AIF. Elle agit différemment en fonction du type cellulaire sur l'expression de Bax et Bcl-2 et sur la chute de $\Delta\Psi_m$. En revanche, quel que soit le type cellulaire étudié (1547, HEP-2 et M4Beu), l'apoptose induite par la diosgénine est dépendante de p53 et des caspases, indépendante du cytochrome c et n'implique pas la protéine Bid. De plus, l'expression et l'activité des COXs est fortement augmentée lors de l'apoptose induite par la diosgénine. Nous avons également observé cette augmentation de la production de PGE₂ après traitement par la diosgénine dans deux autres types cellulaires : les cellules cancéreuses HEL qui sont des cellules en suspension et les synoviocytes provenant de cultures primaires.

Remarque :

Concernant l'étude réalisée en SdFFF, nous avons démontré qu'il y avait une corrélation entre le profil d'élution obtenu par SdFFF et l'induction de l'apoptose. Ainsi, la SdFFF pourrait être utilisée comme outil de détection rapide de l'induction de l'apoptose puisque le profil d'élution peut être différent très tôt dans le traitement. Les différences de profil d'élution sont corrélées à des modifications biophysiques (taille, densité, forme) des cellules traitées par les molécules étudiées. La taille des cellules traitées par les molécules est significativement

augmentée alors que les trois molécules ont un effet opposé sur le temps d'élution. On peut alors supposer que les densités et les formes cellulaires sont différentes en fonction du traitement. Ces différences de modifications résultent peut être d'une différence d'induction des voies apoptotiques. La staurosporine induit le plus souvent l'apoptose en induisant l'expression de Bax et sa translocation vers la mitochondrie ainsi que la chute de $\Delta\Psi_m$ et le relargage du cytochrome c (Hsu et *al.*, 1997). Le MG132 induit l'apoptose en inhibant l'activation de NF- κ B contrairement à la diosgénine (Corbière et *al.*, 2003). De plus, il agit de façon dépendante ou indépendante de p53 (Fan et *al.*, 2001) alors que la diosgénine active p53 (Corbière et *al.*, 2003). En outre, le MG132 provoque le grossissement du réticulum endoplasmique, la vacuolisation du cytoplasme et de nombreuses autres altérations, ces modifications semblant être caspase-indépendantes (Wagenknecht et *al.*, 2000). La diosgénine agit en réduisant le cytoplasme des cellules, en provoquant une condensation du noyau et en faisant apparaître des filaments cytoplasmiques entre les cellules. De plus, son action est dépendante des caspases et des protéines de la famille Bcl-2 mais indépendante du cytochrome c.

Conclusion

L'apoptose joue un rôle important dans l'embryogénèse, dans l'homéostasie cellulaire, dans le système immunitaire mais aussi dans la régression des tumeurs. La plupart des cellules cancéreuses sont incapables d'entrer en apoptose, c'est pourquoi le but de la recherche fondamentale en cancérologie est de comprendre les altérations génétiques et physiologiques survenues dans une cellule cancéreuse. De plus, l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses est largement étudiée car elle est l'un des principaux objectifs des nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans cette perspective, nous avons tout d'abord testé trois stéroïdes végétaux, la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine sur la prolifération des cellules 1547 d'ostéosarcome humain. Nous avons mis en évidence que la diosgénine avait un effet anti-prolifératif plus important que les deux autres stéroïdes. En effet, la diosgénine exerce son effet en provoquant un blocage du cycle cellulaire et en induisant une forte apoptose alors que l'hécogénine et la tigogénine induisent uniquement l'apoptose dans ces cellules. De plus, le mode d'action de ces stéroïdes semble être différent. La diosgénine agit de façon dépendante de p53 et de la mitochondrie comme le montrent la chute de potentiel membranaire mitochondrial, la diminution de l'ATP intracellulaire ainsi que l'activation de la caspase-9. Au contraire, les deux autres molécules induisent l'apoptose de façon indépendante de p53. En revanche, le facteur de transcription NF- κ B est activé par ces trois molécules alors que les récepteurs nucléaires PPARs ne sont pas impliqués dans l'apoptose induite par les trois stéroïdes. Contrairement aux données bibliographiques, l'expression et l'activité de COX-2 est fortement augmentée au cours de l'apoptose induite par la diosgénine. En revanche, l'hécogénine ou la tigogénine provoquent une diminution de l'expression et de l'activité de COX-2 au cours de l'apoptose. Par conséquent, les résultats obtenus sur la comparaison des trois stéroïdes révèlent l'importance de la structure de la diosgénine quant à son effet anti-prolifératif.

Après avoir montré que la diosgénine avait un effet anti-prolifératif plus important sur les cellules 1547 que l'hécogénine et la tigogénine, nous avons étudié son effet sur deux autres lignées cancéreuses humaines : les cellules HEP-2 (laryngocarcinome) et les cellules M4Beu (mélanomes). Les différentes analyses réalisées montrent que la diosgénine inhibe la prolifération de ces deux types cellulaires de façon similaire en bloquant le cycle cellulaire et en induisant l'apoptose. Malgré quelques différences au niveau du blocage du cycle cellulaire ainsi que dans les événements d'induction de l'apoptose, la diosgénine active p53. Elle induit également l'activité des caspases et implique l'AIF dans les cellules HEP-2 et M4Beu. Quel que soit le type cellulaire, la diosgénine bloque le cycle cellulaire et induit l'apoptose de façon dépendante de p53

et des caspases mais n'implique pas le relargage du cytochrome c ou le clivage de Bid. Comme dans les cellules 1547, la diosgénine induit l'expression et l'activité de la cyclooxygénase-2, ce qui suppose que cette enzyme pourrait jouer un rôle dans l'apoptose induite par la diosgénine.

Nos résultats confirment toute la complexité du processus d'induction de l'apoptose qui apparaît lors de l'étude bibliographique. En effet, la diosgénine peut induire plusieurs voies apoptotiques dans une même lignée cellulaire mais aussi induire l'apoptose de manière différente en fonction du type cellulaire étudié.

Afin de comprendre le mécanisme d'induction de l'apoptose par la diosgénine, il serait intéressant de savoir si cette molécule pénètre dans la cellule ou si elle se fixe sur des récepteurs membranaires comme le suggère l'activité de la caspase-8. Nous avons également montré que la caspase-9 était activée dans ces cellules sans qu'il y ait de relargage du cytochrome c. Cette observation pourrait s'expliquer par l'induction d'une autre voie caspase-dépendante, celle de la caspase-12 initiée ou non par un stress au niveau du réticulum endoplasmique. De plus, la diosgénine provoque un arrêt du cycle cellulaire dans les trois types cellulaires étudiés mais ne bloque pas le cycle de la même façon. Pour cette raison, l'étude approfondie de l'expression des complexes cyclines/CDK et des régulateurs du cycle cellulaire comme pRb semble indispensable pour comprendre ces différences. L'accumulation de p53 dans la mitochondrie et l'expression des protéines homologues de p53, p63 et p73, restent à étudier afin de déterminer leur implication dans l'apoptose induite par la diosgénine. Par ailleurs et contrairement à ce qui est décrit dans la bibliographie, l'expression et l'activité des cyclooxygénases sont fortement augmentées par la diosgénine dans les trois lignées cellulaires étudiées. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de cyclooxygénases permettrait probablement de connaître le rôle réel joué par ces enzymes dans l'apoptose induite par la diosgénine.

Bibliographie

A

Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 2001;15:2177-96.

Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J.* 2001;20:6627-36.

Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:8493-7.

Akakura S, Yoshida M, Yoneda Y, Horinouchi S. A role for Hsc70 in regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53Val-135). *J Biol Chem.* 2001;276:14649-57.

Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2-the affair that never ends. *Carcinogenesis.* 2002;23:541-7.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996;87:171.

Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32:1053-61.

Amigo L, Mendoza H, Zanlungo S, Miquel JF, Rigotti A, Gonzalez S, Nervi F. Enrichment of canalicular membrane with cholesterol and sphingomyelin prevents bile salt-induced hepatic damage. *J Lipid Res.* 1999;40:533-42.

Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.* 2000;256:50-7.

Arriola EL, Lopez AR, Chresta CM. Differential regulation of p21waf-1/cip-1 and Mdm2 by etoposide: etoposide inhibits the p53-Mdm2 autoregulatory feedback loop. *Oncogene.* 1999;18:1081-91.

Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes.* 1997;46:1319-27.

B

Badawi AF, Badr MZ. Chemoprevention of breast cancer by targeting cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (Review). *Int J Oncol.* 2002;20:1109-22. Review.

Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83.

Bamba H, Ota S, Kato A, Kawamoto C, Fujiwara K. Prostaglandins up-regulate vascular endothelial growth factor production through distinct pathways in differentiated U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273:485-91.

Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol.* 2002;14:86-91.

Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6910-6924.

Basu A, Johnson DE, Woolard MD. Potentiation of tumor necrosis factor-alpha-induced cell death by rottlerin through a cytochrome-C-independent pathway. *Exp Cell Res.* 2002;278:209-14.

Battu S, Beneytout JL. Les cyclooxygénases. Implications physiopathologiques. *OPTION/BIO*, supplément au numéro 198, 23pp, 1997.

Battu S, Chable-Rabinovitch H, Rigaud M, Beneytout JL. Cyclooxygenase-2 expression in human adenocarcinoma cell line HT29 cl.19A. *Anticancer Res.* 1998a;18:2397-403.

Battu S, Moalic S, Rigaud M, Beneytout JL. Linoleic acid peroxidation by *Solanum tuberosum* lipoxygenase was activated in the presence of human 5-lipoxygenase-activating protein. *Biochim Biophys Acta.* 1998b;1392:340-50.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2000;2:469-75.

Begum NM, Nakashiro K, Kawamata H, Uchida D, Shintani S, Ikawa Y, Sato M, Hamakawa H. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the growth inhibitory effect of its synthetic ligands in human salivary gland cancer cell lines. *Int J Oncol.* 2002;20:599-605.

Benedict MA, Hu Y, Inohara N, Nunez G. Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J Biol Chem.* 2000;275:8461-8.

Beneytout JL, Nappéz C, Leboutet MJ, Malinvaud G. A plant steroid, diosgenin, a new megakaryocytic differentiation inducer of HEL cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;207:398-404.

Benghuzzi H, Tucci M, Eekie R, Hughes J. The effects of sustained delivery of diosgenin on the adrenal gland of female rats. *Biomed Sci Instrum.* 2003;39:335-40.

Bentires-Alj M, Dejardin E, Viatour P, Van Lint C, Froesch B, Reed JC, Merville MP, Bours V. Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene.* 2001;20:2805-13.

Berry DE, Lu Y, Schmidt B, Fallon PG, O'Connell C, Hu SX, Xu HJ, Blanck G. Retinoblastoma protein inhibits IFN-gamma induced apoptosis. *Oncogene.* 1996;12:1809-19.

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000;2:326-32.

Blagosklonny MV. P53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *Int J Cancer.* 2002;98:161-6.

Bonazzi A, Mastuyugin V, Mieryl PA, Dunn MW, Laniado-Schwartzman M. Regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia and peroxisome proliferators in the corneal epithelium. *J Biol Chem.* 2000;275:2837-44.

Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauca M, Netter P, Terlain B. Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem.* 2000;275:12243-50.

Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 1998;17:37-49.

Bradbury DA, Simmons TD, Slater KJ, Crouch SP. Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J Immunol Methods.* 2000;240:79-92.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996;137:354-66.

Brockman JA, Gupta RA, Dubois RN. Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology.* 1998;115:1049-55.

Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science.* 1995;267:1485-8.

Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol.* 2000;2:645-52.

Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature.* 1995;377:552-7.

Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T, Lees JA. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:1002-7.

Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci.* 1999;112:1743-53.

Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ Jr. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J.* 1999;18:6845-54.

Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 1998;282:1497-501.

Burghes AH, Vaessin HE, de La Chapelle A. Genetics. The land between Mendelian and multifactorial inheritance. *Science.* 2001;293:2213-4.

Buschmann T, Potapova O, Bar-Shira A, Ivanov VN, Fuchs SY, Henderson S, Fried VA, Minamoto T, Alarcon-Vargas D, Pincus MR, Gaarde WA, Holbrook NJ, Shiloh Y, Ronai Z. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol.* 2001;21:2743-54.

Buskens CJ, Van Rees BP, Sivula A, Reitsma JB, Haglund C, Bosma PJ, Offerhaus GJ, Van Lanschot JJ, Ristimaki A. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in patients with adenocarcinoma of the esophagus. *Gastroenterology.* 2002;122:1800-7.

C

Caelles C, Helmberg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature.* 1994;370:220-3.

Cai J, Liu M, Wang Z, Ju Y. Apoptosis induced by dioscin in HeLa cells. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:193-6.

Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie.* 2002;84:203-14.

Cain K, Langlais C, Sun XM, Brown DG, Cohen GM. Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem.* 2001;276:41985-90.

Callejas NA, Castrillo A, Bosca L, Martin-Sanz P. Inhibition of prostaglandin synthesis up-regulates cyclooxygenase-2 induced by lipopolysaccharide and peroxisomal proliferators. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288:1235-41.

Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000;406:855-62.

Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal.* 1999;11:77-85.

Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:681-6.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:13926-31.

Chang BS, Minn AJ, Muchmore SW, Fesik SW, Thompson CB. Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *EMBO J.* 1997;16:968-77.

Chen BP, Wolfgang CD, Hai T. Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol Cell Biol.* 1996;16:1157-68.

Chen Q, Gong B, Almasan A. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2000;7:227-33.

Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem.* 2002;277:13045-52.

Chen Y, Sharp ZD, Lee WH. HEC binds to the seventh regulatory subunit of the 26 S proteasome and modulates the proteolysis of mitotic cyclins. *J Biol Chem.* 1997;272:24081-7.

Cheng J, Imanishi H, Amuro Y, Hada T. NS-398, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, inhibited cell growth and induced cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Cancer.* 2002;99:755-61.

Cheng MS, Wang QL, Tian Q, Song HY, Liu YX, Li Q, Xu X, Miao HD, Yao XS, Yang Z. Total synthesis of methyl protodioscin: a potent agent with antitumor activity. *J Org Chem.* 2003;68:3658-62.

Chilton FH, Fonteh AN, Surette ME, Triggiani M, Winkler JD. Control of arachidonate levels within inflammatory cells. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1299:1-15.

Chinery R, Beauchamp RD, Shyr Y, Kirkland SC, Coffey RJ, Morrow JD. Antioxidants reduce cyclooxygenase-2 expression, prostaglandin production, and proliferation in colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58:2323-7.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-9.

Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 1998;17:151-60.

Colquhoun A, Schumacher RI. gamma-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1533:207-19.

Contente A, Dittmer A, Koch MC, Roth J, Dobbstein M. A polymorphic microsatellite that mediates induction of PIG3 by p53. *Nat Genet.* 2002;30:315-20.

Corbiere C, Liagre B, Bianchi A, Bordji K, Dauca M, Netter P, Beneytout JL. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int J Oncol.* 2003;22:899-905.

Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclo-oxygenase 2

expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:429-34.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 1999;341:233-49.

D

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J.* 1999;342:249-68.

Dantzer F, Schreiber V, Niedergang C, Trucco C, Flatter E, De La Rubia G, Oliver J, Rolli V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie.* 1999;81:69-75.

Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.* 2000;476:118-23.

De Leval X, Delarge J, Somers F, de Tullio P, Henrotin Y, Pirotte B, Dogne JM. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. *Curr Med Chem.* 2000;7:1041-62.

Decker RH, Dai Y, Grant S. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in human leukemia cells (U937) through the mitochondrial rather than the receptor-mediated pathway. *Cell Death Differ.* 2001;8:715-24.

Declercq W, Denecker G, Fiers W, Vandenabeele P. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol.* 1998;161:390-9.

Degen GH. Role of prostaglandin-H synthase in mediating genotoxic and carcinogenic effects of estrogens. *Environ Health Perspect.* 1990;88:217-23.

Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev.* 1995;9:15-30.

Delavive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem.* 1999;274:32048-54.

DeMeester SL, Buchman TG, Qiu Y, Jacob AK, Dunnigan K, Hotchkiss RS, Karl I, Cobb JP. Heat shock induces I kappa B-alpha and prevents stress-induced endothelial cell apoptosis. *Arch Surg.* 1997;132:1283-7.

Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell.* 1995;82:675-84.

Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ.

Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*. 2000;103:351-61.

Denkert C, Kobel M, Pest S, Koch I, Berger S, Schwabe M, Siegert A, Reles A, Klosterhalfen B, Hauptmann S. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol*. 2002;160:893-903.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2000;10:369-77.

Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*. 1999;144:891-901.

Dey R, Moraes CT. Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells. *J Biol Chem*. 2000;275:7087-94.

Di Leonardo A, Khan SH, Linke SP, Greco V, Seidita G, Wahl GM. DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res*. 1997;57:1013-9.

Diaz GD, Li Q, Dashwood RH. Caspase-8 and apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. *Cancer Res*. 2003;63:1254-61.

Dietz S, Rother K, Bamberger C, Schmale H, Mossner J, Engeland K. Differential regulation of transcription and induction of programmed cell death by human p53-family members p63 and p73. *FEBS Lett*. 2002;525:93-9.

Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*. 1983;11:1475-89.

Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*. 2000;275:11750-7.

Doisneau-Sixou SF, Cestac P, Faye JC, Favre G, Sutherland RL. Additive effects of tamoxifen and the farnesyl transferase inhibitor FTI-277 on inhibition of MCF-7 breast cancer cell-cycle progression. *Int J Cancer*. 2003;106:789-98.

Donato NJ, Perez M. Tumor necrosis factor-induced apoptosis stimulates p53 accumulation and p21WAF1 proteolysis in ME-180 cells. *J Biol Chem*. 1998;273:5067-72.

Dong M, Guda K, Nambiar PR, Rezaie A, Belinsky GS, Lambeau G, Giardina C, Rosenberg DW. Inverse association between phospholipase A2 and COX-2 expression during mouse colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2003;24:307-15.

Dore M, Cote LC, Mitchell A, Sirois J. Expression of prostaglandin G/H synthase type 1, but not type 2, in human ovarian adenocarcinomas. *J Histochem Cytochem*. 1998;46:77-84.

Dou QP, An B, Antoku K, Johnson DE. Fas stimulation induces RB dephosphorylation and proteolysis that is blocked by inhibitors of the ICE protease family. *J Cell Biochem.* 1997;64:586-94.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102:33-42.

DuBois RN, Shao J, Tsujii M, Sheng H, Beauchamp RD. G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res.* 1996;56:733-7.

Duval R, Bellet V, Delebasse S, Bosgiraud C. Implication of caspases during maedi-visna virus-induced apoptosis. *J Gen Virol.* 2002;83:3153-61.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998;12:2245-62.

E

Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, Verhagen AM, Vaux DL. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J Cell Biol.* 2001;152:483-90.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993;75:817-25.

Elder DJ, Halton DE, Hague A, Paraskeva C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1679-83.

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* 1998;273:14363-7.

Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 2000;20:929-35.

Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res.* 2000;448:121-38.

F

Fahmi H, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. PPARgamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses in arthritis. An overview. *J Rheumatol.* 2002;29:3-14.

Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. The retinoblastoma gene product inhibits TGF-beta1 induced apoptosis in primary rat hepatocytes and human HuH-7 hepatoma cells. *Oncogene.* 1996;12:1909-19.

Fan XM, Wong BC, Wang WP, Zhou XM, Cho CH, Yuen ST, Leung SY, Lin MC, Kung HF, Lam SK. Inhibition of proteasome function induced apoptosis in gastric cancer. *Int J Cancer.*

2001;93:481-8.

Faour WH, He Y, He QW, de Ladurantaye M, Quintero M, Mancini A, Di Battista JA. Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001;276:31720-31.

Farmer G, Colgan J, Nakatani Y, Manley JL, Prives C. Functional interaction between p53, the TATA-binding protein (TBP), and TBP-associated factors in vivo. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4295-304.

Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* 2001;3:E255-63.

Fesik SW, Shi Y. Structural biology. Controlling the caspases. *Science.* 2001;294:1477-8.

Flatt PM, Tang LJ, Scatena CD, Szak ST, Pietenpol JA. p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol.* 2000;20:4210-23.

Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, Jacks T. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature.* 2002;416:560-4.

Flower RJ, Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature.* 1972;240:410-1.

Frey RS, Li J, Singletary KW. Effects of genistein on cell proliferation and cell cycle arrest in nonneoplastic human mammary epithelial cells: involvement of Cdc2, p21(waf/cip1), p27(kip1), and Cdc25C expression. *Biochem Pharmacol.* 2001;61:979-89.

Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Yin Z, Wu X, Jones SN, Ronai Z. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.* 1998;12:2658-63.

Fujita H, Koshida K, Keller ET, Takahashi Y, Yoshimito T, Namiki M, Mizokami A. Cyclooxygenase-2 promotes prostate cancer progression. *Prostate.* 2002;53:232-40.

Fujita T, Matsui M, Takaku K, Uetake H, Ichikawa W, Taketo MM, Sugihara K. Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 1998;58:4823-6.

Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science.* 1996;271:1744-7.

Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol.* 1992;12:2866-71.

G

Galea-Lauri J, Richardson AJ, Latchman DS, Katz DR. Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. *J Immunol.*

1996;157:4109-18.

Gao C, Nakajima T, Taya Y, Tsuchida N. Activation of p53 in MDM2-overexpressing cells through phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;264:860-4.

Gao C, Tsuchida N. Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90:180-7.

Garavito RM. The cyclooxygenase-2 structure: new drugs for an old target? *Nat Struct Biol.* 1996;3:897-901.

Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:932-43.

Gerondakis S, Grumont R, Rourke I, Grossmann M. The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:353-9.

Gervais JL, Seth P, Zhang H. Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1998;273:19207-12.

Gil-Gomez G, Berns A, Brady HJ. A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 1998;17:7209-18.

Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med.* 1999;5:698-701.

Goldberg Y, Nassif II, Pittas A, Tsai LL, Dynlacht BD, Rigas B, Shiff SJ. The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins. *Oncogene.* 1996;12:893-901.

Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2000;2:156-62.

Gotoh T, Oyadomari S, Mori K, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. *J Biol Chem.* 2002;277:12343-50.

Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartweg E, Steller H. Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J.* 2000;19:589-97.

Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 1998;8:267-71.

Green DR, Amarante-Mendes GP. The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. *Results Probl Cell Differ.* 1998;24:45-61.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:1899-911.

Gu W, Shi XL, Roeder RG. Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature*. 1997;387:819-23.

Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:11-21.

Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, DuBois RN. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2003;63:906-11.

Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene*. 2002;21:3727-38.

Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate*. 2000;42:73-8.

Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol*. 2003;22:15-20.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*. 1999;19:5785-99.

H

Haas-Kogan DA, Kogan SC, Levi D, Dazin P, T'Ang A, Fung YK, Israel MA. Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. *EMBO J*. 1995;14:461-72.

Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*. 2000;77:81-137.

Hakeda Y, Harada S, Matsumoto T, Tezuka K, Higashino K, Kodama H, Hashimoto-Goto T, Ogata E, Kumegawa M. Prostaglandin F2 alpha stimulates proliferation of clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells by up-regulation of insulin-like growth factor I receptors. *J Biol Chem*. 1991;266:21044-50.

Hamberg M, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71:3400-4.

Hao M, Lowy AM, Kapoor M, Deffie A, Liu G, Lozano G. Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo. *J Biol Chem*. 1996;271:29380-5.

Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell*. 1999;34:13-22.

Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes*

Dev. 2000;14:2393-409.

Harizi H, Juzan M, Grosset C, Rashedi M, Gualde N. Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol.* 2001;209:19-28.

Harper JW, Elledge SJ. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 1996;6:56-64.

Harvey KJ, Blomquist JF, Ucker DS. Commitment and effector phases of the physiological cell death pathway elucidated with respect to Bcl-2 caspase, and cyclin-dependent kinase activities. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2912-22.

Hasturk S, Kemp B, Kalapurakal SK, Kurie JM, Hong WK, Lee JS. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 2002;94:1023-31.

Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden KH, Oren M. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* 1995;9:2170-83.

Haydon RC, Zhou L, Feng T, Breyer B, Cheng H, Jiang W, Ishikawa A, Peabody T, Montag A, Simon MA, He TC. Nuclear receptor agonists as potential differentiation therapy agents for human osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* 2002;8:1288-94.

Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem.* 2002;277:432-8.

Heiskanen KM, Bhat MB, Wang HW, Ma J, Nieminen AL. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem.* 1999;274:5654-8.

Hellin AC, Bentires-Alj M, Verlaet M, Benoit V, Gielen J, Bours V, Merville MP. Roles of nuclear factor-kappaB, p53, and p21/WAF1 in daunomycin-induced cell cycle arrest and apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295:870-8.

Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.* 2000;33:341-65.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770-6.

Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1997;1:3-11.

Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell.* 1994;76:977-87.

Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T, Takahashi T. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in

human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1998;58:3761-4.

Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T. Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer.* 2000;86:667-71.

Higdon K, Scott A, Tucci M, Benghuzzi H, Tsao A, Puckett A, Cason Z, Hughes J. The use of estrogen, DHEA, and diosgenin in a sustained delivery setting as a novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model. *Biomed Sci Instrum.* 2001;37:281-6.

Hiromura K, Pippin JW, Fero ML, Roberts JM, Shankland SJ. Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *J Clin Invest.* 1999;103:597-604.

Ho L, Osaka H, Aisen PS, Pasinetti GM. Induction of cyclooxygenase (COX)-2 but not COX-1 gene expression in apoptotic cell death. *J Neuroimmunol.* 1998;89:142-9.

Holmes-McNary M, Baldwin AS Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase. *Cancer Res.* 2000;60:3477-83.

Hoppe J, Kilic M, Hoppe V, Sachinidis A, Kagerhuber U. Formation of caspase-3 complexes and fragmentation of caspase-12 during anisomycin-induced apoptosis in AKR-2B cells without aggregation of Apaf-1. *Eur J Cell Biol.* 2002;81:567-76.

Horvitz HR, Sternberg PW, Greenwald IS, Fixsen W, Ellis HM. Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1983;48:453-63.

Houser S, Koshlatyi S, Lu T, Gopen T, Bargonetti J. Camptothecin and Zeocin can increase p53 levels during all cell cycle stages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289:998-1009.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell.* 1995;81:495-504.

Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3668-72.

Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science.* 1996;274:2100-3.

Hu S, Yang X. dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the *Drosophila* caspase DREDD. *J Biol Chem.* 2000;275:30761-4.

Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 1999;18:3586-95.

Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:4386-91.

Huang Q, Alvares K, Chu R, Bradfield CA, Reddy JK. Association of peroxisome proliferator-activated receptor and Hsp72. *J Biol Chem.* 1994;269:8493-7.

Huang S, Liu LN, Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Houghton PJ. p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin. *Cancer Res.* 2001;61:3373-81.

I

Ikejima M, Marsischky G, Gill DM. Direction of elongation of poly(ADP-ribose) chains. Addition of residues at the polymerase-proximal terminus. *J Biol Chem.* 1987;262:17641-50.

Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2147-52.

Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem.* 2000;275:28028-32.

J

Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* 1998;17:6124-34.

Jaattela M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer.* 1995;60:689-93.

Janicke RU, Walker PA, Lin XY, Porter AG. Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.* 1996;15:6969-78.

Jendrossek V, Handrick R, Belka C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J.* 2003;17:1547-9.

Jiang WG, Redfern A, Bryce RP, Mansel RE. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) mediates the action of gamma linolenic acid in breast cancer cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2000;62:119-27.

Jiang XH, Wong BC, Yuen ST, Jiang SH, Cho CH, Lai KC, Lin MC, Kung HF, Lam SK, Chun-Yu Wong B. Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cells through up-regulation of p53 and activation of caspase-3. *Int J Cancer.* 2001;91:173-9.

Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1564-72.

Jones PA. Cancer. Death and methylation. *Nature.* 2001;409:141, 143-4.

Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr. p73 is a simian p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature.* 1997;389:191-4.

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:4997-5002.

K

- Kapoor M, Hamm R, Yan W, Taya Y, Lozano G.** Cooperative phosphorylation at multiple sites is required to activate p53 in response to UV radiation. *Oncogene*. 2000;19:358-64.
- Karin M, Lin A.** NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002;3:221-7.
- Karin M.** How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 1999;18:6867-74.
- Kass GE, Eriksson JE, Weis M, Orrenius S, Chow SC.** Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem J*. 1996;318:749-52.
- Kasten MM, Giordano A.** pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ*. 1998;5:132-40.
- Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacovics M, Tschopp J.** The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol*. 2000;10:640-8.
- Katayose D, Wersto R, Cowan K, Seth P.** Consequences of p53 gene expression by adenovirus vector on cell cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215:446-51.
- Katz E, Deehan MR, Seatter S, Lord C, Sturrock RD, Harnett MM.** B cell receptor-stimulated mitochondrial phospholipase A2 activation and resultant disruption of mitochondrial membrane potential correlate with the induction of apoptosis in WEHI-231 B cells. *J Immunol*. 2001;166:137-47.
- Kaufmann SH, Mesner PW Jr, Samejima K, Tone S, Earnshaw WC.** Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. *Methods Enzymol*. 2000;322:3-15.
- Keller D, Zeng X, Li X, Kapoor M, Iordanov MS, Taya Y, Lozano G, Magun B, Lu H.** The p38MAPK inhibitor SB203580 alleviates ultraviolet-induced phosphorylation at serine 389 but not serine 15 and activation of p53. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261:464-71.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.
- Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ.** Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature*. 1995;374:736-9.
- Kim IK, Lee JH, Sohn HW, Kim HS, Kim SH.** Prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 induce apoptosis in L1210 cells. *FEBS Lett*. 1993;321:209-14.
- Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY.** Upregulated cyclooxygenase-2 inhibits apoptosis of human gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*. 2000a;45:2436-43.
- Kim TH, Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK, Yin XM.** Bid-induced cytochrome c release is

mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem.* 2000b;275:39474-81.

Kim TK. In vitro transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;234:300-2.

Kimura M, Osumi S, Ogihara M. Stimulation of DNA synthesis and proliferation by prostaglandins in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 2000;404:259-71.

King FW, Wawrzynow A, Hohfeld J, Zyllicz M. Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *EMBO J.* 2001;20:6297-305.

Kinzig A, Furstenberger G, Burger F, Vogel S, Muller-Decker K, Mincheva A, Lichter P, Marks F, Krieg P. Murine epidermal lipoxygenase (Aloxe) encodes a 12-lipoxygenase isoform. *FEBS Lett.* 1997;402:162-6.

Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:4318-23.

Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 1992;358:771-4.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997;275:1132-6.

Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell.* 1999;97:431-4.

Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer.* 2001;91:333-8.

Kondo M, Oya-Ito T, Kumagai T, Osawa T, Uchida K. Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *J Biol Chem.* 2001;276:12076-83.

Konturek PC, Kania J, Kukharsky V, Ocker S, Hahn EG, Konturek SJ. Influence of gastrin on the expression of cyclooxygenase-2, hepatocyte growth factor and apoptosis-related proteins in gastric epithelial cells. *J Physiol Pharmacol.* 2003;54:17-32.

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 1997;278:294-8.

Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:649-57.

Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the

subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993;53:4701-14.

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

Kroll B, Kunz S, Tu N, Schwarz LR. Inhibition of transforming growth factor-beta1 and UV light-induced apoptosis by prostanoids in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;152:240-50.

Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2001;21:8247-54.

Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, White RL, Prescott SM. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:4816-20.

L

Lasa M, Mahtani KR, Finch A, Brewer G, Saklatvala J, Clark AR. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol.* 2000;20:4265-74.

Lautrette C, Cardot PJ, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Jauberteau MO, Battu S. Sedimentation field flow fractionation purification of immature neural cells from a human tumor neuroblastoma cell line. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;791:149-60.

Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 1997;272:3406-10.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995;270:12953-6.

Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4:769-81.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88:323-31.

Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R. Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell.* 1998;1:553-63.

Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 2000a;275:25665-71.

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

- Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X, Williams RS.** Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*. 2000b;101:389-99.
- Li LY, Luo X, Wang X.** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412:95-9.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479-89.
- Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M.** The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med*. 1999;189:1839-45.
- Linette GP, Li Y, Roth K, Korsmeyer SJ.** Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:9545-52.
- Liopsis SN, Tsokos GC.** Heat-shock of normal t-cells and T-cell lines downregulates the TCR/CD3-mediated cytoplasmic Ca²⁺ responses and the production of inositol trisphosphate. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1997;19:511-21.
- Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG.** Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol*. 2001;3:128-33.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996;86:147-57.
- Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC.** NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res*. 1998;58:4245-9.
- Longo WE, Grossmann EM, Erickson B, Panesar N, Mazuski JE, Kaminski DL.** The effect of phospholipase A2 inhibitors on proliferation and apoptosis of murine intestinal cells. *J Surg Res*. 1999;84:51-6.
- Longthorne VL, Williams GT.** Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *EMBO J*. 1997;16:3805-12.
- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G.** Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ*. 1999;6:516-24.
- Loro LL, Johannessen AC, Vintermyr OK.** Decreased expression of bcl-2 in moderate and severe oral epithelia dysplasias. *Oral Oncol*. 2002;38:691-8.
- Loubat A, Rochet N, Turchi L, Rezzonico R, Far DF, Auberger P, Rossi B, Ponzio G.** Evidence for a p23 caspase-cleaved form of p27[KIP1] involved in G1 growth arrest. *Oncogene*.

1999;18:3324-33.

Lu H, Taya Y, Ikeda M, Levine AJ. Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation of the murine p53 protein at serine-389. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998a;95:6399-402.

Lu Y, Yamagishi N, Yagi T, Takebe H. Mutated p21(WAF1/CIP1/SDI1) lacking CDK-inhibitory activity fails to prevent apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Oncogene.* 1998b;16:705-12.

Lucarelli E, Sangiorgi L, Maini V, Lattanzi G, Marmioli S, Reggiani M, Mordenti M, Alessandra Gobbi G, Scrimieri F, Zambon Bertoja A, Picci P. Troglitazone affects survival of human osteosarcoma cells. *Int J Cancer.* 2002;98:344-51.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94:481-90.

M

Ma D, Zhang J, Sugahara K, Sagara Y, Kodama H. Effect of sarsasapogenin and its derivatives on the stimulus coupled responses of human neutrophils. *Clin Chim Acta.* 2001;314:107-12.

MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1995;5:127-56.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995;83:835-9.

Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 2000;275:16202-12.

Mariani SM, Matiba B, Armandola EA, Krammer PH. Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. *J Cell Biol.* 1997;137:221-9.

Marnett LJ. Prostaglandin synthase-mediated metabolism of carcinogens and a potential role for peroxy radicals as reactive intermediates. *Environ Health Perspect.* 1990;88:5-12.

Marnett LJ. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:153-64.

Martinou JC, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol.* 2000;2:E41-3.

Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem.* 2002;277:439-44.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med.* 1998;187:1261-71.

Marzo I, Perez-Galan P, Giraldo P, Rubio-Felix D, Anel A, Naval J. Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Biochem J.* 2001;359:537-46.

Matsumoto Y, Ishiko O, Deguchi M, Nakagawa E, Ogita S. Cyclooxygenase-2 expression in normal ovaries and epithelial ovarian neoplasms. *Int J Mol Med.* 2001;8:31-6.

Matsuoka M, Igisu H. Cadmium induces phosphorylation of p53 at serine 15 in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;282:1120-5.

Maxey KM, Hessler E, MacDonald J, Hitchingham L. The nature and composition of 15-deoxy-Delta(12,14)PGJ(2). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2000;62:15-21.

Mazel S, Burtrum D, Petrie HT. Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med.* 1996;183:2219-26.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1249-59.

Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem.* 1999;274:8328-34.

Meek DW, Simon S, Kikkawa U, Eckhart W. The p53 tumour suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II. *EMBO J.* 1990;9:3253-60.

Meek DW. New developments in the multi-site phosphorylation and integration of stress signalling at p53. *Int J Radiat Biol.* 1998;74:729-37.

Mendez M, LaPointe MC. PPAR{gamma} Inhibition of Cyclooxygenase-2, PGE2 Synthase, and Inducible Nitric Oxide Synthase in Cardiac Myocytes. *Hypertension.* 2003;42:844-50.

Michael MS, Badr MZ, Badawi AF. Inhibition of cyclooxygenase-2 and activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma synergistically induces apoptosis and inhibits growth of human breast cancer cells. *Int J Mol Med.* 2003;11:733-6.

Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 2003;11:577-90.

Milne DM, Campbell DG, Caudwell FB, Meek DW. Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1994;269:9253-60.

Milne DM, Campbell LE, Campbell DG, Meek DW. p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by an ultraviolet radiation-induced protein kinase characteristic of the c-Jun kinase, JNK1. *J Biol Chem.* 1995;270:5511-8.

Mimaki Y, Yokosuka A, Kuroda M, Sashida Y. Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. *Biol Pharm Bull.* 2001;24:1286-9.

Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell.* 1993;75:653-60.

Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the *bcl-2* gene. *Cancer Res.* 1994;54:3131-5.

Moalic S, Liagre B, Corbiere C, Bianchi A, Dauca M, Bordji K, Beneytout JL. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. *FEBS Lett.* 2001a;506:225-30.

Moalic S, Liagre B, Le Bail JC, Beneytout JL. Dose-dependent modulation of apoptosis and cyclooxygenase-2 expression in human 1547 osteosarcoma cells by NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Int J Oncol.* 2001b;18:533-40.

Mohan S, Epstein JB. Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* 2003;39:537-46.

Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res.* 1999;59:4356-62.

Moll UM, Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett.* 2001;493:65-9.

Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 1998;12:3788-96.

Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem.* 2002;277:34287-94.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983;65:55-63.

Mosner J, Mummenbrauer T, Bauer C, Sczakiel G, Grosse F, Deppert W. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.* 1995;14:4442-9.

Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1997;17:5317-27.

Muller-Decker K, Reinerth G, Krieg P, Zimmermann R, Heise H, Bayerl C, Marks F, Furstenberger G. Prostaglandin-H-synthase isozyme expression in normal and neoplastic human skin. *Int J Cancer.* 1999;82:648-56.

Musacchio A, Hardwick KG. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic

signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:731-41.

N

Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000;150:887-94.

Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 2001;7:683-94.

Nappez C, Liagre B, Beneytout JL. Changes in lipoxygenase activities in human erythroleukemia (HEL) cells during diosgenin-induced differentiation. *Cancer Lett.* 1995;96:133-40.

Nevins JR. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.* 1998;9:585-93.

Newton R, Seybold J, Kuitert LM, Bergmann M, Barnes PJ. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem.* 1998;273:32312-21.

Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999;6:1028-42.

Nishida K, Furumatsu T, Takada I, Kawai A, Yoshida A, Kunisada T, Inoue H. Inhibition of human chondrosarcoma cell growth via apoptosis by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Br J Cancer.* 2002;86:1303-9.

O

Oberdanner CB, Kiesslich T, Krammer B, Plaetzer K. Glucose is required to maintain high ATP-levels for the energy-utilizing steps during PDT-induced apoptosis. *Photochem Photobiol.* 2002;76:695-703.

O'Brien V. Viruses and apoptosis. *J Gen Virol.* 1998;79:1833-45.

O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 1998;17:384-95.

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000a;288:1053-8.

Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell.* 2000b;102:849-62.

Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, Hasegawa K, Iseki H, Tsunozaki H, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with

gastric carcinoma. *Cancer*. 2001;91:1876-81.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74:609-19.

Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*. 2003;10:431-42.

Orlinick JR, Vaishnaw A, Elkou KB, Chao MV. Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *J Biol Chem*. 1997;272:28889-94.

Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med*. 1998;4:839-43.

Ota S, Bamba H, Kato A, Kawamoto C, Yoshida Y, Fujiwara K. Review article: COX-2, prostanoids and colon cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16:102-6.

Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol*. 1995;15:3032-40.

Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis*. 2002;7:335-45.

P

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18:6853-66.

Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J*. 2000;19:4310-22.

Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem*. 1999;274:38241-50.

Park MT, Kang JA, Choi JA, Kang CM, Kim TH, Bae S, Kang S, Kim S, Choi WI, Cho CK, Chung HY, Lee YS, Lee SJ. Phytosphingosine induces apoptotic cell death via caspase 8 activation and Bax translocation in human cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2003;9:878-85.

Pasinetti GM. Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: experimental approaches and clinical interventions. *J Neurosci Res*. 1998;54:1-6.

Pei XH, Nakanishi Y, Takayama K, Bai F, Hara N. Benzo[a]pyrene activates the human p53 gene through induction of nuclear factor kappaB activity. *J Biol Chem*. 1999;274:35240-6.

Piazza GA, Alberts DS, Hixson LJ, Paranka NS, Li H, Finn T, Bogert C, Guillen JM, Brendel K, Gross PH, Sperl G, Ritchie J, Burt RW, Ellsworth L, Ahnen DJ, Pamukcu R.

Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels. *Cancer Res.* 1997;57:2909-15.

Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology.* 2002;181-182:475-81.

Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem.* 1996;271:12687-90.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* 1997;389:300-5.

Pouliot M, McDonald PP, Krump E, Mancini JA, McColl SR, Weech PK, Borgeat P. Colocalization of cytosolic phospholipase A₂, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils. *Eur J Biochem.* 1996;238:250-8.

Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1470:M69-78.

Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* 2000;2:291-9.

Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 1999;3:287-96.

Q

Qiao L, Shiff SJ, Rigas B. Sulindac sulfide inhibits the proliferation of colon cancer cells: diminished expression of the proliferation markers PCNA and Ki-67. *Cancer Lett.* 1997;115:229-34.

R

Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science.* 1993;262:695-700.

Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2001;117:333-40.

Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.* 2001;276:33869-74.

Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3:839-43.

- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G.** Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol.* 2002;192:131-7.
- Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A.** DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol.* 2001;3:1-7.
- Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C.** Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett.* 1996;378:107-10.
- Rigas B, Shiff SJ.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), cyclooxygenases, and the cell cycle. Their interactions in colon cancer. *Adv Exp Med Biol.* 1999;470:119-26.
- Riley DJ, Lee EY, Lee WH.** The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:1-29.
- Rioux N, Castonguay A.** The induction of cyclooxygenase-1 by a tobacco carcinogen in U937 human macrophages is correlated to the activation of NF-kappaB. *Carcinogenesis.* 2000;21:1745-51.
- Ristimaki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T.** Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 1994;269:11769-75.
- Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J.** Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62:632-5.
- Rodriguez J, Lazebnik Y.** Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 1999;13:3179-84.
- Ron D, Habener JF.** CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 1992;6:439-53.
- Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C.** Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature.* 1998;391:496-9.
- Rozenfeld-Granot G, Toren A, Amariglio N, Brok-Simoni F, Rechavi G.** Mutation analysis of the FAS and TNFR apoptotic cascade genes in hematological malignancies. *Exp Hematol.* 2001;29:228-33.
- Rudel T, Bokoch GM.** Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science.* 1997;276:1571-4.
- Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH.** Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature.* 2000;404:892-7.

Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM. Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nat Med.* 1998;4:1058-61.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med.* 1999;107:489-506.

Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev.* 1998;12:2831-41.

Sakaguchi K, Sakamoto H, Lewis MS, Anderson CW, Erickson JW, Appella E, Xie D. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry.* 1997;36:10117-24.

Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol.* 2000;2:476-83.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* 1997;91:443-6.

Samejima K, Tone S, Earnshaw WC. CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276:45427-32.

Sanchez-Alcazar JA, Bradbury DA, Pang L, Knox AJ. Cyclooxygenase (COX) inhibitors induce apoptosis in non-small cell lung cancer through cyclooxygenase independent pathways. *Lung Cancer.* 2003;40:33-44.

Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM. Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett.* 2001;488:110-5.

Sanz R, Cardot P, Battu S, Galceran MT. Steric-hyperlayer sedimentation field flow fractionation and flow cytometry analysis applied to the study of *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Chem.* 2002;74:4496-504.

Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nat Med.* 1998;4:1046-52.

Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kazumori H, Okuyama T, Rumi MA, Fukuda R, Nagasue N, Kinoshita Y. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR γ agonists. *Br J Cancer.* 2000;83:1394-400.

Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous

messengers. *Mol Cell Biol.* 1999;19:2435-44.

Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ.* 1998;5:372-80.

Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:11357-62.

Schmedtje JF Jr, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272:601-8.

Schneider E, Montenarh M, Wagner P. Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene.* 1998;17:2733-41.

Schwab JM, Schluesener HJ, Laufer S. COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? *Lancet.* 2003;361:981-2.

Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Isakson P. Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv Exp Med Biol.* 1997;400A:167-70.

Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology.* 1996;137:4499-502.

Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, DuBois RN. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2000;275:33951-6.

Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ. The physiology of p16(INK4A)-mediated G1 proliferative arrest. *Cell Biochem Biophys.* 2000;33:189-97.

Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, Wu GS, Amundson S, Brooks KS, Fornace AJ Jr, el-Deiry WS. p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 1998;58:1593-8.

Sheng H, Shao J, Dixon DA, Williams CS, Prescott SM, DuBois RN, Beauchamp RD. Transforming growth factor-beta1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. *J Biol Chem.* 2000;275:6628-35.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58:362-6.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999;13:1501-12.

Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell.* 1993;73:1059-65.

Shibasaki F, Kondo E, Akagi T, McKeon F. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature.* 1997;386:728-31.

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*. 1997;91:325-34.

Shieh SY, Taya Y, Prives C. DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J*. 1999;18:1815-23.

Shigemasa K, Tian X, Gu L, Shiroyama Y, Nagai N, Ohama K. Expression of cyclooxygenase-2 and its relationship to p53 accumulation in ovarian adenocarcinomas. *Int J Oncol*. 2003;22:99-105.

Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, Hiraishi H, Terano A. Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut*. 2002;50:658-64.

Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:1455-9.

Shin MS, Kim HS, Lee SH, Park WS, Kim SY, Park JY, Lee JH, Lee SK, Lee SN, Jung SS, Han JY, Kim H, Lee JY, Yoo NJ. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res*. 2001;61:4942-6.

Shun CT, Wu MS, Huang SP, Wang HP, Chuang SM, Lin JT. Cyclooxygenase-2 expression correlates with nuclear p53 accumulation in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2003;50:988-92.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*. 2000;288:2354-7.

Sigal E, Grunberger D, Cashman JR, Craik CS, Caughey GH, Nadel JA. Arachidonate 15-lipoxygenase from human eosinophil-enriched leukocytes: partial purification and properties. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;150:376-83.

Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares H, Smulson ME. Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol Cell Biochem*. 1999;193:137-48.

Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. 1999;18:6145-57.

Skowyra D, Georgopoulos C, Zylicz M. The *E. coli* dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell*. 1990;62:939-44.

Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 ;88:3671-5.

Smith ML, Hawcroft G, Hull MA. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer.* 2000a;36:664-74.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000b;69:145-82.

Smits VA, Medema RH. Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1519:1-12.

Sok J, Wang XZ, Batchvarova N, Kuroda M, Harding H, Ron D. CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol Cell Biol.* 1999;19:495-504.

Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer.* 2000;89:2637-45.

Spiess C, Beil A, Ehrmann M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell.* 1999;97:339-47.

Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem.* 2000;275:36152-7.

Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature.* 2001;410:112-6.

Srivastava RK, Srivastava AR, Seth P, Agrawal S, Cho-Chung YS. Growth arrest and induction of apoptosis in breast cancer cells by antisense depletion of protein kinase A-RI alpha subunit: p53-independent mechanism of action. *Mol Cell Biochem.* 1999;195:25-36.

Stewart ZA, Pietenpol JA. p53 Signaling and cell cycle checkpoints. *Chem Res Toxicol.* 2001;14:243-63.

Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:139-45.

Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:4844-9.

Strober BE, Dunaief JL, Guha, Goff SP. Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol Cell Biol.* 1996;16:1576-83.

Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem.* 1999;274:10911-5.

Subbaramaiah K, Hart JC, Norton L, Dannenberg AJ. Microtubule-interfering agents stimulate the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of ERK1/2 AND p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem.* 2000;275:14838-45.

Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. 2001;20:2122-33.

Surette ME, Fonteh AN, Bernatchez C, Chilton FH. Perturbations in the control of cellular arachidonic acid levels block cell growth and induce apoptosis in HL-60 cells. *Carcinogenesis*. 1999;20:757-63.

Surette ME, Winkler JD, Fonteh AN, Chilton FH. Relationship between arachidonate-phospholipid remodeling and apoptosis. *Biochemistry*. 1996;35:9187-96.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397:441-6.

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 2001;8:613-21.

T

Tabata M, Tabata R, Grabowski DR, Bukowski RM, Ganapathi MK, Ganapathi R. Roles of NF-kappaB and 26 S proteasome in apoptotic cell death induced by topoisomerase I and II poisons in human nonsmall cell lung carcinoma. *J Biol Chem*. 2001;276:8029-36.

Tafani M, Karpinich NO, Hurster KA, Pastorino JG, Schneider T, Russo MA, Farber JL. Cytochrome c release upon Fas receptor activation depends on translocation of full-length bid and the induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*. 2002;277:10073-82.

Takahashi N, Okumura T, Motomura W, Fujimoto Y, Kawabata I, Kohgo Y. Activation of PPARgamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett*. 1999;455:135-9.

Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:1609-20.

Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J*. 1995;14:1129-35.

Taylor WR, Schonthal AH, Galante J, Stark GR. p130/E2F4 binds to and represses the cdc2 promoter in response to p53. *J Biol Chem*. 2001;276:1998-2006.

Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001;20:1803-15.

Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J*. 2001;15:2057-72.

Thornberry NA, Chapman KT, Nicholson DW. Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Methods Enzymol*. 2000;322:100-10.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281:1312-6.

Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol*. 1998;5:R97-103.

Toyota M, Miyazaki Y, Kitamura S, Nagasawa Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma reduces the growth rate of pancreatic cancer cells through the reduction of cyclin D1. *Life Sci*. 2002;70:1565-75.

Tsuji M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*. 1995;83:493-501.

Tsuji M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3336-40.

Tucci M, Benghuzzi H. Structural changes in the kidney associated with ovariectomy and diosgenin replacement therapy in adult female rats. *Biomed Sci Instrum*. 2003;39:341-6.

Turchan J, Pocernich CB, Gairola C, Chauhan A, Schifitto G, Butterfield DA, Buch S, Narayan O, Sinai A, Geiger J, Berger JR, Elford H, Nath A. Oxidative stress in HIV demented patients and protection ex vivo with novel antioxidants. *Neurology*. 2003;60:307-14.

U

Ubeda M, Vallejo M, Habener JF. CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. *Mol Cell Biol*. 1999;19:7589-99.

Uhlmann EJ, D'Sa-Eipper C, Subramanian T, Wagner AJ, Hay N, Chinnadurai G. Deletion of a nonconserved region of Bcl-2 confers a novel gain of function: suppression of apoptosis with concomitant cell proliferation. *Cancer Res*. 1996;56:2506-9.

Unger T, Juven-Gershon T, Moallem E, Berger M, Vogt Sionov R, Lozano G, Oren M, Haupt Y. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J*. 1999;18:1805-14.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 2000;287:664-6.

V

Van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:487-97.

Van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*. 2001;8:1136-42.

Van Rees BP, Saukkonen K, Ristimaki A, Polkowski W, Tytgat GN, Drillenburg P,

Offerhaus GJ. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol.* 2002;196:171-9.

Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell.* 1999;3:159-67.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.

Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol.* 2001;2:REVIEWS3009.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000;102:43-53.

Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 2003;36:165-75.

Vidal S, Kovacs K, Bell D, Horvath E, Scheithauer BW, Lloyd RV. Cyclooxygenase-2 expression in human pituitary tumors. *Cancer.* 2003;97:2814-21.

Vousden KH. p53: death star. *Cell.* 2000;103:691-4.

W

Wagenknecht B, Hermisson M, Groscurth P, Liston P, Krammer PH, Weller M. Proteasome inhibitor-induced apoptosis of glioma cells involves the processing of multiple caspases and cytochrome c release. *J Neurochem.* 2000;75:2288-97.

Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science.* 1996a;274:784-7.

Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.* 1996b;10:2859-69.

Wang X, Gorospe M, Huang Y, Holbrook NJ. p27Kip1 overexpression causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogene.* 1997;15:2991-7.

Wang XB, Yang J, Huang Y, Vykoukal J, Becker FF, Gascoyne PR. Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation. *Anal Chem.* 2000;72:832-9.

Wang XW, Vermeulen W, Coursen JD, Gibson M, Lupold SE, Forrester K, Xu G, Elmore L, Yeh H, Hoeijmakers JH, Harris CC. The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev.* 1996c;10:1219-32.

Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 1998;17:5708-17.

Wang Z, Zhou J, Ju Y, Zhang H, Liu M, Li X. Effects of two saponins extracted from the polygonatum Zanolanscianense pamp on the human leukemia (HL-60) cells. *Biol Pharm Bull.* 2001;24:159-62.

Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet.* 1998;19:175-8.

White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell K, Steller H. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science.* 1994;264:677-83.

Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem.* 2001;276:48404-9.

Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet.* 2000;355:646-8.

Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature.* 1994;370:270-5.

Wong E, DeLuca C, Boily C, Charleson S, Cromlish W, Denis D, Kargman S, Kennedy BP, Ouellet M, Skorey K, O'Neill GP, Vickers PJ, Riendeau D. Characterization of autocrine inducible prostaglandin H synthase-2 (PGHS-2) in human osteosarcoma cells. *Inflamm Res.* 1997;46:51-9.

Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Tang ZH, Wang JH. Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via prostaglandin E2 pathway in human cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol.* 2003;9:1302-6.

Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest.* 1996;98:1107-13.

X

Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, Tawa P, Ruel R, Rosen A, Nicholson DW. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J.* 1999;18:2049-56.

Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, Sohn J, Krishnan B, Lewis DE, Yoffe B. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology.* 2002;36:592-601.

Xie S, Wang Q, Wu H, Cogswell J, Lu L, Jhanwar-Uniyal M, Dai W. Reactive oxygen species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3. *J Biol Chem.* 2001;276:36194-9.

Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs.* 2002;13:127-37.

Y

Yamaguchi A, Tazuma S, Ochi H, Chayama K. Choleric action of diosgenin is based upon the increases in canalicular membrane fluidity and transporter activity mediating bile acid independent bile flow. *Hepatol Res.* 2003;25:287-295.

Yamakawa-Karakida N, Sugita K, Inukai T, Goi K, Nakamura M, Uno K, Sato H, Kagami K, Barker N, Nakazawa S. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces apoptosis of leukemia cells by down-regulating the c-myc gene expression via blockade of the Tcf-4 activity. *Cell Death Differ.* 2002;9:513-26.

Yamamoto S, Ueda N, Yokoyama C, Kaneko S, Shinjo F, Yoshimoto T, Oates JA, Brash AR, Fitzsimmons BJ, Rokach J. Dioxygenase and leukotriene A synthase activities of arachidonate 5- and 12-lipoxygenases purified from porcine leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1987;17A:55-9.

Yamamoto S, Yamamoto K, Kurobe H, Yamashita R, Yamaguchi H, Ueda N. Transcriptional regulation of fatty acid cyclooxygenases-1 and -2. *Int J Tissue React.* 1998;20:17-22.

Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2001;107:135-42.

Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem.* 1999;274:27307-14.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell.* 1998a;2:305-16.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997;275:1129-32.

Yang VW, Shields JM, Hamilton SR, Spannhake EW, Hubbard WC, Hyland LM, Robinson CR, Giardiello FM. Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 1998b;58:1750-3.

Yang WL, Addona T, Nair DG, Qi L, Ravikumar TS. Apoptosis induced by cryo-injury in human colorectal cancer cells is associated with mitochondrial dysfunction. *Int J Cancer.* 2003;103:360-9.

Yang WL, Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2001;22:1379-83.

Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol.* 2002;9:680-4.

Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature.* 1998;396:77-80.

Yokota O, Terada S, Ishizu H, Ishihara T, Ujike H, Nakashima H, Nakashima Y, Kugo A, Checler F, Kuroda S. Cyclooxygenase-2 in the hippocampus is up-regulated in Alzheimer's disease but not in variant Alzheimer's disease with cotton wool plaques in humans. *Neurosci Lett.* 2003;343:175-9.

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem.* 2001;276:13935-40.

Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2000;20:6755-67.

Yoshimoto T, Arakawa T, Hada T, Yamamoto S, Takahashi E. Structure and chromosomal localization of human arachidonate 12-lipoxygenase gene. *J Biol Chem.* 1992;267:24805-9.

Yoshimura R, Sano H, Masuda C, Kawamura M, Tsubouchi Y, Chargui J, Yoshimura N, Hla T, Wada S. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer.* 2000;89:589-96.

Youssef J, Badr M. Enhanced hepatocarcinogenicity due to agonists of peroxisome proliferator-activated receptors in senescent rats: role of peroxisome proliferation, cell proliferation, and apoptosis. *ScientificWorldJournal.* 2002;2:1491-500.

Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem.* 1995;270:23975-83.

Z

Zeng X, Chen L, Jost CA, Maya R, Keller D, Wang X, Kaelin WG Jr, Oren M, Chen J, Lu H. MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol.* 1999;19:3257-66.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L) *Cell.* 1996;87:619-28.

Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, Mantovani A, Rothe M, Muzio M, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 1999;274:7611-4.

Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Pawlowski K, Godzik A, Reed JC. BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:2597-602.

Zhang M, Guo R, Zhai Y, Yang D. LIGHT sensitizes IFN γ -mediated apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells leading to down-regulation of anti-apoptosis Bcl-2 family members.

Cancer Lett. 2003;195:201-10.

Zheng L, Lee WH. The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 2001;264:2-18.

Zheng L, Schickling O, Peter ME, Lenardo MJ. The death effector domain-associated factor plays distinct regulatory roles in the nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem.* 2001;276:31945-52.

Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem.* 1997;272:25500-6.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 1997;90:405-13.

Zylicz M, Wawrzynow A. Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB Life.* 2001;51:283-7.

Table des matières

SOMMAIRE	8
PUBLICATIONS ÉLABORÉES AU COURS DE LA THÈSE.....	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	11
INTRODUCTION	17
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	20
I- L' Apoptose	Erreur ! Signet non défini.
1. <i>Approches génétiques de la mort cellulaire programmée.....</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
2. <i>Rôles physiologiques de l'apoptose</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
3. <i>Aspects pathologiques de l'apoptose</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
3. 1. Les mutations germinales.....	Erreur ! Signet non défini.
3. 2. Les mutations somatiques	Erreur ! Signet non défini.
4. <i>Acteurs moléculaires majoritaires de l'apoptose.....</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
4.1. Les caspases	Erreur ! Signet non défini.
4.2. Les membres de la famille Bcl-2.....	Erreur ! Signet non défini.
5. <i>Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose.....</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
5. 1. Généralités	Erreur ! Signet non défini.
5. 2. Mécanismes d'ouverture des canaux.....	Erreur ! Signet non défini.
6. <i>Les différentes voies de l'apoptose</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
6. 1. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque.....	Erreur ! Signet non défini.
6. 2. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque	Erreur ! Signet non défini.
6. 3. La voie du réticulum endoplasmique	Erreur ! Signet non défini.
7. <i>Rôle du facteur de transcription NF-κB</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
7. 1. Activation de NF- κ B	Erreur ! Signet non défini.
7. 2. Les principaux rôles de NF- κ B	Erreur ! Signet non défini.
7. 3. Le protéasome	Erreur ! Signet non défini.
8. <i>Rôle des protéines de choc thermique ou HSP</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
II- Le cycle cellulaire.....	Erreur ! Signet non défini.
1. <i>Les différentes phases du cycle cellulaire.....</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
2. <i>Régulation du cycle cellulaire.....</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
2.1. Les complexes cyclines/CDK	Erreur ! Signet non défini.
2.2. La protéine p21	Erreur ! Signet non défini.
2.3. La protéine pRb.....	Erreur ! Signet non défini.
2.4. Rôle de la protéine p53.....	Erreur ! Signet non défini.
III- Les cyclooxygénases	78
1. <i>Métabolisme de l'acide arachidonique.....</i>	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
1.1. Les cyclooxygénases ou COX.....	Erreur ! Signet non défini.

1.2. Les lipoxygénases ou LO	Erreur ! Signet non défini.
2. <i>Rôle des cyclooxygénases dans la prolifération cancéreuse et dans l'apoptose</i>	Erreur ! Signet non défini.
2. 1. Surexpression de COX-2 dans les cellules cancéreuses.....	Erreur ! Signet non défini.
2. 2. Induction de COX-2 et rôle de la PGE ₂ dans les cellules cancéreuses...	Erreur ! Signet non défini.
2. 3. Rôle de COX-2 dans les maladies neurodégénératives	Erreur ! Signet non défini.
2. 4. Effet de l'inhibition de l'expression de COX-2 par les AINS.....	Erreur ! Signet non défini.
2. 5. PPARs et COX-2.....	Erreur ! Signet non défini.
IV- Les stéroïdes végétaux	Erreur ! Signet non défini.
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	109
I- Lignées cellulaires, culture et traitements	110
II-Etude de la croissance par le test au MTT	111
III-Extraction et amplification des ARNs	112
1. <i>Extraction des ARNs totaux</i>	112
2. <i>Transcription réverse</i>	112
3. <i>Réaction de polymérisation en chaîne</i>	113
IV- Analyse de l'expression des protéines.....	115
1. <i>Western blotting</i>	115
1.1 Extraction des protéines totales.....	115
1.2. Extraction des protéines cytosoliques, mitochondriales et nucléaires.....	115
1.3. Analyses de l'expression des protéines (totales, cytosoliques, mitochondriales et nucléaires).....	116
2. <i>Immunohistochimie de p53-phosphorylée et du fragment de 85 kDa de PARP</i>	117
V-Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en Flux.....	118
VI-Analyse quantitative de l'apoptose.....	118
VII-Etude du potentiel membranaire mitochondrial	120
VIII-Dosage des activités caspases-3, -8 et -9	120
IX-Dosage de l'ATP	121
X-Transformation bactérienne et transfection cellulaire.....	121
1. <i>Transformation bactérienne</i>	121
2. <i>Création de souchiers</i>	122
3. <i>Amplification et purification de l'ADN plasmidique</i>	122
4. <i>Transfection cellulaire transitoire par les plasmides pGL3-NF-κB-Luc/pCMV-β-gal ou pGL3-ACO-PPRE-Luc/pCMV-β-gal</i>	123
5. <i>Préparation des lysats cellulaires</i>	124
6. <i>Dosage de l'activité luciférase</i>	124
7. <i>Dosage de l'activité β-galactosidase</i>	124
XI-Préparation des extraits nucléaires et étude de l'activation de NF- κ B et PPAR par des analyses de retard sur gel.....	125
1. <i>Préparation des extraits nucléaires</i>	125
2. <i>Analyse de retard sur gel</i>	125

2.1. Hybridation des sondes monocaténares	126
2.2. Marquage radioactif des sondes hybridées.....	126
2.3. Purification.....	126
2.4. Réaction de fixation	127
XII-Etude de l'activité COX-2 par dosage de la PGE ₂	127
XIII-Utilisation du modèle 1547/diosgénine en SdFFF.....	129
1. Principe de la SdFFF (« sedimentation field flow fractionation »).....	129
2. Traitement des cellules 1547.....	130
3. Détection de l'apoptose	130
3.1. Microscopie optique.....	130
3.2. Dosage de la fragmentation de l'ADN	130
3.3. Marquage des cellules au DAPI.....	130
4. SdFFF et détermination du diamètre des cellules	131
XIV-Statistiques	131
RÉSULTATS	132
I- Effets de la diosgénine, de l'hécogénine et de la tigogénine sur les cellules 1547	133
1. Prolifération cellulaire	134
1. 1. Etude de la prolifération cellulaire par le MTT.....	134
1. 2. Observation des cellules en microscopie optique.....	136
2. Etude du cycle cellulaire et étude de l'expression de p21 et p53.....	137
2. 1. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	137
2. 2. Etude de quelques régulateurs du cycle cellulaire.....	139
3. Induction de l'apoptose ; analyse de la fragmentation de l'ADN.....	142
4. Implication de la voie mitochondriale	143
4. 1. Etude de l'expression de Bax et Bcl-2	143
4. 2. Analyse de la chute de potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)	145
4. 3. Analyse de la quantité d'ATP dans les cellules après traitement par les stéroïdes.....	146
4. 4. Etude de la redistribution subcellulaire du cytochrome c.....	148
4. 5. Localisation nucléaire de l'AIF.....	148
4. 6. Activation des caspases après traitement des cellules par les stéroïdes	149
4. 7. Etude du clivage de PARP après traitement des cellules par les stéroïdes.....	152
4. 8. Implication de Bid dans l'apoptose induite dans les cellules 1547 par les stéroïdes.....	153
5. Expression et activité cyclooxygénase	153
6. Rôle de NF- κ B et des PPARs dans l'apoptose induite par les stéroïdes	156
6. 1. Rôle de NF- κ B	156
6. 2. Rôle des PPARs	158
7. Utilisation du modèle 1547/diosgénine en SdFFF.....	160
II- Effets de la diosgénine sur deux autres types cellulaires : les cellules HEp-2 et M4Beu	165
1. Prolifération cellulaire	165
1. 1. Etude de la prolifération cellulaire par le MTT.....	165

1. 2. Observation des cellules en microscopie optique.....	166
2. <i>Etude du cycle cellulaire et étude de l'expression de p21 et p53</i>	167
2. 1. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux	167
2. 2. Etude de certains régulateurs du cycle cellulaire.....	169
3. <i>Induction de l'apoptose ; analyse de la fragmentation de l'ADN</i>	172
4. <i>Implication de la voie mitochondriale</i>	173
4. 1. Etude de l'expression de Bcl-2 et Bax	173
4. 2. Analyse de la chute de potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)	175
4. 3. Analyse de la quantité d'ATP	176
4. 4. Etude de la redistribution subcellulaire du cytochrome c.....	176
4. 5. Localisation nucléaire de l'AIF.....	177
4. 6. Activation des caspases après traitement des cellules par la diosgénine	178
4. 7. Etude du clivage de PARP après traitement des cellules par la diosgénine	181
4. 7. Implication de Bid dans l'apoptose induite par la diosgénine	182
5. <i>Expression et activité cyclooxygénase</i>	182
DISCUSSION	185
CONCLUSION	202
BIBLIOGRAPHIE	205
TABLE DES MATIÈRES	242
LISTE DES TABLEAUX	246
LISTE DES FIGURES	247
ANNEXES	250

Liste des tableaux

INTRODUCTION	17
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	20
MATÉRIELS ET MÉTHODES	109
Tableau MI : Caractéristiques des PCR	114
RÉSULTATS	132
Tableau RI-1 : Effets de l'hécogénine et de la tigogénine à 40 µM sur le cycle cellulaire des cellules 1547	139
Tableau RI-2 : Induction de la fragmentation de l'ADN (ratio apoptotique) dans les cellules 1547 après traitement par les trois stéroïdes à 40 µM.	143
Tableau RII-1 : Induction de la fragmentation de l'ADN (ratio apoptotique) dans les cellules HEP-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine à 40 µM.....	173
DISCUSSION	185
CONCLUSION	202

Liste des figures

INTRODUCTION	17
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	20
Fig. 1 : Activation des caspases	27
Fig. 2 : Les membres de la famille Bcl-2.....	Erreur ! Signet non défini.
Fig. 3 : Mécanismes d'ouverture des canaux expliquant le relargage du cytochrome c	35
Fig. 4 : La voie des récepteurs de mort.....	41
Fig. 5 : La voie mitochondriale.....	46
Fig. 6 : Apoptose induite par un stress du RE.....	54
Fig. 7 : Activation et rôles de NF- κ B	57
Fig. 8 : Cycle cellulaire et régulation par les complexes cyclines/CDK.....	64
Fig. 9 : Régulation du cycle cellulaire par pRb	65
Fig. 10 : Structure de la protéine p53.....	75
Fig. 11 : Activation de p53	77
Fig. 12 : Métabolisme de l'acide arachidonique	82
Fig. 13 : Promoteur du gène COX-2 et induction du gène	86
Fig. 14 : Surexpression des COXs dans les cancers	91
Fig. 15 : Quelques voies d'induction de COX-2 dans les cancers	94
Fig. 16 : Rôle de COX-2 dans la carcinogénèse et l'apoptose.....	96
Fig. 17 : Induction et rôle des PPARs.....	101
Fig. 18 : Boucle de régulation COX-2/PPAR.....	104
Fig. 19 : Structure des trois stéroïdes végétaux étudiés : diosgénine, hécogénine, tigogénine.....	Erreur ! Signet non défini.
MATÉRIELS ET MÉTHODES	109
RÉSULTATS	132
Figure RI-1 : Effets de la diosgénine sur la prolifération des cellules 1547.	135
Figure RI-2 : Effets de l'hécogénine et de la tigogénine sur la prolifération des cellules 1547.....	135
Figure RI-3 : Observation en microscopie optique des cellules 1547 traitées par la diosgénine, l'hécogénine et la tigogénine à 40 μ M pendant 24 h (grossissement \times 400).....	136
Figure RI-4 : Effets de la diosgénine sur la distribution des cellules 1547 dans le cycle cellulaire.	138
Figure RI-5 : Expression de l'ARNm (A) et de la protéine p21 (B) dans les cellules 1547 après traitement par les trois stéroïdes (diosgénine, hécogénine, tigogénine)..	140
Figure RI-6 : Expression de l'ARNm (A) et de la protéine p53 (B) dans les cellules 1547 après traitement par les trois stéroïdes (diosgénine, hécogénine, tigogénine)..	141
Figure RI-7 : Expression de p53 phosphorylée sur la sérine 392 dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine..	142
Figure RI-8 : Analyse de l'expression des ARNm bax et bcl-2 dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'hécogénine ou la tigogénine..	144

Figure RI-9 : Analyse de l'expression des protéines Bax et Bcl-2 dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'héogénine ou la tigogénine..	145
Figure RI-10 : Chute du $\Delta\Psi_m$ dans les cellules 1547 après 24 h de traitement par la diosgénine.	146
Figure RI-11 : Analyse de la production d'ATP dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'héogénine ou la tigogénine..	147
Figure RI-12 : Etude du relargage du cytochrome c dans les cellules 1547 après 6 h de traitement par la diosgénine..	148
Figure RI-13 : Localisation de l'AIF dans les cellules 1547 après 6 h de traitement par la diosgénine..	149
Figure RI-14 : Analyse des ARNm des caspases-3, -8 et -9 après traitement des cellules 1547 par la diosgénine, l'héogénine et la tigogénine.	150
Figure RI-15 : Analyse des activités des caspases-3, -8 et -9 après traitement des cellules 1547 par la diosgénine, l'héogénine et la tigogénine..	151
Figure RI-16 : Analyse du clivage de PARP dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'héogénine ou la tigogénine..	152
Figure RI-17 : Analyse du clivage de Bid dans les cellules 1547 après traitement par la diosgénine, l'héogénine ou la tigogénine..	153
Figure RI-18 : Effet des stéroïdes sur l'expression des COXs dans les cellules 1547.....	154
Figure RI-19 : Effet des stéroïdes sur l'activité des COXs dans les cellules 1547..	155
Figure RI-20 : Induction de NF- κ B dans les cellules 1547..	156
Figure RI-21 : Induction de NF- κ B dans les cellules 1547 traitées par les stéroïdes..	157
Figure RI-22 : Expression des ARNm et des protéines PPAR α et PPAR γ dans les cellules 1547 traitées par la diosgénine, l'héogénine et la tigogénine.....	159
Figure RI-23 : Etude de la transactivation de PPAR γ dans les cellules 1547.....	160
Figure RI-24 : Observation en microscopie optique des cellules 1547.....	161
Figure RI-25 : Fractogrammes des cellules 1547 obtenus après SdFFF.....	162
Figure RI-26 : Fractogrammes des cellules 1547 obtenus après SdFFF.....	163
Figure RI-27 : Variation du diamètre des cellules 1547 au cours de l'apoptose.....	164
Figure RII-1 : Effets de la diosgénine sur la prolifération des cellules HEp-2 et M4Beu.	166
Figure RII-2 : Observation en microscopie optique des cellules HEp-2 et M4Beu traitées par la diosgénine à 40 μ M pendant 24 h.....	167
Figure RII-3 : Effets de la diosgénine sur la distribution des cellules HEp-2 dans le cycle cellulaire..	168
Figure RII-4 : Effets de la diosgénine sur la distribution des cellules M4Beu dans le cycle cellulaire..	169
Figure RII-5 : Expression de l'ARNm et de la protéine p21 dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine..	170
Figure RII-6 : Expression de l'ARNm et de la protéine p53 dans les cellules HEp-2 après traitement par la diosgénine..	171
Figure RII-7 : Expression de l'ARNm et de la protéine p53 dans les cellules M4Beu après traitement par la diosgénine..	172
Figure RII-8 : Analyse des expressions de Bax et Bcl-2 dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine..	174
Figure RII-9 : Etude du $\Delta\Psi_m$ dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine.....	175

Figure RII-10 : Analyse de la production d'ATP dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine.	176
Figure RII-11 : Etude du relargage du cytochrome c dans les cellules HEp-2 et M4Beu après 6 h de traitement par la diosgénine.	177
Figure RII-12 : Localisation de l'AIF dans les cellules HEp-2 et M4Beu après 6 h de traitement par la diosgénine..	178
Figure RII-13 : Analyse des ARNm des caspases-8, -9 et -3 après traitement des cellules HEp-2 et M4Beu par la diosgénine..	179
Figure RII-14 : Analyse des activités des caspases-8, -9 et -3 après traitement des cellules HEp-2 et M4Beu par la diosgénine.....	180
Figure RII-15 : Analyse du clivage de PARP dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine..	181
Figure RII-16 : Analyse du clivage de Bid dans les cellules HEp-2 et M4Beu après traitement par la diosgénine..	182
Figure RII-17 : Effet de la diosgénine sur l'expression des COXs dans les cellules HEp-2 et M4Beu.....	183
Figure RII-18 : Effet de la diosgénine sur la production de PGE ₂ dans les cellules HEp-2 et M4Beu.	184
DISCUSSION.....	185
CONCLUSION.....	202

Annexes

Annexe 1

Annexe 2

Annexe 3

Annexe 4

Annexe 5

Résumé

L'apoptose est un mécanisme physiologique jouant un rôle important dans le développement de tout organisme vivant, mais il est défectueux dans de nombreuses pathologies comme les cancers. Dans notre étude, nous comparons l'effet anti-prolifératif de trois stéroïdes végétaux de structure proche - diosgénine, hécogénine, tigogénine – sur la lignée 1547 d'ostéosarcome humain. Nos résultats montrent que la diosgénine provoque une forte inhibition de la prolifération cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire et une forte apoptose, contrairement à l'hécogénine et la tigogénine qui induisent uniquement une faible apoptose. L'apoptose induite par ces trois stéroïdes est dépendante de NF- κ B.

La diosgénine étant la molécule la plus active, nous avons poursuivi son étude sur les lignées humaines HEp-2 (laryngocarcinome) et M4Beu (mélanome). La diosgénine induit, comme dans les cellules 1547, une forte inhibition de la prolifération des deux types cellulaires en bloquant le cycle cellulaire et en induisant l'apoptose. Dans les trois lignées cellulaires, ce stéroïde altère la mitochondrie, active p53 et les caspases-8, -9 et -3 sans induire le relargage du cytochrome c ou le clivage de Bid. En fonction du type cellulaire, la diosgénine provoque l'augmentation de l'expression de Bax, la chute du potentiel membranaire mitochondrial, la libération de l'AIF, la diminution de l'ATP intracellulaire ou le clivage de PARP. En revanche, quel que soit le type cellulaire et contrairement à ce qui est connu, l'expression et l'activité de COX-2 sont fortement augmentées lors de l'apoptose induite par la diosgénine.

Mots clés : diosgénine, hécogénine, tigogénine, 1547, HEp-2, M4Beu, cycle cellulaire, p53, apoptose, mitochondrie, caspases, NF- κ B, cyclooxygénase-2.

Abstract

“Anti-proliferative effect of the three plant steroid (diosgenin, hecogenin, tigogenin) on the human 1547 cell line. Mitochondria and cyclooxygenase-2 involvement in diosgenin-induced apoptosis in the human cell lines 1547, HEp-2 (laryngocarcinoma) and M4Beu (melanoma).”

Apoptosis plays an important role in normal development and is impaired in many types of cancer. In our study, we compared antiproliferative effect of three structurally close plant steroids—diosgenin, hecogenin and tigogenin – on the human osteosarcoma 1547 cell line. Our results showed that among the three steroid, diosgenin was the most effective in inhibiting proliferation. Indeed, diosgenin blocked the cell cycle and induced apoptosis whereas hecogenin and tigogenin only induced apoptosis. Cell death induced by these steroids is NF- κ B dependent but did not involve the nuclear receptor PPAR.

Since diosgenin led to an important inhibition of 1547 cell proliferation, we studied its effect on two other human cancer cell lines : HEp-2 (laryngocarcinoma) and M4Beu (melanoma). As in 1547 cells, diosgenin inhibited proliferation of both cell lines by inducing cell cycle arrest and apoptosis. In 1547, HEp-2 and M4Beu cells, diosgenin altered mitochondria, activated p53 and caspases-8, -9 and -3 but did not involve cytochrome c release or Bid cleavage. Apoptosis induced by diosgenin in HEp-2 and M4Beu cells also involved the caspase-independent factor AIF. Increased Bax expression, a fall in $\Delta\Psi_m$, decreased ATP or PARP cleavage were cell line specific. But, whatever the cell line, diosgenin increased cyclooxygenase-2 expression and activity.

Keywords : diosgenin, hecogenin, tigogenin, 1547, HEp-2, M4Beu, cell cycle, p53, apoptosis, mitochondria, caspases, NF- κ B, cyclooxygenase-2.