

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

Institut Sciences de la Vie Santé

FACULTE de Pharmacie

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire

Année : 2006

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

David LEGER

le 22 septembre 2006

Etude des voies de signalisation cellulaire au cours
de l'apoptose et de la différenciation
mégacaryocytaire induites par la diosgénine dans la
lignée érythroleucémique humaine HEL.

Rôle anti-apoptotique du léflunomide et voies de transduction
du signal activées dans des lignées leucémiques humaines.

Thèse dirigée par M. le Professeur Jean-Louis BENEYTOU

JURY :

Rapporteurs

Mme le Docteur I. DUSANTER-FOURT

M. le Professeur M. LAGARDE

Examineurs

M. le Professeur J-L BENEYTOU

Mme le Professeur G. DURAND

M. le Docteur B. LIAGRE

M. le Docteur S. BATTU

A Monsieur le Professeur BENEYTOU

Professeur des Universités de Biochimie et Biologie Moléculaire
Faculté de Pharmacie de Limoges
UPRES EA 4021 Biomolécules et Thérapies anti-tumorales
Directeur de Thèse

Recevez, Monsieur Beneytout, mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Je tiens également à vous exprimer toute ma reconnaissance pour ces trois années de thèse que j'ai passées à vos côtés. Au cours de ces années, votre grande disponibilité, votre rigueur scientifique, votre enthousiasme et vos précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. La confiance que vous m'avez accordée ainsi que nos nombreuses discussions m'ont permis de progresser et de mieux appréhender les différentes facettes du métier d'enseignant-chercheur. Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et de mon profond respect.

A Madame le Professeur DURAND

Professeur des Universités 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 participer à ce jury de Thèse. Soyez assurée, Madame, de mon plus profond respect.

A Madame le Docteur Isabelle DUSANTER-FOURT

Directeur de Recherche Unité INSERM U567
Département d'Hématologie
Hôpital Cochin / Maternité Port-Royal 75014 Paris

Je suis très touché 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 sincères remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assurée, Madame, de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Michel LAGARDE

Directeur de l'unité INSERM U585, Laboratoire de
Physiopathologie des lipides et des membranes
69621 Villeurbanne

Mes remerciements les plus respectueux vont à Monsieur le Professeur Lagarde 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 Pierre DESCHAUX

Professeur des Universités de Physiologie Animale
Faculté des Sciences de Limoges

J'adresse toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Pierre Deschaux pour sa disponibilité et pour ses précieux conseils qui m'ont guidés au cours de mes études. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères ainsi que la marque de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Gérard HABRIOUX

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

Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour m'avoir accueilli 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

Je tiens à te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi pendant mon stage de maîtrise, puis mon DEA, puis ma thèse. Tu m'as tout d'abord enseigné les techniques de biologie cellulaire et biologie moléculaire que tu connais. C'est à cette occasion que j'ai pu apprécier ta rigueur scientifique mais aussi ton humour. Par la suite nos relations ont évolué vers une amitié sincère et je tiens à te remercier également pour les moments que nous avons vécu en dehors du labo. Je tiens enfin à te remercier pour ton implication dans ce travail de thèse, pour ton aide, ta disponibilité, tes nombreux conseils et ton soutien sans faille. Sois assuré, Bertrand, de tout mon respect, de ma profonde gratitude 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 tiens à te témoigner toute ma reconnaissance pour le travail que nous avons réalisé en commun et pour la confiance que tu m'as accordée. Je te remercie également pour tous ces bons moments passés en dehors de la faculté et pour ton enthousiasme et ta bonne humeur. Je suis très heureux que tu fasses partie de ce jury de thèse. Sois assuré de mon profond respect et de mon amitié sincère.

A Mademoiselle le Maître de Conférences Cécile CORBIERE

Maître de Conférences en Biochimie et Biologie Moléculaire
Faculté de Pharmacie de Rouen

Je tenais à te remercier pour ton accueil et ton implication dès mon stage de maîtrise dans mon apprentissage de la recherche. Les nombreuses choses que j'ai apprises à ton contact ont facilité le déroulement de ma thèse tant d'un point de vue pratique qu'au moment de la rédaction. Je te remercie également pour tes nombreux conseils amicaux et avisés et pour tous ces bons moments passés en dehors du labo. Sois assurée, Cécile, de mon profond respect et de toute mon amitié.

A Madame le Maître de Conférences Chantal JAYAT-VIGNOLES

Maître de Conférences en biologie cellulaire
Faculté des Sciences de Limoges

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 Madame le Maître de Conférences Pascale VERGNE-SALLE

Maître de Conférences en Rhumatologie, Praticien hospitalier
Faculté de Médecine de Limoges

Je vous exprime ma gratitude pour notre collaboration et pour la sympathie que vous m'avez témoignée au cours de mes trois années de thèse. Soyez assurée de mon profond respect.

Au Professeur Jean Feuillard et au service d'Hématologie du CHRU de Limoges

J'ai toujours été accueilli 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 intérêt dans le travail présenté ici.

A Monsieur le Professeur Philippe Cardot
Professeur en Chimie Analytique et Bromatologie
Faculté de Pharmacie de Limoges

Je tiens à vous remercier pour la saine collaboration que vous avez su entretenir avec le laboratoire de Biochimie. Soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur Julian BERTRAND

Je t'exprime toute ma reconnaissance pour notre collaboration scientifique et « footballistique ». Sois assuré, Julian, de toute mon amitié.

A Madame Gaëlle BEGAUD-GRIMAUD

En souvenir de nos nombreuses discussions de couloir et en remerciement du soutien que tu m'as apporté. Je suis convaincu de l'accomplissement de tes projets personnels et professionnels. Sois assuré de ma sincère amitié.

A Virginie, Pierre-Olivier, Yves, Aurélie, Laurent, Ludovic

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.

Virginie, PO et Yves, ce que je viens de dire s'applique tout particulièrement à vous puisque vous êtes mes « anciens » et que le respect que j'étais censé vous témoigner c'est rapidement transformé en amitié sincère.

Aurélie, Laurent et Ludovic, c'est moi qui suis votre « ancien » mais au respect que vous étiez censé me témoigner, je préfère les relations amicales que nous entretenons.

A mes amis de toujours

Thomas, Florian, Yann, Alexandre, Pierre, Arnaud, Pascal et Fabien pour tous ces grands moments passés ensemble et pour nos week-ends de « décompression ».

Aux membres de l'équipe Biomolécules

Je voudrais adresser un remerciement particulier à tous les membres de l'équipe Biomolécules pour l'ambiance chaleureuse de travail qu'ils maintiennent au quotidien. Je pense particulièrement au laboratoire de biophysique du Pr J-L Duroux dans lequel l'on est toujours bien accueilli et je tiens à assurer Claude et Patrick de toute mon amitié. Merci également à tous les étudiants et personnes des Facultés de Pharmacie et de Médecine qui m'ont aidé et soutenu.

A mes grands-parents

A mes parents

A mon frère

SOMMAIRE

Sommaire.....	7
Publications élaborées au cours de la thèse	9
Liste des abréviations	11
INTRODUCTION.....	16
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I- Les cancers	20
II- Le cycle cellulaire	29
III. Apoptose	36
IV- La thérapie de différenciation.....	62
V- La mégacaryocytopoïèse	68
VI- Transduction du signal	92
VII- Les stéroïdes végétaux	108
VIII- Le métabolisme de l'acide arachidonique	111
IX- Le Léflunomide	121
MATERIELS ET METHODES	123
I- Lignées cellulaires, culture et traitements	124
II- Etude de la prolifération des cellules leucémiques.....	125
III- Analyse de la quantité d'ADN (niveau de ploïdie) par cytométrie en flux	127
IV- Analyse de l'expression des protéines par Western Blot.....	128
V- Etude du potentiel membranaire mitochondrial	130
VI- Etude de l'activation de la caspase-3.....	131
VII- Etude de l'exposition de la phosphatidylsérine au cours de l'apoptose	132

VIII- Analyse qualitative de la fragmentation de l'ADN	133
IX- Mesure de la concentration en calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$	134
X- Suivi spécifique de la différenciation mégacaryocytaire	135
XI- Analyse de l'activation des MAP Kinases	137
XII- Préparation des extraits nucléaires et étude de l'activation de NF- κ B par des analyses de retard sur gel.....	139
XIII- Etude de l'activité COX-2 par dosage de la PGE2	141
XIV- Analyse de l'expression des ARNm de certains marqueurs de différenciation mégacaryocytaire.....	142
XV- Utilisation du modèle HEL/diosgénine en SdFFF	144
XIV-Statistiques	149
RÉSULTATS	150
I- Effets pro-apoptotiques de la diosgénine sur les cellules HEL	152
II- Effets pro-différenciants de la diosgénine sur les cellules HEL	174
III- Modulation par le léflunomide de l'apoptose induite dans les cellules érythroleucémiques HEL et K562	209
DISCUSSION.....	239
I- Effets de la diosgénine sur les cellules HEL	240
II- Effets du léflunomide sur la prolifération et la survie de cellules leucémiques traitées par différents inducteurs de mort.....	255
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	261
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	266
Table des Matières	302
ANNEXES	313

PUBLICATIONS ÉLABORÉES AU COURS DE LA THÈSE

LEGER DY, LIAGRE B, BENEYTOUT JL.

Low dose leflunomide activates PI3K/Akt signalling in erythroleukemia cells and reduces apoptosis induced by anticancer agents.

Apoptosis 2006 sous presse.

LEGER DY, BATTU S, LIAGRE B, BENEYTOUT JL, CARDOT PJ.

Megakaryocyte cell sorting from diosgenin-differentiated human erythroleukemia cells by sedimentation field-flow fractionation.

Anal Biochem. 2006; 355:19-28

LEGER DY, LIAGRE B, BENEYTOUT JL.

Role of MAPKs and NF-kappaB in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation and subsequent apoptosis in HEL cells.

Int J Oncol. 2006; 28:201-7.

LIAGRE B, BERTRAND J, LEGER DY, BENEYTOUT JL.

Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in COX-2 deficient K562 cells with activation of the p38 MAP kinase signalling and inhibition of NF-kappaB binding.

Int J Mol Med. 2005; 16:1095-101.

**VERGNE-SALLE P, LEGER DY, BERTIN P, TREVES R, BENEYTOUT JL,
LIAGRE B.**

Effects of the active metabolite of leflunomide, A77 1726, on cytokine release and the MAPK signalling pathway in human rheumatoid arthritis synoviocytes.

Cytokine. 2005; 31:335-48.

LEGER DY, LIAGRE B, CARDOT PJ, BENEYTOUT JL, BATTU S.

Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in human erythroleukemia cell line and sedimentation field-flow fractionation monitoring.

Anal Biochem. 2004; 335:267-78.

LEGER DY, LIAGRE B, CORBIERE C, COOK-MOREAU J, BENEYTOUT JL.

Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HEL cells with increase in intracellular calcium level, activation of cPLA2 and COX-2 overexpression.

Int J Oncol. 2004; 25:555-62.

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 »
 AM : groupement ester d'acétométhoxyl
 ANT : transporteur de nucléotide adénylique
 Apaf-1 : « Apoptotic protease-activating factor-1 »
 APL : « acute promyelocytic leukemia »
 Ara-C : cytarabine
 ARN : acide ribonucléique
 As₂O₃ : arsenic trioxyde
 ATCC : American Type Culture Collection
 ATP : adénosine triphosphate
 ATRA : « all-trans-retinoic acid »

B

Bcl-2 : « B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins »
 BFU : « Burst Forming Unit »
 BFU-E : « Burst Forming Unit-Erythroid »
 BFU-MK : « Burst Forming Unit-Megakaryocytic »
 BH : « Bcl-2 homology »
 BIR : « baculoviral IAP repeat »
 BSA : albumine sérique bovine

C

[Ca²⁺]_i : concentration de calcium intracellulaire
 CAD : « caspase activated-DNase »
 CAK : « CDK-activating kinase »
 CARD : « caspase recrutement domain »
 Caspase : « cysteinyl-aspartate-cleaving proteases »
 CD : « Cluster of differentiation »
 CDC : « Cell Division Cycle »
 CDK : « Cyclin dependent kinase »
 CFU : « Colony Forming Unit »
 CFU-E : « Colony Forming Unit-Erythroid »
 CFU-Eo : « Colony Forming Unit-Eosinophil »
 CFU-G : « Colony Forming Unit-Granulocyte »
 CFU-GEMM : « Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte »
 CFU-GM : « Colony Forming Unit Granulocyte, Macrophage »
 CFU-Mast : « Colony Forming Unit-Mast cell »

CFU-MK : « Colony Forming Unit-Megakaryocyte »
 CHOP : « C/EBP homologous protein »
 CKI : « CDK inhibitor »
 COX : cyclooxygénase
 cPLA₂ : PLA₂ cytosolique
 CRE : « Cyclic-AMP responsive element »
 CREB : « Cyclic-AMP regulatory binding protein »
 CSH : cellule souche hématopoïétique
 Cyt c : Cytochrome c

D

DD : « Death Domain »
 DED : « death effector domain »
 DFF : « DNA fragmentation domain »
 DHODH : dihydroorotate déshydrogénase
 DIABLO : « Direct IAP Binding protein with Low pl »
 DIG : Digoxigénine
 Dios : Diosgénine
 DISC : « Death-inducing Signaling Complex »
 DMARD : « Disease Modifying AntiRheumatic Drug »
 DMSO : diméthylsulfoxyde
 $\Delta\psi_m$: potentiel membranaire mitochondrial

E

EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique
 EIA : « Enzyme ImmunoAssay »
 ELISA : « Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay »
 endo G : endonucléase G
 EPO : érythropoïétine
 ERK : « extracellular signal-regulated kinase »
 ER α : « estrogen receptor α »
 ETE : acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque

F

F(1,2,3,4) : Fractions 1,2,3,4
 FADD : « Fas-associated death domain »
 FFF : « Field Flow Fractionation »
 FITC : isothiocyanate de fluorescéine
 FLAP : « five-lipoxygenase-activating-protein »
 FLIP : « Flice inhibitory protein »
 FOG-1 : « Friend of GATA-1 »

G

GAPDH : glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
 GM-CSF : « Granulocyte Macrophage – Colony stimulating factor »
 Gp : glycoprotéine

H

HDAC : histones déacétylases
 HEL : « Human Erythroleukemia »
 HEPES : N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonique]
 HETE : acide hydroxyeicosatétraénoïque
 HIF-1 α : « Hypoxia Induced Factor-1 α »
 HO-Urée : hydroxyurée
 HPETE : acide hydroxyperoxyeicosatétraénoïque
 HPODE : acide hydroperoxyoctadécadiénoïque
 HRP : « Horseradish peroxydase »
 3 β -HSD : 3 β -hydroxy-stéroïde déshydrogénase

I

IAP : protéines inhibitrices de l'apoptose
 ICAD : « inhibitor of CAD »
 Ig : Immunoglobuline
 IGFBP-1 : « insulin-like growth factor-binding protein-1 »
 IKK : I κ B kinase
 IL : interleukine
 Indo-1 : acide 1-[2-amino 5-(6-carboxyindol-2-yl) phénoxy] 2-(2'-amino-5' methyl phénoxy) éthane-N,N,N',N'-tétraacétique
 INF γ : interféron γ
 IP : iodure de propidium
 iPLA₂ : PLA₂ intracellulaire indépendante du calcium
 I κ B : inhibiteur de NF κ B

J

JAK : Janus Kinase
 JC-1 : 5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazole carbocyanide iodide
 JNK : c-Jun NH2-terminal kinase

L

LEF : Léflunomide
 LIF : « leukemia inhibitory factor »
 LLA : leucémie lymphoïde aigüe
 LLC : leucémie lymphoïde chronique
 LMA : leucémie myéloïde aigüe
 LMC : leucémie myéloïde chronique
 LOX : lipoxigénase
 LPS : lipopolysaccharide
 LT : leucotriène

M

MAP2K : MAP kinase kinase
 MAP3K : MAP kinase kinase kinase
 MAPK : « mitogen-activated protein kinase »
 MDA : malonaldéhyde
 MGG : May-Grunwald-Giemsa

MKK : MAP kinase kinase

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide

N

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NFκB : « nuclear factor-kappa B »

NGF : « nerve growth factor »

NIK : « NF-κB-inducing Kinase »

P

PARP : poly (ADP-ribose) polymérase

PBS : « phosphate buffer saline »

PDGF : « platelet derived growth factor »

PF4 : « platelet factor 4 »

PG : prostaglandine

PGHS : prostaglandine endoperoxyde G/H synthase

Ph : chromosome Philadelphia

PH : domaine d'homologie avec la plekstrine

PI3K : phosphatidyl inositol-3 kinase

PIAS : « protein inhibitor of activated STAT »

PKB : protéine kinase B

PKC : protéine kinase C

PLA₂ : phospholipase A₂

PLZF : « promyelocytic leukaemia zinc finger »

PMA : « phorbol 12-myristate 13-acetate »

PML : « promyelocytic leukemia »

PPAR : « peroxisome proliferator-activated receptor »

PR : polyarthrite rhumatoïde

pRb : protéine du rétinoblastome

PT : pic total

PTP : pore de transition de perméabilité

PVDF : polyvinylidène difluoride

R

RAR : récepteur de l'acide rétinoïque

RC : remission complète

RE : réticulum endoplasmique

R-PE : R-phycoérythrine

RT : transcription reverse

RXR : récepteurs de l'acide rétinoïque 9-cis

S

SAPK : « stress-activated protein kinase »

SCF : « stem cell factor »

SDF-1 : « stromal cell-derived factor-1 »

SdFFF : « sedimentation field flow fractionation »

SDS : sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : « SDS-polyacrylamide gel electrophoresis »

SH2 : domaine « Src-homology 2 »

SHP : « SH2-domain containing phosphatase »
 SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
 SIMPs : « soluble inter membrane mitochondrial proteins »
 Smac : « Second Mitochondria-derived Activator of Caspase »
 SOCS : « Suppressor of cytokine signaling »
 sPLA₂ : PLA₂ sécrétée
 STAT : « Signal Transducer and Activator of Transcription »
 SVF : sérum de veau fœtal

T

TBE : Tris-Borate-Acétate
 tBid : Bid tronqué
 TLDA : « TaqMan[®] Low-Density Array »
 TNF : « tumor necrosis factor »
 TNFR : récepteur au TNF
 TPA : « phorbol 12-myristate 13-acetate »
 TPO : thrombopoïétine
 TRADD : « TNF-R-associated death domain »
 TRAIL : « tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand »
 TX : thromboxane

V

VDAC : canal anionique voltage-dépendant
 VDR : récepteur à la vitamine D
 VDRE : élément de réponse au VDR
 VEGF : « vascular endothelial growth factor »
 VIH : virus de l'immunodéficience humaine
 vWF : facteur von Willebrand

X

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

INTRODUCTION

Il existe à ce jour deux stratégies principales pour stopper ou freiner la prolifération des cellules leucémiques. La première de ces stratégies est d'activer dans les cellules leucémiques le processus de mort cellulaire programmée ou apoptose. De nombreuses molécules naturelles ou synthétiques ont démontré leur pouvoir pro-apoptotique. La seconde vise à réactiver les processus de différenciation hématopoïétique qui ont été arrêtés au cours de la transformation leucémique. Cette deuxième stratégie présente l'avantage d'être moins toxique pour l'organisme.

La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques capables de stopper la prolifération tumorale constitue l'un des principaux thèmes de recherche en cancérologie. Ces molécules qu'elles soient naturelles ou synthétiques sont généralement sélectionnées pour leurs effets anti-prolifératifs sur des lignées cancéreuses en culture. Dans cette perspective, nous avons étudié l'effet de la diosgénine sur la prolifération des cellules érythroleucémiques humaines HEL.

La diosgénine est un stéroïde végétal qui possède de nombreuses propriétés biologiques sur des cellules cancéreuses en culture. Des travaux précédents réalisés au sein du laboratoire ont permis de montrer que la diosgénine possède un pouvoir anti-prolifératif et pro-apoptotique sur des lignées cancéreuses humaines mais est également capable d'induire la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL.

Après avoir présenté une étude bibliographique concernant les processus de régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la différenciation mégacaryocytaire, nous décrirons également les voies de transduction du signal impliquées dans différents événements cellulaires dont l'induction de l'apoptose et de la différenciation. Nous évoquerons également le rôle de la cyclooxygénase-2 dans l'organisme et au cours des processus de cancérisation. Enfin, nous présenterons les deux principales molécules utilisées dans notre étude : la diosgénine et le léflunomide.

Les travaux présentés se sont attachés à décrire l'effet pro-apoptotique et l'effet pro-différenciant de la diosgénine sur la lignée HEL. En effet, la diosgénine utilisée à une dose de 40 μM induit l'apoptose des cellules HEL. A 10 μM , la même molécule induit la différenciation mégacaryocytaire de ces cellules. Les études menées avaient pour but de caractériser les acteurs moléculaires impliqués dans la différenciation et dans l'apoptose induites par la diosgénine. De plus, les effets étudiés des deux doses de diosgénine étant différents, nous nous sommes

intéressés aux voies de transduction du signal activées par la diosgénine au cours des deux phénomènes.

Par ailleurs, l'induction de l'apoptose ou de la différenciation par la diosgénine a pour conséquence des perturbations morphologiques et physico-chimiques des cellules HEL. La modification de ces paramètres au cours de l'apoptose et de la différenciation a été suivie par une méthode innovante de chimie analytique, la SdFFF, qui nous a permis de trier les cellules en fonction de l'apparition de ces modifications et d'étudier les propriétés des populations isolées.

Le rôle de la cyclooxygénase-2 dans les phénomènes d'apoptose a également été évoqué au cours de notre étude mais les travaux réalisés ont principalement conduit à l'étude de propriétés nouvelles anti-apoptotiques du léflunomide, molécule connue en tant qu'inhibiteur de l'activité de la cyclooxygénase-2. Le léflunomide active en effet la voie de survie cellulaire PI3K/Akt dans les lignées leucémiques HEL et K562 et les protège de l'apoptose induite par différents agents anti-cancéreux.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I- LES CANCERS

1. Généralités et origine

Bien que l'incidence et surtout le diagnostic de cancers augmentent régulièrement au cours des années (Tratner I 2003), il convient de rappeler que les cancers sont des maladies connues depuis l'Antiquité. En effet, Celsus (28 av. J.-C. - 50 ap. J.-C.), médecin romain, traduit le mot grec "carcinosis" en "cancer" (crabe, écrevisse) et introduit par contre, tel quel, le mot grec "carcinoma" dans le langage latin. Le terme "cancer" désignait alors plutôt des ulcères d'allure maligne avec pénétration profonde tandis que le terme "carcinoma" désignait plutôt des lésions pré-malignes et malignes de type plus superficiel.

De nos jours, le terme de cancer est attribué à un grand nombre de maladies différentes avec une étiologie et des manifestations très variées impliquant des soins et des traitements différents. L'évolution des techniques d'étude des cancers a permis d'établir que la transformation cancéreuse était caractérisée par un ensemble complexe de changements génétiques conduisant à la multiplication de certaines cellules de l'organisme, qui perdent le contrôle de leur prolifération, deviennent immortelles, échappent aux mécanismes normaux de différenciation et se développent de manière anarchique dans l'organisme.

2. Les cellules cancéreuses

Malgré la grande diversité des cancers, les cellules cancéreuses partagent des caractéristiques qui permettent de les identifier. Ces caractéristiques sont l'indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, l'abolition de la mort cellulaire programmée ou apoptose, une capacité proliférative illimitée, la capacité de susciter l'angiogenèse et l'acquisition d'un pouvoir invasif (Hanahan D et Weinberg RA 2000).

Ces particularités propres aux cellules cancéreuses sont la conséquence de l'altération du matériel génétique d'une cellule. Toutes les mutations ne sont toutefois pas susceptibles d'entraîner la formation d'un cancer. Les gènes considérés comme ayant une implication significative dans la mise en place du processus tumoral sont

les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation de l'ADN (Weinberg RA 1994, Hanahan D et Weinberg RA 2000).

Les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur coordonnent l'ensemble des réactions biochimiques du cycle cellulaire, du développement, de la prolifération et de la division des cellules ; les proto-oncogènes stimulent la croissance, tandis que les gènes suppresseurs l'inhibent (Weinberg RA 1994). La combinaison de l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur est responsable de la prolifération cellulaire incontrôlée à l'origine des cancers.

2.1. Les proto-oncogènes

Les oncogènes sont des gènes susceptibles de conférer le phénotype tumoral à une cellule eucaryote normale. Ils sont dérivés de gènes cellulaires appelés proto-oncogènes ayant subi une ou plusieurs altérations.

Les proto-oncogènes possèdent généralement des fonctions dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de la survie cellulaire (Weinberg RA 1994). L'activation des proto-oncogènes en oncogènes se fait par des événements génétiques tels que des mutations, des translocations chromosomiques ou des amplifications géniques qui induisent des gains de fonction du gène par rapport à sa forme inactive dans les cellules normales. Le gain de fonction résulte en général d'une production d'une forme hyperactive de la protéine oncogénique (forme plus active du fait de la modification du site catalytique par exemple ou protéine bloquée en forme active et qui ne peut plus être inhibée) ou d'une quantité excessive de forme normale de la protéine.

La dénomination de proto-oncogènes regroupe des gènes qui codent pour des facteurs de croissance, des récepteurs aux facteurs de croissance, des molécules intervenant dans la transduction des signaux mitotiques, des protéines kinases, des phosphatases, des molécules anti-apoptotiques ou des facteurs de transcription.

L'activation de ces oncogènes est un mécanisme dominant qui conduit à favoriser un état permissif pour la prolifération, à permettre la production par la cellule cancéreuse des facteurs de croissance dont elle a besoin ou à modifier un récepteur de telle sorte qu'il se comporte comme s'il était stimulé en permanence. Dans les deux cas, la cellule devient indépendante d'une intervention externe.

2.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes

Les gènes suppresseurs de tumeurs codent pour des protéines inhibitrices de la division cellulaire, ou régulant la différenciation post-mitotique et l'orientation irréversible vers la voie de l'apoptose. La mutation de ces gènes, liée cette fois à une perte de fonction, entraîne l'arrêt du contrôle du cycle cellulaire.

Les anti-oncogènes p53 et RB sont des gènes très fréquemment altérés dans de nombreux cas de cancers. Le gène RB code pour une protéine qui se lie à des facteurs de transcription essentiels à la progression du cycle cellulaire et les inactive. L'inactivation constitutionnelle de l'anti-oncogène RB est à l'origine des formes héréditaires de rétinoblastomes et représente également un risque génétique pour le développement d'ostéosarcomes (Issing WJ et al. 1993, Iida K et al. 2003). Le gène TP53 code pour une phosphoprotéine, p53, qui s'accumule dans le noyau en réponse à différents stress en particulier les dommages à l'ADN. La protéine p53 agit comme un régulateur de la transcription, augmentant ou diminuant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, dans l'induction de l'apoptose, dans la réparation de l'ADN et dans le contrôle de la différenciation cellulaire. Les mutations somatiques de p53 représentent l'altération moléculaire la plus fréquemment observée dans les tumeurs solides et les mutations constitutionnelles de ce gène représentent la base moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni, syndrome prédisposant à un très large spectre de tumeurs incluant en particulier des sarcomes des tissus mous, des ostéosarcomes, des tumeurs du système nerveux central, des cancers du sein et des corticosurrénales (Khayat CM et Johnston DL 2004 ; Lang GA et al. 2004).

Les cellules ayant un matériel génétique modifié auront ainsi la capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée et se diviseront de façon anarchique et indépendante de l'organisme.

2.3. Les gènes de réparation de l'ADN

La dernière catégorie de gènes majoritairement impliqués dans le développement tumoral est constituée par les gènes de réparation de l'ADN. Ceux-ci codent pour des protéines dont la fonction normale est de corriger les erreurs survenant lors de la réplication de l'ADN au cours de la division cellulaire ou d'éliminer les adduits à l'ADN induits par les cancérigènes chimiques par exemple.

Chacun des systèmes de réparation de l'ADN est donc constitué de complexes multi-protéiques qui sont chargés de repérer les séquences comprenant des erreurs et de les éliminer. L'action de ces systèmes de réparation se produit avant la transition G1/S qui constitue l'une des étapes critiques du cycle cellulaire, puisqu'il correspond au moment de la réplication de l'ADN (Kastan MB et al. 1991) et avant la mitose.

Des mutations au sein des gènes codant ces protéines peuvent aboutir à l'échec du système de réparation de l'ADN, permettant alors l'accumulation d'autres mutations dans des gènes suppresseurs de tumeur ou dans des proto-oncogènes.

3. Les leucémies

Le terme de leucémie a été proposé par le médecin allemand R. Virchow en 1845, pour désigner des maladies où le sang était constitué en grande partie d'une purée blanche (du grec leukos, blanc et haima, sang) lui donnant un aspect laiteux. Aujourd'hui, les leucémies sont caractérisées par l'accumulation ou la prolifération incontrôlée de cellules hématopoïétiques (précurseurs des cellules sanguines) dans la moelle osseuse et le sang. Elles présentent des aspects différents selon deux caractères principaux : le type de globules concernés et l'évolution, aiguë ou chronique.

En raison des divers types de cellules concernées et de l'évolution de la maladie, les leucémies sont donc définies en quatre grandes catégories:

- La leucémie myéloïde chronique (LMC)
- La leucémie lymphoïde chronique (LLC)
- La leucémie myéloïde aiguë (LMA)
- La leucémie lymphoïde aiguë (LLA)

Pour la suite de cette évocation bibliographique, ce sont les leucémies myéloïdes qui nous intéresseront particulièrement.

4. Les leucémies myéloïdes

Les leucémies myéloïdes concernent la transformation et la prolifération de précurseurs hématopoïétiques des lignées myéloïdes c'est-à-dire principalement les lignées granulocytaire et monocytaire, ainsi que parfois les lignées érythroïde et

mégacaryocytaire. On distingue deux formes de leucémies myéloïdes, une forme chronique et une forme aiguë.

4.1. Les leucémies myéloïdes chroniques (LMC)

La leucémie myéloïde chronique est un syndrome myéloprolifératif chronique traduisant une prolifération de la cellule souche hématopoïétique et caractérisé par une prolifération dominante de la lignée granuleuse. Sa fréquence représente 15% de toutes les leucémies de l'adulte (Sébahoun G 2005).

Cette maladie est la première hémopathie humaine pour laquelle une aberration acquise du caryotype a été corrélée au développement de la leucémie: il s'agit d'un chromosome 22 dont le bras long (q) est raccourci. Ce chromosome, appelé chromosome Philadelphie (Ph) est présent dans 95% des cas de LMC. Il résulte d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. Le point de cassure sur le chromosome 9 se situe en 9q34, au niveau de l'oncogène abl. Le point de cassure sur le chromosome 22 se situe en 22q11, à un niveau variable sur une région dite bcr (breakpoint cluster region) (Sébahoun G 2005).

Cette translocation conduit à la création d'un gène de fusion hybride comportant la partie 5' du bcr et la partie 3' d'abl et codant pour une protéine de fusion p210 dont les propriétés sont différentes de celles des partenaires de la fusion. La protéine de fusion p210^{BCR-ABL} présente une activité tyrosine kinase constitutive. La protéine bcr-abl active de nombreuses voies de signalisation conduisant à la leucémogénèse, parmi lesquelles les voies Ras, Stat, PI3 Kinase et Myc sont essentielles (Sébahoun G 2005). Elle confère aux cellules un avantage de croissance sans en bloquer la différenciation. D'un point de vue biologique, la phase chronique de la LMC se caractérise alors par l'expansion clonale de cellules différenciées de la lignée granuleuse porteuses du chromosome Ph. Cette prolifération provoque l'expansion du compartiment myéloïde et la suppression de l'hématopoïèse normale.

Le myélogramme affirme le syndrome myéloprolifératif en montrant une richesse extrême de la moelle avec une hyperplasie de la lignée granuleuse présentant tous les stades de maturation.

En l'absence de tout traitement, la maladie évolue naturellement vers une phase d'accélération liée à l'apparition d'événements génétiques secondaires. Cette phase d'évolution de la LMC est caractérisée par la présence de cellules peu différenciées (blastés) dans le sang. À terme, lorsque les blastés représentent 20% des cellules

médullaires, ils définissent une phase de transformation aiguë de la maladie, associée à un tableau clinique proche de celui d'une leucémie aiguë.

La thérapeutique mise en place vise à retarder, sinon à empêcher la transformation aiguë terminale. Son but est d'éliminer les cellules comportant le Ph.

La chimiothérapie classique ne fait pas disparaître le Ph mais permet le contrôle de la masse leucémique.

L'hydroxyurée (Hydréa[®]), inhibiteur de la synthèse de l'ADN, est le plus souvent prescrite. Son action est rapide et sa toxicité est faible. Le busulfan (Myleran[®]) est un agent alkylant qui est également utilisé mais son maniement est plus délicat du fait de sa myélotoxicité. Toutefois il est à noter que cette chimiothérapie, même si elle améliore la qualité de vie du patient, ne prolonge ni la survie, ni le délai de transformation aiguë (Sébahoun G 2005).

Avec l'allogreffe de la moelle osseuse provenant d'un membre histocompatible (remplacée souvent maintenant par les cellules-souches circulantes ou parfois issues d'un sang de cordon), on peut éradiquer de façon durable le clone leucémique c'est-à-dire les cellules Ph+. Un conditionnement préalable par chimiothérapie avec ou sans irradiation, réduit au maximum la masse tumorale et empêche le rejet du greffon. Un traitement immunosuppresseur prolongé est obligatoire pour éviter la réaction du greffon contre l'hôte. Mais la procédure ne peut s'appliquer au-delà d'un certain âge et peut conduire à de multiples complications graves.

L'interféron alpha recombinant, biothérapie introduite dans les années 1980, agit plus profondément que la chimiothérapie et surtout associé à la cytarabine, peut induire une rémission cytogénétique, parfois complète et durable. Cette thérapie est devenue un traitement initial de choix chez la plupart des patients. Mais le produit est souvent mal supporté et induit des effets secondaires pénibles. L'adjonction d'hydroxyurée au début du traitement par interféron permet de diminuer la dose d'interféron et d'en améliorer la tolérance (Sébahoun G 2005).

Le mésylate d'imatinib (Glivec[®]), est un inhibiteur compétitif assez spécifique de l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL. Associé à peu d'effets secondaires, il donne très souvent et très rapidement des rémissions hématologiques puis cytogénétiques et même moléculaires apparemment complètes et durables. On dispose d'un recul insuffisant pour prévoir l'avenir à long terme des malades ainsi traités. Cependant on a assisté à une rechute rapide chez des sujets en rémission moléculaire dont on a interrompu le traitement. Il est donc possible qu'il faille le donner à vie. D'autre part la leucémie d'un certain nombre d'autres patients est

devenue résistante au produit, notamment à cause de mutations affectant le site de fixation du médicament sur abl.

4.2. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Les leucémies aiguës myéloïdes constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale, au niveau de la moelle osseuse, de cellules immatures, des blastes, appartenant à certaines lignées médullaires et ont pour corollaire une inhibition de l'hématopoïèse normale.

Les LAM sont des affections assez rares, elles atteignent tous les âges même si l'on observe un pic de fréquence au dessous de 5 ans chez l'enfant et une augmentation régulière de la fréquence au cours du vieillissement chez l'adulte (Sébahoun G 2005).

Les LAM sont détectées par des signes d'insuffisance médullaire et par des manifestations tumorales dues à l'infiltration leucémique des organes hématopoïétiques ou éventuellement d'autres organes (Sébahoun G 2005).

Le myélogramme permet d'observer une moelle hypercellulaire, montrant plus de 20% de cellules blastiques. Le degré de différenciation des blastes permet de définir le type cytologique de la leucémie.

L'apparition des LAM est favorisée par certains facteurs tels que des anomalies chromosomiques, des déficits immunitaires, les irradiations, l'exposition à des agents chimiques (benzène et dérivés), l'existence d'hémopathies non malignes ou de syndrome myéloprolifératifs ou à l'exposition à certains agents pharmacologiques utilisés en thérapie anti-cancéreuse (agents alkylants, étoposide).

Les LAM ont pour origine la transformation leucémique d'une cellule souche hématopoïétique. La transformation leucémique résulte de l'accumulation de mutations au niveau de proto-oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs tels que le récepteur à tyrosine kinase FLT3 (Kelly LM et al. 2002), le proto-oncogène N-RAS ou encore l'anti-oncogène RB qui est muté dans 30 à 55% des LAM avec inactivation de la protéine pRb qui régule le cycle cellulaire (Sébahoun G 2005). Ces mutations confèrent un avantage prolifératif aux cellules mutées. L'avantage sélectif de la prolifération leucémique se situe au niveau de la cellule souche clonogénique. Elle entraîne une inhibition de l'hématopoïèse normale liée à l'importance de la masse leucémique. La prolifération leucémique s'accompagne d'un arrêt de maturation à un stade plus ou moins avancé de la différenciation cellulaire. Les marqueurs de différenciation qui persistent à la surface des cellules leucémiques ont

permis, en association avec l'observation morphologique, la classification des différentes LAM en fonction de leur profil phénotypique et cytologique (tableau 1).

Le pronostic des LAM est assez bon chez l'enfant mais reste mauvais chez le sujet âgé ou le nouveau-né, chez les patients présentant des anomalies chromosomiques défavorables, notamment des délétions partielles ou totales des chromosomes 5 ou 7, des anomalies caryotypiques complexes, dans les LAM monocytaires (M4 et M5), mégacaryocytaires (M7) ou peu différenciées (M0) et dans les LAM secondaires.

La thérapeutique mise en place comporte trois phases majeures et une optionnelle. Elle débute par une chimiothérapie d'induction qui vise à réduire la masse de cellules blastiques jusqu'à un seuil non détectable, en vue d'obtenir une rémission complète (RC) qui se traduit par la restauration d'une hématopoïèse normale (Sébahoun G 2005). La chimiothérapie d'induction associe en général une anthracycline (daunorubicine ou idarubicine) et de la cytarabine ou Ara-C. Au terme de cette chimiothérapie, une rémission complète, c'est-à-dire une normalisation du sang et de la moelle, est obtenue dans deux tiers des cas (plus de 80 % chez l'enfant, moins de 50 % chez le sujet âgé). Il persiste cependant une maladie microscopique (quelques millions de cellules malignes seulement) qui serait responsable de rechutes chez pratiquement tous les patients en quelques semaines en l'absence de traitement complémentaire. Des traitements de consolidation et d'entretien, utilisant les mêmes produits que le traitement d'induction mais à dose réduite, sont donc nécessaires pour prolonger la rémission. Avec les traitements classiques, la moitié des patients restaient en rémission après un an, mais la plupart rechutaient et, après cinq ans, les chances de guérison étaient inférieures à 10 %.

Au cours des dernières décennies, des progrès substantiels ont été obtenus par intensification des chimiothérapies (anthracyclines-Ara-C), par autogreffe de cellules souches ou greffe de cellules souches allogéniques médullaires ou circulantes, ou par administration d'agents induisant la différenciation et l'apoptose des cellules leucémiques.

En effet, les traitements en cours de développement ou de recherche visent à identifier de nouveaux produits chimiques ou naturels capables de stopper la prolifération des cellules leucémiques en induisant un arrêt du cycle cellulaire, capables également d'enclencher des processus apoptotiques conduisant à la mort des cellules malignes ou encore d'induire la différenciation de ces cellules en réactivant les processus de maturation qui ont été stoppés au cours de la leucémogénèse.

Classification FAB	Description
Leucémie aiguë myéloïde avec différenciation minimale (LAM M0)	Elles représentent 3% des LAM et ne sont pas classables sur les seuls critères morphologiques (présence de blastes indifférenciés). Absence de marqueurs lymphoïdes et expression d'au moins un marqueur myéloïde.
Leucémie aiguë myéloblastique sans maturation (LAM M1)	Les blastes représentent plus de 90% des cellules médullaires avec une absence de maturation granuleuse ou une maturation inférieure à 10%. Les blastes ont une morphologie proche de celle du myéloblaste normal.
Leucémie aiguë myéloblastique avec maturation granuleuse (LAM M2)	Les blastes représentent de 20 à 90% des cellules médullaires. Leur morphologie est celle des myéloblastes, quelquefois très granuleux.
Leucémie aiguë à promyélocytes (LAM M3)	Elles représentent 10% des LAM, les blastes ont la morphologie de promyélocytes anormaux avec de très nombreuses grosses granulations azurophiles.
Leucémie aiguë myélomonocytaire (LAM M4)	Existence d'une monocytose sanguine et/ou d'une monocytose médullaire représentant plus de 20% des blastes. L'aspect du myélogramme est proche de celui de la LAM 2. Existence d'une variante éosinophile (LAM 4 Eo) avec quelques éosinophiles morphologiquement anormaux dans la moëlle.
Leucémie aiguë monocyttaire (LAM M5)	Hyperleucocytose avec fort pourcentage de blastes circulants. Prolifération médullaire de la lignée monocyttaire (monoblastes = LAM 5a, promonocytes monocytes = LAM 5b).
Erythroleucémie (LAM M6)	Hyperplasie érythroblastique médullaire représentant plus de 50% des éléments. Présence de blastes circulants.
Leucémie aiguë mégacaryocytaire (LAM M7)	Myélogramme hypocellulaire. Prolifération d'aspect peu différencié avec des blastes mégacaryocytaires et micromégacaryocytes.

Tableau 1 : Classification FAB des différentes LAM

II- LE CYCLE CELLULAIRE

1. Généralités (*Omnis cellula e cellula*, toutes les cellules proviennent de cellules, R Virchow)

Le cycle cellulaire est l'ensemble des modifications qu'une cellule subit entre sa formation par division à partir d'une cellule mère et le moment où cette cellule a fini de se diviser en deux cellules filles. La durée du cycle cellulaire varie d'une espèce à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre puisque dans l'organisme on trouve des cellules qui se divisent en continu, des cellules qui se divisent en fonction de stimuli externes et des cellules qui ne se divisent plus.

La division des cellules de l'organisme est nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire en assurant le renouvellement des cellules qui ont disparu au cours de phénomènes de mort naturelle ou accidentelle. La régulation du taux de renouvellement des cellules est nécessaire à la survie de l'organisme, cette régulation passe par un ajustement fin du cycle cellulaire d'une part et par un ajustement de la mort cellulaire programmée ou apoptose.

La transmission fidèle de l'information génétique à chaque division cellulaire est essentielle au développement normal d'un organisme, et par la suite à sa survie. Pour se diviser, une cellule doit d'abord répliquer son génome au cours de l'interphase puis établir un partage équitable du génome au cours de la phase de division proprement dite, la mitose. En fin de mitose, la cytokinèse permet la division du cytoplasme et permet ainsi la division en deux cellules filles.

L'interphase est composée de trois phases : une phase de croissance de la cellule (G1), une phase de réplication de l'ADN (S) et une phase de croissance et de préparation à la mitose (G2).

Pendant l'interphase, les chromosomes sont décondensés et distribués dans tout le noyau. Cette décondensation de l'ADN permet la réplication de l'ADN et la transcription des ARN. Le contenu relatif en ADN des cellules au cours du cycle cellulaire passe de 2N chromosomes en phase G1 à 4N chromosomes après la phase S de réplication.

Pendant l'interphase, 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).

A la fin de la phase G1 et de la phase G2, il existe ce qu'on appelle des points de restriction, ou "checkpoint", où la cellule contrôle que tout est parfaitement mis en place pour que respectivement la réplication de l'ADN et la mitose se déroulent normalement. Si les conditions sont favorables, la cellule rentre en mitose.

La mitose est le processus qui conduit à la séparation du matériel génétique dupliqué en deux jeux de chromosomes qui constitueront le matériel génétique complet des deux cellules filles. La mitose est constituée de quatre grandes phases : prophase, métaphase, anaphase et télophase, qui sont hautement régulées. Il existe de plus un point de restriction à la transition métaphase/anaphase qui permet de contrôler le déroulement correct de la mitose (Castro A et al. 2003). La mitose s'achève ensuite et laisse généralement place à la division du cytoplasme, la cytokinèse, afin de constituer deux cellules filles.

2. Régulation du cycle cellulaire

Les premières études génétiques chez la levure permirent d'identifier une centaine de gènes impliqués spécifiquement dans le contrôle du cycle cellulaire : ces gènes ont été appelés gènes CDC (Cell Division Cycle). Les homologues humains des CDC ont été identifiés par la suite, ils constituent la famille des CDK (Cyclin Dependent Kinase) (Lee MG et Nurse P 1987). L'activation des CDK est dépendante d'une phosphorylation réversible et permet le contrôle des différents passages du cycle cellulaire.

L'activité kinase de toutes les CDK nécessite la fixation d'une sous-unité activatrice nommée cycline (Evans T et al. 1983, Obaya AJ et Sedivy JM 2002). Les cyclines sont des protéines formées et dégradées au cours du cycle cellulaire. Chacune des phases du cycle cellulaire est caractérisée par l'expression d'un type particulier de cycline et les variations des taux des différentes cyclines régulent l'activité des différentes CDK.

La régulation du cycle cellulaire fait également appel à une étroite surveillance de l'intégrité de la cellule et de ses constituants. 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 points de contrôle particuliers appelés points de restriction ou

checkpoints, pour permettre la réparation des dommages. Après réparation, la cellule poursuit son cycle cellulaire ou, si les lésions sont trop importantes pour être réparées, la cellule entre en apoptose (figure 1 **R**).

2.1. Régulation du cycle par les complexes cyclines/CDK

Le début du cycle cellulaire, c'est-à-dire l'entrée en phase G1, coïncide avec la production, la stabilisation et l'activation des cycline de type D. Les gènes des cyclines de type D sont induits en réponse à des stimuli mitogènes tels que la stimulation par un facteur de croissance ou l'engagement de molécules d'adhésion. Les cyclines de type D existent sous 3 iso-formes D1, D2 et D3 qui se lient à CDK4 ou CDK6 (figure 1). Ces complexes sont ensuite activés par phosphorylation des CDKs sur un résidu thréonine par la kinase activatrice des CDK (CAK) (Sherr CJ 1995). Parmi les principaux substrats du complexe cycline D/CDK on trouve la famille des protéines du rétinoblastome (Rb) (Hatakeyama M et al. 1994) (figure 1).

L'expression de la cycline E fait suite à l'activation du complexe cycline D/CDK4 (ou 6) et la cycline E s'associe avec CDK2 (figure 1). Le complexe cycline E/CDK2 peut également phosphoryler Rb ou se lier à ce facteur et inhiber directement son action. Ceci permet le passage du premier point de restriction qui est contrôlé par les facteurs de croissance et la poursuite de la phase G1. La présence simultanée de complexes cycline D/CDK4 (ou 6) et cycline E/CDK2 est nécessaire à l'induction de la cycline A. En effet, le principal but des cyclines de la phase G1 est d'inactiver les membres de la famille des protéines Rb pour initier la phase S (Hatakeyama M et al. 1994, Lundberg AS et Weinberg RA 1998). Les protéines Rb sont liées aux facteurs de transcription E2F et bloquent l'activation transcriptionnelle de ces facteurs. La phosphorylation de Rb libère les facteurs de transcription E2F (figure 1) et active la transcription des cyclines E et A nécessaire pour le passage à travers G1 (Geng Y et al. 1996, Pagano M et al. 1992). Il y a également une activation de la transcription des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et dans l'expression des histones 2A et 2B, indispensables à l'assemblage de l'ADN dans les nucléosomes. Ces événements sont donc essentiels pour l'initiation et la progression de la phase S.

La cycline A forme un complexe avec la CDK2 mais peut aussi se lier à la CDK1 (figure 1). Le complexe cycline A/CDK2 agit avec les membres de la famille E2F et en parallèle avec les cyclines E/CDK2 pour réguler l'expression des gènes nécessaires pour la réplication de l'ADN. Le complexe cycline A/CDK2 active également la transcription des histones.

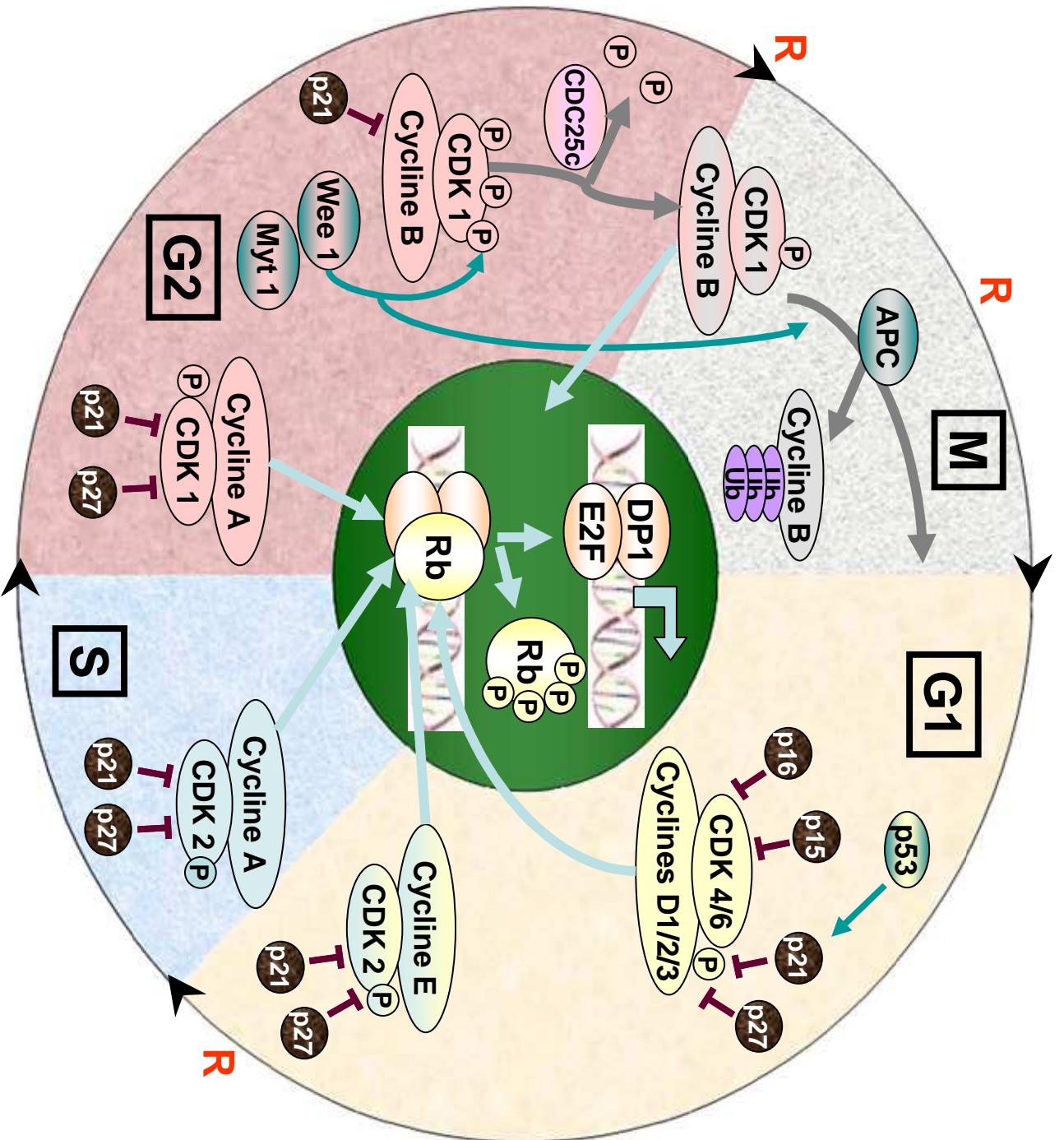


Figure 1: La régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines/CDK et leurs inhibiteurs d'après Pucci B 2000

La transition vers la phase G2 est permise par la présence de complexes cycline A/CDK1 et cycline B/CDK1 (figure 1).

Deux isotypes de cyclines B, B1 et B2, sont exprimés en phase G2 et ceux-ci s'associent avec CDK1. Le complexe cycline B/CDK1 (aussi appelé "maturation promoting factor", MPF) avance le cycle dans G2 et prépare la cellule pour la mitose (figure 3). Le passage en G2 est strictement contrôlé par l'activité de CDK1 qui est elle-même étroitement régulée. Tout d'abord CDK1 est phosphorylée par CAK, et cette forme mono-phosphorylée rend le complexe cycline B/CDK1 actif. Mais CDK1 est tout de suite phosphorylée par les kinases Myt1 et Wee1 ce qui provoque l'inactivation du complexe (figure 1).

L'entrée en mitose nécessite la déphosphorylation de CDK1 par la phosphatase CDC25C (Smits VA et Medema RH 2001) (figure 1). Au cours de la progression de G2 à M, l'activité de CDC25 est majoritaire, ce qui maintient CDK1 dans son état actif. Vers la fin de la mitose, à l'anaphase, Wee1 domine et le complexe est inactivé. Au niveau de la régulation de la transition G2/M, l'activité de CDC25C est régulée par les thréonine protéines kinases Chk2 et Chk1. Les deux kinases sont activées en réponse lors de dommages à l'ADN et phosphorylent la phosphatase CDC25C permettant son interaction avec la protéine 14-3-3 et sa séquestration dans le cytosol. La cellule ne peut alors pas progresser en mitose (Abraham RT 2001).

Au cours de la phase M, l'activité du complexe cycline B/CDK1 permet la condensation de l'ADN en régulant l'expression des histones H1 et H3, impliquées dans la condensation des chromosomes. Ce complexe phosphoryle également les lamines ce qui a pour conséquence le désassemblage de l'enveloppe nucléaire (Peter M et al. 1990) et participe au réarrangement du cytosquelette de tubuline conduisant à la formation du fuseau mitotique (Blangy A et al. 1995).

A l'anaphase, les protéines kinases Wee1 et Myt1 dominant et le complexe cycline B/CDK1 est inactivé. Cette inactivation permet la ségrégation des chromatides et la décondensation des chromosomes. La transition métaphase/anaphase coïncide avec la dégradation protéolytique de la cycline B et l'inactivation de CDK1 (figure 3). La dégradation de la cycline B nécessite son « étiquetage » par des chaînes d'ubiquitine (Glotzer M et al. 1991), assuré par l'E3 ubiquitine ligase, nommée APC (*anaphase-promoting complex*) (Peters JM 1999, Castro A et al. 2003) (figure 1). La cycline B ainsi ubiquitinylée est reconnue et dégradée par le protéasome 26S.

2.2. Régulation des complexes cycline/CDK par les inhibiteurs de CDK

L'un des mécanismes importants permettant de réguler l'activité des complexes cycline/CDK est leur interaction avec des protéines inhibitrices (Morgan DO 1995). Sept inhibiteurs de CDK, les CKI, ont été décrits et peuvent être divisés en deux familles : la famille INK4 (p16, p15, p18, et p19) et la famille Cip/Kip (p21, p27, et p57) (Sherr CJ et Roberts JM 1995).

Les membres de la famille INK4 contiennent des motifs ankyrine répétés. Ils se lient spécifiquement aux kinases CDK4 et CDK6, qu'ils inhibent en empêchant la liaison de la cycline D (Pommier Y et Kohn KW 2003) (figure 1). De ce fait, la protéine Rb reste sous sa forme hypophosphorylée ce qui a pour conséquence d'induire l'arrêt du cycle cellulaire en G1.

Les membres de la famille Cip/Kip se lient aux complexes cycline/CDK en formant des hétérotrimères (Obaya AJ et Sedivy JM 2002). La p27 est un gène suppresseur de tumeur bien établi, qui empêche la progression cellulaire en phase S en bloquant les complexes cycline E/CDK2 et cycline A/CDK2 (figure 1). La p21 a une spécificité plus large, puisqu'elle inhibe l'activité des complexes cycline E, cycline A/CDK2 et cycline B/CDK1 (figure 3). La protéine p21 interagit également avec la machinerie transcriptionnelle en se liant à PCNA, une ADN polymérase impliquée dans la réplication de l'ADN et sa réparation. La p21 est donc l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à divers stress cellulaires, et sa transcription peut être activée en réponse à ces stress et être placée sous la dépendance de p53 qui agit alors comme facteur de transcription (Kim TK 1997).

Ainsi, diverses perturbations (lésions de l'ADN, hypoxie ou surexpression d'oncogènes) augmentent les niveaux cellulaires de p53 (Levine AJ 1997), et augmentent également son activité, principalement par sa phosphorylation sur la sérine 15 et sur la sérine 20. La stabilisation de p53 induit l'expression de p21 qui s'accompagne de l'arrêt du cycle cellulaire, et de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose (*Bax*, *DR5*, *Noxa*, *Fas*).

Concernant le cycle cellulaire, 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 S et al. 2001).

De plus, p21 est également impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en G2 lorsqu'elle est induite par p53 (Bunz F et al. 1998, Taylor WR et Stark GR 2001).

Par ailleurs, 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 D et al. 1995).

Ces deux protéines p53 et p21 sont donc des régulateurs majeurs du cycle cellulaire en induisant des arrêts dans la progression du cycle, mais elles interviennent également dans le processus de mort cellulaire programmée ou apoptose.

III. APOPTOSE

1. Généralités sur l'apoptose

1.1. Historique et définition de l'apoptose

Le terme d'apoptose ou mort cellulaire programmée a été introduit en 1972 pour définir une forme de mort cellulaire morphologiquement, biochimiquement et moléculairement différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire connue jusqu'alors (Kerr JF et al. 1972). « Apoptose » est un nom qui signifie « chute » en grec ancien et qui évoque la chute des feuilles caduques en automne.

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme.

Le programme de mort cellulaire qui est alors activé par la cellule elle-même joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. L'exécution de ce programme fait appel à de nombreux facteurs moléculaires qui vont réguler l'apoptose tout au long de son déroulement. Ils ont été identifiés à partir des travaux de Horvitz et al. (1983) sur le développement du nématode *Caenorhabditis elegans* au cours duquel une partie des cellules meurt par apoptose. Ces facteurs moléculaires sont responsables de l'apparition de phénotypes morphologiques et biochimiques nouveaux qui sont caractéristiques de cellules en apoptose.

Des dérégulations du programme apoptotique sont également à l'origine de perturbations dans le développement de l'organisme et à l'origine de nombreuses pathologies graves.

1.2. Rôle physiologique de l'apoptose

Au cours de l'embryogenèse, de nombreuses structures initialement mises en place au cours du développement sont ensuite détruites par apoptose. C'est le cas du canal de Müller qui est détruit chez les hommes, du canal de Wolff qui est détruit chez la femme. Il en est de même pour les tubules pronéphriques utilisés par les

poissons et les amphibiens qui sont détruits chez les mammifères. L'apoptose participe également à la morphogenèse des doigts où les cellules de l'espace interdigital des doigts d'un embryon disparaissent par apoptose (Wood W et al. 2000).

La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait également appel à l'apoptose qui assure qu'un nombre correct de cellules souches se différencient. Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès et les cellules surnuméraires vont ensuite mourir par apoptose afin de créer un équilibre entre les neurones et les cibles qu'ils innervent. En effet, les cellules nerveuses embryonnaires ont besoin pour survivre du facteur de survie NGF (nerve growth factor) qui est produit par les cellules cibles des neurones (Clarke PG et al. 1998). Seuls vont survivre les neurones qui se connecteront correctement à leur cible, les autres vont mourir par apoptose.

De même, pour le développement du système immunitaire, l'apoptose joue un rôle crucial dans la sélection lymphocytaire au cours de laquelle les lymphocytes T et B auto-immuns seront éliminés par apoptose.

L'apoptose intervient aussi chez l'adulte, elle permet à l'organisme de contrôler le nombre de cellules et la taille des tissus. C'est le cas par exemple lors du renouvellement des kératinocytes de la peau (Weil M et al. 1999) ou à la fin de la réaction immunitaire, où les lymphocytes T activés en surnombre, meurent par apoptose.

1.3. Caractéristiques des cellules apoptotiques

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

Un des premiers changements observables est la réduction du volume cellulaire : la cellule se déshydrate et la perte de l'eau intracellulaire conduit à la condensation du cytoplasme. Malgré la rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts et gardent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose. Le noyau présente lui aussi des modifications : on assiste à une condensation de la chromatine qui débute à la périphérie de la membrane nucléaire. Puis, cette enveloppe nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes.

On observe également un bourgeonnement de la membrane plasmique qui conduit à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. La formation des corps apoptotiques permet d'éviter que le contenu cellulaire ne soit répandu dans l'espace intercellulaire. Les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés *in vivo*, par les cellules voisines ou les macrophages, sans provoquer de processus inflammatoire dans les tissus.

Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés d'altérations biochimiques spécifiques. Parmi celles-ci, la plus remarquable est la fragmentation de l'ADN, qui survient lors de la condensation de la chromatine. Cette fragmentation résulte de l'activation d'une endonucléase qui coupe l'ADN entre les nucléosomes et conduit à l'apparition de fragments d'ADN de taille équivalente à des multiples de 180 paires de bases.

D'un point de vue biochimique, l'apoptose est aussi caractérisée par la perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique. Les phosphatidylsérines qui sont normalement présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane des cellules normales, vont se déplacer dans le feuillet externe et être externalisés à la surface des cellules. Ceci permet aux cellules apoptotiques d'être reconnues comme cibles par les macrophages pour la phagocytose (Messmer UK et Pfeilschifter J 2000).

De plus, lors de l'apoptose, certaines protéines cellulaires sont dégradées. C'est le cas des lamines formant la membrane nucléaire ou de certaines protéines dont le clivage conduit à une altération du cytosquelette. Cette perte du cytosquelette induit la formation des corps apoptotiques.

1.4. Pathologies et dérégulations de l'apoptose

Le dérèglement des mécanismes de régulation de la mort cellulaire par apoptose est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies. Ces dérèglements peuvent conduire à un excès ou à un défaut d'apoptose et caractérisent des types différents de pathologies.

L'excès d'apoptose intervient dans le développement d'anomalies congénitales du développement et de certaines maladies neurodégénératives chroniques comme l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Thompson CB 1995, Saikumar P et al. 1999). De même, un excès d'apoptose 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 lymphocytes T auxiliaires nécessaires pour activer les lymphocytes T cytotoxiques (Saikumar P et al. 1999).

A l'inverse, un défaut d'apoptose a été observé dans le développement de maladies auto-immunes résultant de l'apparition de lymphocytes auto-réactifs qui n'ont pas été éliminés par apoptose au cours de la sélection clonale lymphocytaire (Saikumar P et al. 1999). De même, un défaut ou un blocage dans l'exécution de l'apoptose ont pu être identifiés dans les pathologies virales, les syndromes lymphoprolifératifs et surtout dans de nombreux cas de cancers (Thompson CB 1995).

2. Les voies d'induction de l'apoptose

L'apoptose peut classiquement être divisée en trois phases : une phase d'induction ou d'initiation, une phase d'exécution et une phase de dégradation. 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. Ces caspases interviennent dans l'exécution de l'apoptose et conduiront à la dégradation de la cellule.

Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque). Une troisième voie activée en réponse à un stress et faisant intervenir le réticulum endoplasmique (RE) a également été décrite.

2.1. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque

L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose se fait en réponse à la fixation de ligands spécifiques de type cytokines sur des récepteurs de surface appelés récepteurs de mort. Ces récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs au tumor necrosis factor (TNFR) et incluent des récepteurs tels que le récepteur Fas, les récepteurs au TNF (TNFR-1, TNFR-2) et les récepteurs au TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) DR-4 et DR-5 (Ashkenazi A 2002) (figure 2).

La fixation d'un ligand sur un récepteur de mort conduit à la trimérisation du récepteur qui lui permet d'être actif (figure 2).

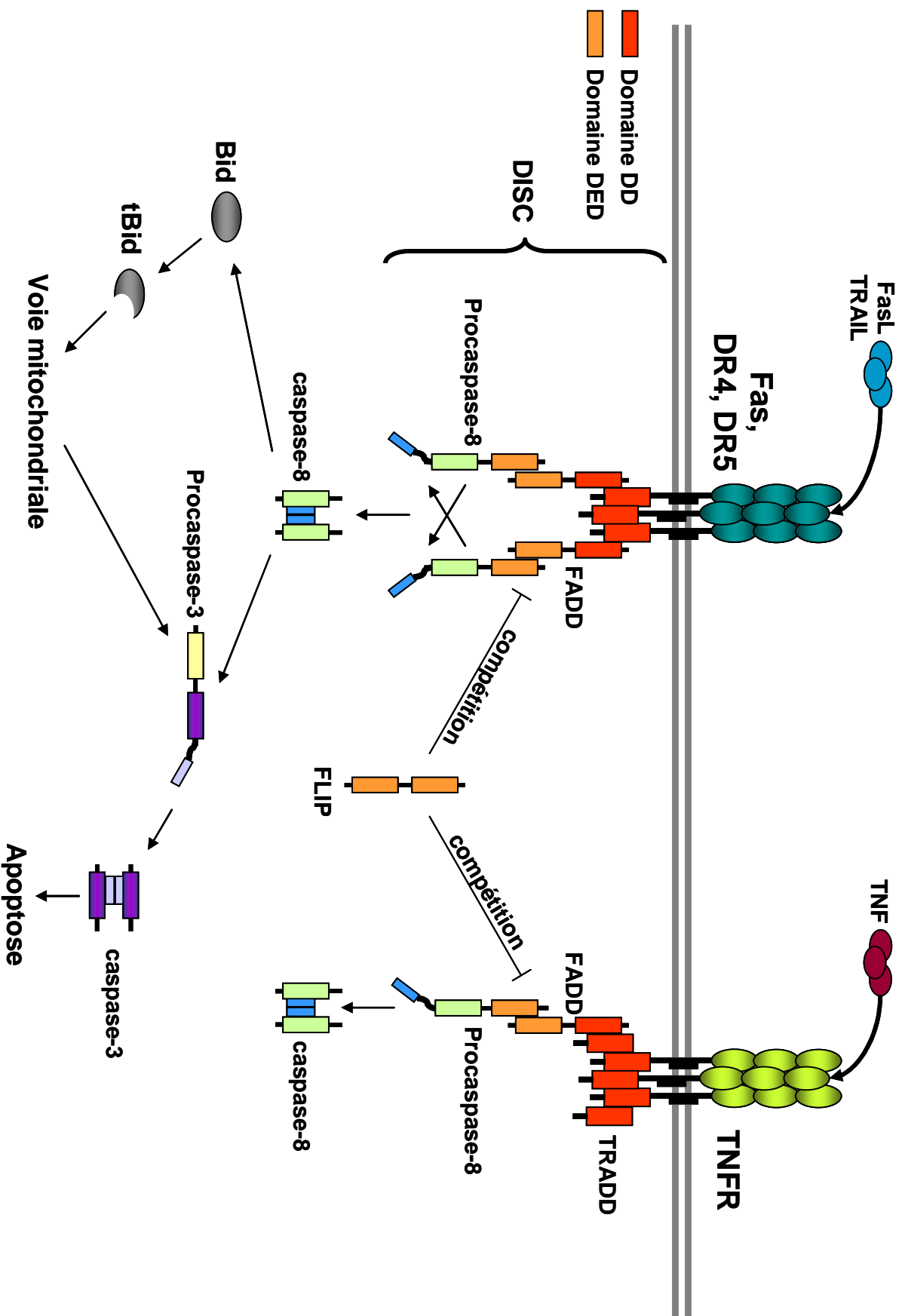


Figure 2 : La voie des récepteurs de mort d'après Gupta S 2003

La signalisation du récepteur de mort activé se fait par sa région cytoplasmique qui possède une séquence conservée appelée death domain (DD). L'activation du récepteur conduit au recrutement de protéines adaptatrices au niveau du DD (figure 2). Ces protéines adaptatrices appelées Fas associated death domain (FADD) ou TNF receptor associated death domain (TRADD) possèdent leur propre DD par lequel elles sont recrutées au niveau des récepteurs activés (figure 2). Les protéines adaptatrices possèdent également un second domaine d'interaction protéique appelé death effector domain (DED). Le domaine DED des protéines adaptatrice FADD ou TRADD interagit alors avec le domaine DED d'une protéase à cystéine, la pro-caspase-8 ou la pro-caspase-10 qui font partie de la famille des caspases initiatrices (figure 2). Ces caspases initiatrices sont sous forme de zymogène et sont recrutées par les protéines adaptatrices au niveau des récepteurs de mort et le complexe ainsi formé est appelé death inducing signaling complex (DISC) (Boatright KM et Salvesen GS 2003) (figure 2).

La formation du DISC augmente la concentration locale et permet le rapprochement des pro-caspases initiatrices -8 et -10 qui sont alors en mesure de s'activer par autoclivage (Salvesen GS et Dixit VM 1999). La caspase-8 activée active alors à son tour les caspases dites effectrices comme la caspase-3 qui sont responsables de la phase d'exécution de l'apoptose (Khosravi-Far R et Esposti MD 2004) (figure 2).

C'est principalement au niveau de la formation du DISC que la voie extrinsèque est régulée. En effet, il existe une isoforme de la caspase-8 appelée Flice-inhibitory protein (FLIP). La protéine FLIP contient 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 (Krueger A et al. 2001) (figure 2).

L'activation directe des caspases effectrices par les caspases -8 et -10 se fait dans des types cellulaires particuliers tels que les thymocytes appelées cellules de type I (Scaffidi C et al. 1998, Ozoren N et El-Deiry WS 2002). Dans les cellules de type I, l'activation de la voie extrinsèque conduit à l'exécution de l'apoptose sans intervention de la mitochondrie dans la signalisation apoptotique.

Dans les autres types cellulaires, les cellules de type II, le signal provenant des récepteurs activés n'est pas assez fort pour déclencher la cascade d'activation des caspases. Dans ce cas l'activation des caspases effectrices nécessite une amplification du signal apoptotique via l'activation de la voie intrinsèque ou voie mitochondriale de l'apoptose.

Le lien entre les deux voies d'induction de l'apoptose est assuré dans ces cellules par une petite protéine de la famille des protéines Bcl-2 (B cell lymphoma-2) appelée Bid (figure 2). En effet, la caspase-8 activée clive Bid au niveau N-terminal de la protéine permettant l'exposition de son domaine BH3. La forme tronquée de Bid appelée tBid est alors rapidement transloquée du cytosol vers la membrane mitochondriale où elle se lie à Bax ou à d'autres protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et induit l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose (Luo X et al. 1998).

2.2. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

La mitochondrie est un organe cellulaire majeur qui est constitué d'une membrane externe, d'un espace intermembranaire, d'une membrane interne et d'une matrice. La mitochondrie joue un rôle primordial dans la physiologie de la cellule en générant l'énergie nécessaire à toutes les réactions biochimiques de la cellule. Cette énergie dérive de la production d'ATP qui se fait par phosphorylation oxydative dans la chaîne respiratoire. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne de la mitochondrie génère un gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire et crée ainsi un potentiel membranaire mitochondrial (ψ_m). Le retour des protons dans la matrice ne peut se produire qu'au niveau de passages spécifiques constitués par l'ATP synthase. L'ATP formé est alors transporté par l'adénine nucléotide translocase (ANT) dans l'espace intermembranaire en échange d'une molécule d'ADP. L'ATP passe ensuite dans le cytosol au travers de canaux anioniques voltage-dépendants, les VDAC.

En dehors de son rôle métabolique, il est apparu depuis une dizaine d'années que la mitochondrie joue un rôle clé dans l'apoptose (Kroemer G et Reed JC 2000, Green DR et Reed JC 1998). Ce rôle ne se limite pas à une simple perte de fonction qui priverait la cellule d'énergie, mais la mitochondrie participe à l'intégration et à la propagation des signaux de mort activés par des facteurs endogènes. De manière générale, la voie mitochondriale de l'apoptose est induite par des signaux de stress cellulaire tels que l'exposition à des radiations UV, une irradiation γ , des dommages à l'ADN, une déprivation en facteurs de survie ou encore suite à l'action d'oncoprotéines, de protéines suppresseur de tumeurs comme la protéine p53 ou de protéines de virulence virale. Enfin, la voie mitochondriale est activée par la plupart des agents chimiothérapeutiques (Kaufmann SH et Earnshaw WC 2000, Kroemer G 2003).

Pendant l'apoptose, de l'eau et différents solutés pénètrent dans la mitochondrie provoquant son gonflement et l'altération de la membrane externe conduisant au relargage dans le cytosol de protéines mitochondriales localisées dans l'espace intermembranaire. L'altération de la membrane externe de la mitochondrie est généralement associée à une modification de la perméabilité de la membrane interne conduisant alors à des variations du ψ_m ($\Delta\psi_m$).

Plusieurs hypothèses concernant l'origine des perturbations membranaires conduisant au relargage des protéines mitochondriales ont été décrites. Elles impliquent la rupture de la membrane externe mitochondriale ou bien la formation de canaux affectant les membranes externe et interne (Ly JD et al. 2003).

Les protéines de l'espace intermembranaire relarguées dans le cytosol sont regroupées sous le nom de soluble intermembrane mitochondrial proteins (SIMPs) et jouent toutes un rôle dans l'exécution du programme apoptotique de la voie mitochondriale (Saelens X et al. 2004).

a. Origine des perturbations membranaires observées dans l'apoptose induite par la voie mitochondriale

La théorie de la fermeture des canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC) (figure3).

Le premier modèle implique l'hyperpolarisation de la membrane interne précédant la libération des facteurs proapoptotiques dans certains systèmes. Cette hyperpolarisation résulterait de l'incapacité de l'échange entre l'ADP cytosolique et l'ATP mitochondrial (Vander Heiden MG et al. 1999). Cet échange est normalement effectué par les canaux anioniques voltage-dépendants 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. La fermeture du VDAC au cours de l'apoptose pourrait induire une absence d'échange ATP/ADP ce qui semble inhiber l'activité de l'ATP synthase et empêche le retour des protons 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 (Zamzami N et Kroemer G 2001).

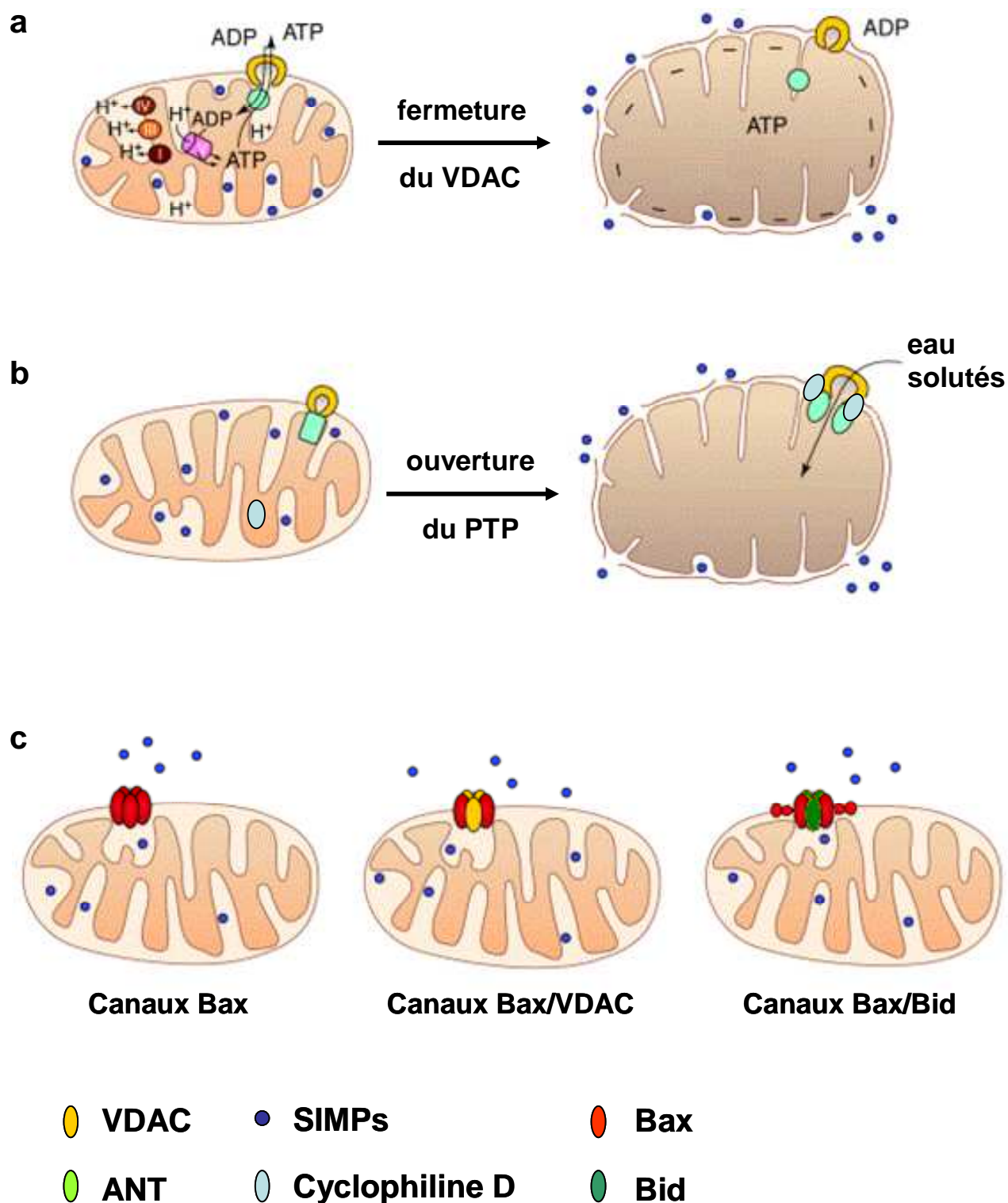


Figure 3 : Origine du relargage des SIMPs au cours de l'apoptose induite par la voie mitochondriale d'après Deshager S et Martinou JC 2000

La théorie du pore de transition de perméabilité (PTP) mitochondrial (figure 3).

Ce PTP 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 M 1999). Les différentes études réalisées ont permis de définir une composition minimale du PTP composé par l'association de l'ANT, du VDAC et de la cyclophiline D, une protéine de la matrice (figure 3). 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 protéine proapoptotique Bax de la famille des protéines Bcl-2 et également par des inducteurs de mort (Crompton M 1999). 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 (Ly JD et al. 2003). De plus, les membres de la famille Bcl-2 peuvent réguler l'ouverture du pore : Bcl-2 peut prévenir cette ouverture (Kroemer G et al. 1997, Shimizu S et al. 1998) alors que Bax provoque une chute du potentiel membranaire mitochondrial (Marzo I et al. 1998) et en favorise l'ouverture.

La théorie de la formation de canaux à travers la membrane externe composés de membres proapoptotiques de la famille Bcl-2 (figure 3).

En opposition aux théories précédentes, plusieurs travaux ont montré que le relargage des SIMPs pouvait se produire en absence ou avant la chute du potentiel membranaire mitochondrial (Goldstein JC et al. 2000, Bossy-Wetzler E et al. 1998). L'hypothèse de la formation d'un canal pouvant laisser passer les protéines à travers la membrane externe mitochondriale a été avancée. Cette hypothèse mettrait en jeu des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2. Certaines de ces protéines possèdent en effet des sites d'ancrage aux membranes. L'activation des protéines de la famille Bcl-2 par un stimulus proapoptotique induirait un changement conformationnel qui exposerait le site d'ancrage aux membranes.

L'insertion de ces protéines dans la membrane externe mitochondriale serait alors possible. L'insertion à la membrane est alors suivie d'une oligomérisation permettant la formation de pores.

Certains de ces pores ont été décrits et peuvent être constitués par l'oligomérisation de la protéine proapoptotique Bax de la famille Bcl-2, par une association entre les protéines Bax et Bid et enfin par une interaction entre Bax et le VDAC (Ly JD et al. 2003) (figure 3). Ces pores semblent capables de laisser passer des SIMPs (Antonsson B et al. 2000, Korsmeyer SJ et al. 2000, Shimizu S et al. 2000).

b. Les SIMPs et leur rôle dans l'exécution de la voie mitochondriale de l'apoptose

Les SIMPs sont donc des protéines et des molécules de l'espace intermembranaire mitochondrial qui sont relarguées au cours de l'apoptose. Ce groupe comprend le cytochrome c qui est un des constituants de la chaîne respiratoire, certaines procaspases (-2, -3 et -9), les protéines Smac/Diablo et Omi/HtrA2. Toutes ces protéines participent et régulent la voie mitochondriale dépendante des caspases. Deux autres SIMPs, les protéines AIF («Apoptosis-Inducing Factor») et endonucléase G sont quant à elles capables d'induire l'apoptose de façon indépendante de l'activation des caspases.

La voie mitochondriale dépendante des caspases (figure 4).

Le déclenchement de la voie mitochondriale dépendante des caspases se fait après relargage du cytochrome c depuis la mitochondrie.

Le cytochrome c est synthétisé sous forme de précurseur cytoplasmique 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 L et al. 2002). Au cours de l'apoptose, dans un premier temps, seule une partie du cytochrome c serait relâchée dans le cytosol, c'est-à-dire la fraction soluble de l'espace intermembranaire de la mitochondrie (figure 4). La fraction de cytochrome c restant associée avec la membrane interne de la mitochondrie

permettrait à la cellule de continuer à synthétiser de l'ATP, qui est nécessaire à la réalisation de l'apoptose.

Le relargage du cytochrome c participe alors à l'activation de la cascade des caspases en activant une caspase initiatrice, la caspase-9. L'activation de la caspase-9 se fait au sein d'un complexe multiprotéique. Ce complexe appelé apoptosome est constitué de cytochrome c, de protéines Apaf-1, d'ATP et de procaspase-9 (figure 4).

La formation de l'apoptosome débute par la fixation du cytochrome c au niveau de motifs WD-40 présents sur Apaf-1. Cette fixation induit un changement de conformation de Apaf-1 et expose son domaine CARD (Caspase recruitment domain) (Li P et al. 1997). La fixation de l'ATP permet la stabilisation de la nouvelle conformation qui permet l'oligomérisation de sept unités (Apaf-1)-(cyt c)-ATP (Adrain C et al. 1999). Cette nouvelle conformation en heptamère autorise le recrutement de procaspases-9 via une interaction entre les domaines CARD des protéines Apaf-1 et les domaines CARD des procaspases-9 (Li P et al. 1997). Le complexe heptamérique formé est alors appelé apoptosome (figure 4). L'apoptosome actif est alors capable de recruter et d'activer les caspases effectrices -3 et -7. De plus, au sein de l'apoptosome, les caspases-9 peuvent s'autoactiver du fait de leur proximité. La caspase-9 active peut alors être libérée dans le cytosol et cliver ses substrats. Toutefois, la caspase-9 réellement active est celle liée à l'apoptosome (Rodriguez J et Lazebnik Y 1999).

L'activation de la cascade des caspases est quant à elle régulée par les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) qui se lient directement aux caspases et empêchent le clivage des caspases nécessaire à leur activation (Deveraux QL et Reed JC 1999, Fesik SW et Shi Y 2001). Les protéines de la famille des IAP telles que XIAP (X-linked IAP), c-IAP-1 ou c-IAP-2 interagissent avec les caspases-3, -7 et -9 par l'intermédiaire de domaines conservés appelés BIR (baculoviral IAP repeat) et bloquent la maturation protéolytique de ces caspases (figure 4).

Au cours de l'activation de la voie mitochondriale dépendante des caspases, parmi les SIMPs relarguées de la mitochondrie se trouvent les protéines Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding protein with Low pI) et Omi/HtrA2. Ces protéines sont en fait des inhibiteurs des IAP qui se lient au niveau des domaines BIR des IAP et inhibent ainsi leurs activités anti-apoptotiques (Verhagen AM et al. 2000, Srinivasula SM et al. 2001, Martins LM et al. 2002) (figure 4).

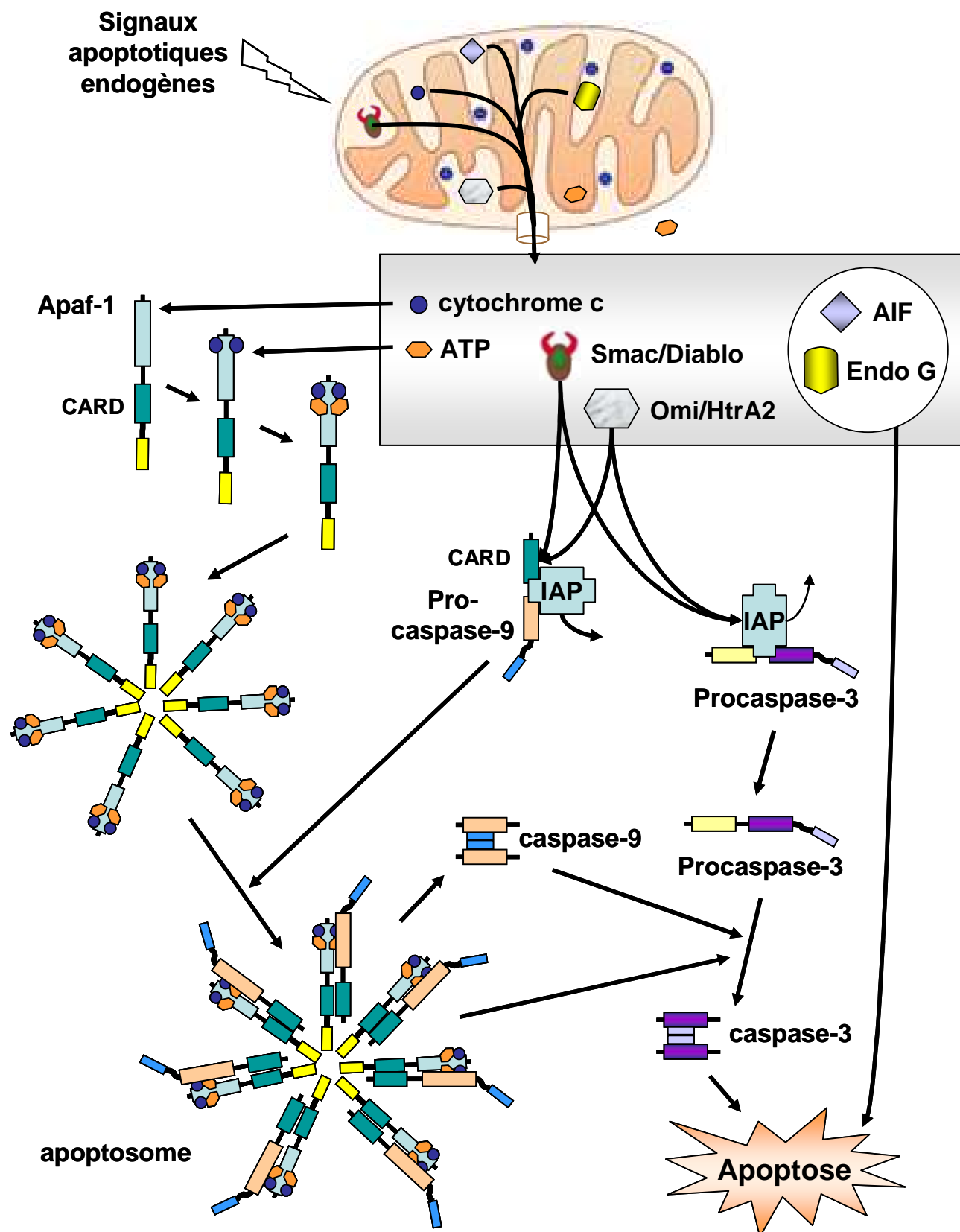


Figure 4 : La voie mitochondriale de l'apoptose d'après Ravagnan L 2002

La voie mitochondriale indépendante des caspases

Le facteur AIF a été identifié et cloné il y a plusieurs années (Susin SA et al. 1999). Cette flavoprotéine de 57 kDa est confinée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie en conditions de fonctionnement normal. En effet, le précurseur de l'AIF (67 kDa) est synthétisé dans le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie (Susin SA et al. 1999). Une fois dans l'espace intermembranaire, la protéine est clivée, elle change de conformation et possède alors probablement une activité NADH oxydase (Modjtahedi N et al. 2006). Après activation de la voie intrinsèque, l'AIF se transloque de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau. Le transport vers le noyau pourrait se faire grâce à une séquence de localisation nucléaire (Modjtahedi N et al. 2006).

Dans le noyau, l'AIF induit une condensation périphérique de la chromatine ainsi qu'un clivage de l'ADN en fragments d'environ 50 kb, ceci par interaction directe avec l'ADN sans spécificité de séquence (Ye H et al. 2002). De plus, l'AIF amplifierait également ainsi sa propre libération une fois dans le cytosol (Susin SA et al. 1999). Ces actions dépendent directement de l'activité de l'AIF lui-même et sont indépendantes des caspases (figure 4).

L'endonucléase G est une nucléase mitochondriale non-spécifique de 30 kDa très conservée chez les eucaryotes (Li LY et al. 2001). Elle est codée par un gène nucléaire et est importée dans l'espace intermembranaire mitochondrial. L'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose conduit à la libération de l'endonucléase G dans le cytosol puis à sa translocation dans le noyau. Elle digère l'ADN en absence d'activité caspase et en absence de la nucléase caspase-dépendante (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 K et al. 2001) (figure 4). L'endonucléase G pourrait également coopérer avec l'AIF pour induire une apoptose indépendante des caspases (Wang X et al. 2002b).

2.3. La voie dépendante du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le site de l'assemblage des protéines, de modifications post-traductionnelles et de l'acquisition des structures conformationnelles tertiaires et quaternaires des protéines nouvellement synthétisées. Le RE est également un site de stockage du calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ qui permet de réguler la concentration cytoplasmique en calcium. Depuis quelques années un nouveau rôle dans la réponse au stress cellulaire et l'induction de l'apoptose est apparu concernant le RE.

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 D et Habener JF 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 T et al. 2002). La seconde voie d'induction de l'apoptose met en jeu la voie de transduction cJun N-terminal kinase (JNK) (Urano F et al. 2000). 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. Son activation conduit à l'apoptose. Il semblerait que JNK agisse comme partenaire dans l'activation de la caspase-12 (Oyadomari S et al. 2002).

3. Les effecteurs de l'apoptose : les caspases

Après la phase d'initiation de l'apoptose caractérisée par l'activation des voies extrinsèque ou intrinsèque, interviennent les phases d'exécution et de dégradation. Ces différentes voies font intervenir dans leur déroulement l'activation d'une famille de protéases particulières. Ces enzymes possèdent un résidu cystéine dans leurs sites actifs et clivent leurs substrats après un résidu aspartate, ces caractéristiques leur ont valu le nom de caspases (Cystéine ASPartyl protéASEs) (Alnemri ES et al. 1996). Chez les mammifères, 14 caspases ont été identifiées à ce jour dont 11 sont présente chez l'humain (Riedl SJ et Shi Y 2004). Ces enzymes jouent un rôle dans l'activation de cytokines comme l'IL-1 β et l'IL-18, l'initiation et l'exécution de l'apoptose.

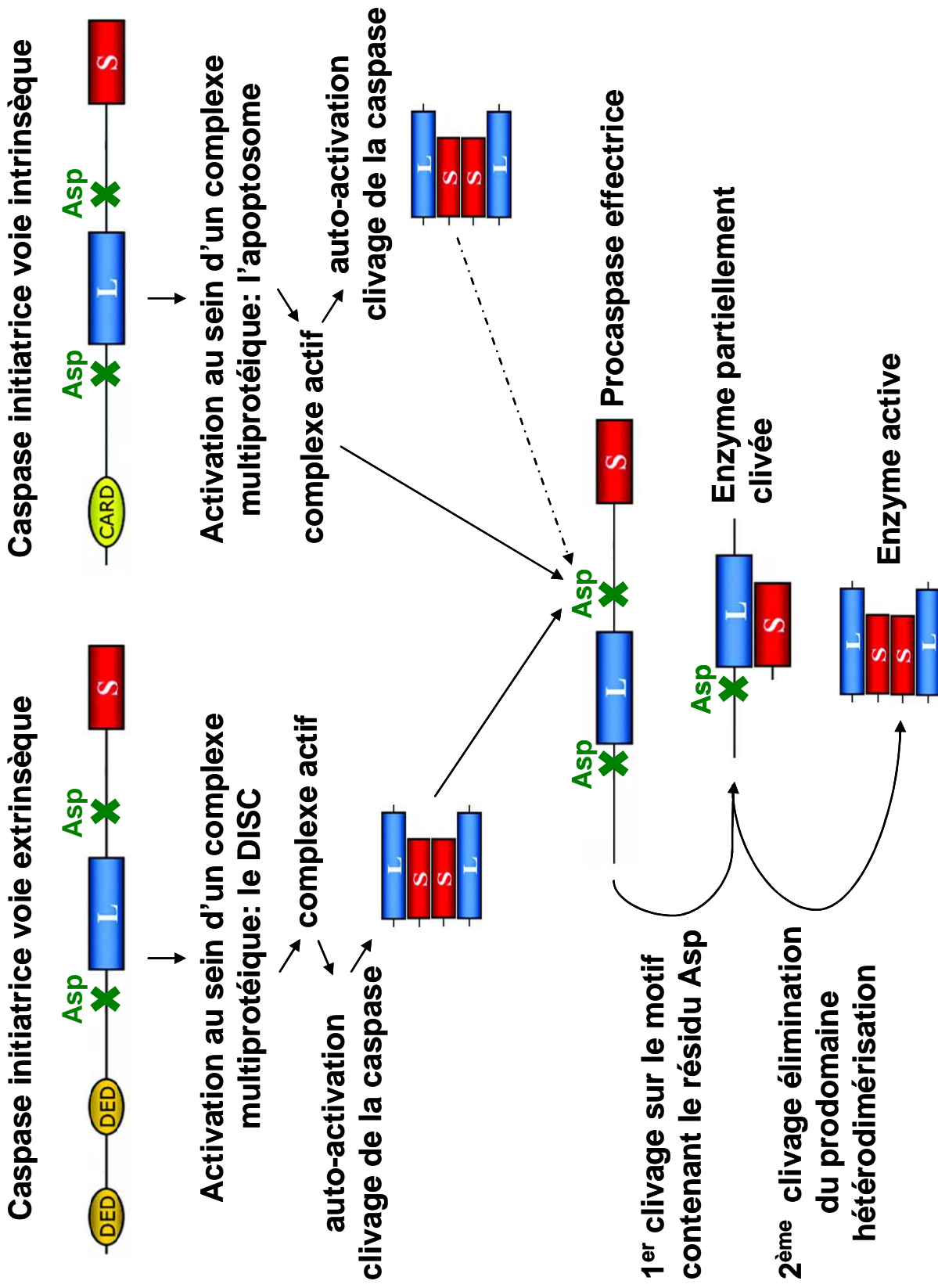


Figure 5 : Voies d'activation des caspases d'après Fuentes-Prior P 2004

3.1. Structure et activation des caspases

Toutes les caspases ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes appelés procaspases. Les caspases sont constituées de trois parties principales : un prodomaine de taille et de séquence variables localisé à l'extrémité amino-terminale de la protéine, une grande sous-unité (environ 20 kDa) qui contient le site catalytique de l'enzyme et qui se situe au milieu de la molécule et une petite sous-unité (environ 10 kDa) localisée dans la partie carboxy-terminale (Fuentes-Prior P et Salvesen GS 2004).

L'activation des caspases peut se faire au sein de complexes multiprotéiques (apoptosome et DISC), dans lesquels les procaspases sont recrutées, ou par clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de deux sites consensus comportant un résidu aspartate (figure 5). La zone de clivage des caspases peut être reconnue par diverses protéases, mais la présence du résidu aspartate fait que cette zone est reconnue par les caspases elles-mêmes. Ainsi, 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 NA et Lazebnik Y 1998, Thornberry NA 1998). Le clivage des caspases permet de séparer les deux sous-unités et de couper le prodomaine (figure 5). Bien que la grande sous-unité contienne le domaine catalytique, son activité nécessite la liaison à la petite sous-unité. Les caspases actives lorsqu'elles sont sous forme libre sont alors constituées de tétramères formés par l'association de deux hétérodimères, contenant deux sites catalytiques indépendants (Fuentes-Prior P et Salvesen GS 2004) (figure 5).

3.2. Les différentes classes de caspases

Les caspases peuvent être subdivisées en trois grands groupes selon leur site spécifique de reconnaissance du substrat, selon leur structure ou selon leur fonction biologique. Le premier groupe comprend les caspases-1, -4 et -5 qui jouent un rôle dans les réponses inflammatoires en participant à l'activation protéolytique de cytokines proinflammatoires telles que l'IL1 β et l'IL18 (Fuentes-Prior P et Salvesen GS 2004) (figure 6). Ces caspases ne jouent pas de rôle important dans l'apoptose. Elles clivent leur substrat après une séquence terminée par les trois résidus EHD (Philchenkov A 2004). La caspase-14 quant à elle intervient spécifiquement dans la différenciation terminale des kératinocytes (Lippens S et al. 2000).

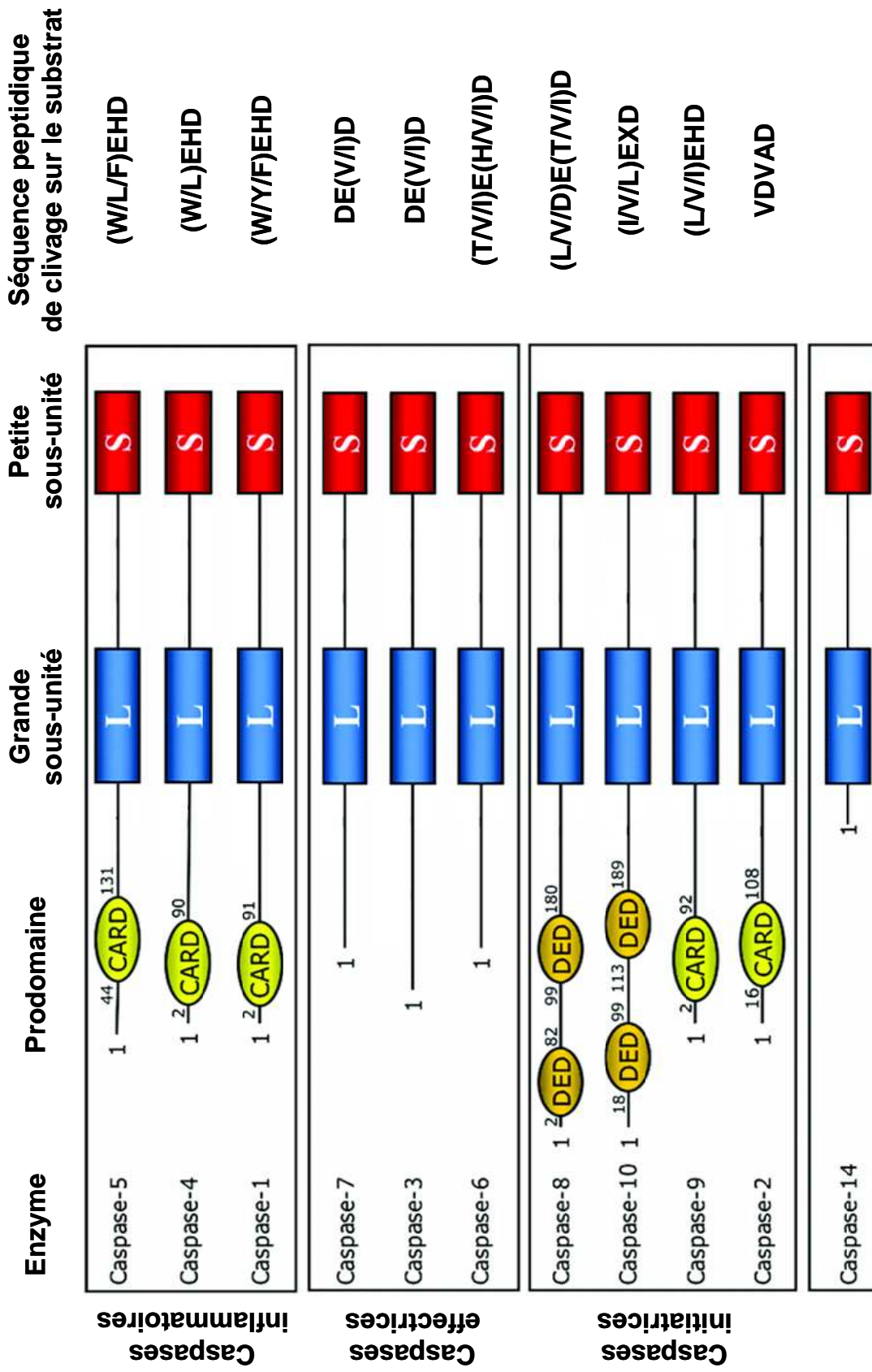


Figure 6 : Les différentes classes de caspases humaines (modifiée d'après Fuentes-Prior P 2004)

Les deux autres groupes sont constitués des caspases qui jouent un rôle majeur dans l'apoptose, avec d'une part les caspases initiatrices et d'autre part les caspases effectrices (figure 6). Les caspases initiatrices sont à l'origine de la cascade d'activation des caspases conduisant à l'exécution du programme apoptotique. Ces caspases initiatrices possèdent un prodomaine long permettant leur recrutement par des molécules adaptatrices au niveau de motifs d'interaction situés sur ce prodomaine. Les caspases-8 et -10 possèdent un motif DED (death effector domain) permettant leur recrutement dans le DISC au niveau de récepteurs de mort (figure 6). Les caspases-2 et -9 possèdent quant à elles, un motif CARD (caspase recrutement domain) qui permet leur recrutement au niveau de l'apoptosome (figure 6). Il est à noter que ces domaines CARD sont également présents chez les caspases inflammatoires (Fuentes-Prior P et Salvesen GS 2004). Le recrutement des caspases initiatrices au niveau des complexes multiprotéiques DISC et apoptosome permet leur activation. Une fois activées, les caspases initiatrices vont à leur tour activer les caspases effectrices -3, -6 et -7. Ces dernières sont caractérisées par un prodomaine court (figure 6). Les caspases effectrices sont activées par clivage et dimérisation comme évoqué précédemment. Lorsqu'elles sont activées les caspases effectrices sont directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose et clivent un grand nombre de protéines vitales de la cellule (Cohen GM 1997).

3.3. Principaux substrats des caspases et conséquences de leur clivage

La présence relativement fréquente des séquences peptidiques reconnues par les caspases dans les protéines humaines suggère l'existence d'une multitude de substrats pour ces protéases. A ce jour, un très grand nombre de substrats ont été identifiés et classés en fonction de leur importance dans la physiologie de la cellule (Fischer U et al. 2003). Parmi ces très nombreux substrats, seules quelques protéines dont le clivage avait une importance pour le déroulement de l'apoptose ont été répertoriées (Fuentes-Prior P et Salvesen GS 2004).

La protéine pro-apoptotique Bid de la famille des protéines Bcl-2 est l'un de ces substrats dont le clivage intervient dans la régulation de l'apoptose. En effet, la protéine Bid est clivée par la caspase-8 en réponse à l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose. Ce clivage active la protéine Bid et conduit à sa translocation à la mitochondrie où elle interagit avec des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et permet l'activation de la voie intrinsèque de

l'apoptose et l'amplification du message apoptotique (Li H et al. 1998, Luo X et al. 1998).

Les autres substrats sont plus généralement clivés par les caspases effectrices et leur clivage est caractéristique de cellules engagées dans la phase de dégradation de l'apoptose. La fragmentation de l'ADN en oligonucléosomes est l'une des caractéristiques de cellule en fin d'apoptose. La fragmentation de l'ADN est généralement assurée par la nucléase DFF40 (DNA fragmentation factor)/CAD (caspase activated-DNase) qui coupe l'ADN génomique entre les nucléosomes pour générer des fragments de 180 paires de bases en fin d'apoptose (Samejima K et al. 2001). Cette nucléase existe dans la cellule sous forme de complexe inactif, liée à une chaperone inhibitrice, la DFF45/ICAD (Inhibitor of CAD). Ce complexe est rompu par l'action de la caspase-3 qui clive DFF45 en trois sites différents et permet à DFF40 de former des dimères qui sont alors actifs (Woo EJ et al. 2004).

D'autres évènements comme le clivage des lamines expliquent la condensation nucléaire observée au cours de l'apoptose (Fischer U et al. 2003). La perte de la morphologie des cellules apoptotiques est la conséquence du clivage de protéines du cytosquelette comme la fodrine et la gelsoline (Fischer U et al. 2003).

Un autre substrat très étudié est la poly (ADP-ribose) polymérase ou PARP. Cette protéine est une enzyme nucléaire très abondante qui catalyse la fixation de polymères d'ADP-ribose sur des protéines acceptrices. PARP est recrutée en réponse à des lésions sur l'ADN et devient active en se liant à l'ADN. Elle semble alors impliquée dans la réparation de l'ADN en synthétisant de longs polymères d'ADP-ribose (Dantzer F et al. 1999). Chaque cycle d'ADP-rybosylation est couplé à la consommation d'une molécule de NAD^+ , elle-même métaboliquement équivalente à quatre molécules d'ATP. Au cours de l'apoptose, la PARP est clivée par les caspases effectrices -3 et -7 (D'Amours et al. 1999). Il en résulte que la PARP ne peut plus synthétiser de polymères d'ADP-ribose en réponse à des lésions à l'ADN. La réparation de l'ADN est alors compromise et l'arrêt de la poly ADP-rybosylation permet également de préserver les stocks d'ATP qui sont nécessaires au déroulement de l'apoptose (Fischer U et al. 2003).

3.4 La régulation des caspases

Comme nous l'avons vu lors du déroulement des phases d'induction de l'apoptose, les caspases sont régulées par des inhibiteurs spécifiques. Ces inhibiteurs ont d'abord été découverts chez les virus comme le baculovirus qui se servent de ces

molécules afin d'inhiber l'apoptose de leurs cellules hôtes. Des homologues de ces inhibiteurs de caspases, les IAP (Inhibitors of Apoptosis), ont été retrouvés chez l'homme. Cette famille se caractérise par la présence d'un motif peptidique particulier appelé BIR (Baculovirus IAP Repeats) qui peut être répété plusieurs fois et qui est nécessaire à la liaison et à l'inhibition des caspases (Fesik SW et Shi Y 2001). Les membres de cette famille (XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin, Livin, Ts-IAP, NAIP) inhibent à la fois l'activité des caspases initiatrices et celle des caspases effectrices mais présentent des spécificités d'inhibition pour certaines caspases qui sont propres à chaque IAP (Suzuki Y et al. PNAS 2001). Comme nous l'avons vu, les IAP sont eux-mêmes contrôlés par les protéines mitochondriales Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 qui sont libérées dans le cytosol au cours de l'exécution de la voie intrinsèque de l'apoptose, et se lient aux IAP et les inhibent (Liston P et al. 2003).

Concernant l'activation de la voie extrinsèque, celle-ci est régulée par la protéine FLIP. Cet homologue inactif de la procaspase-8 présente des domaines DED qui permettent son recrutement au niveau des protéines adaptatrices FADD. FLIP va entrer en compétition avec la procaspase-8 et bloquer le recrutement de cette dernière au niveau du complexe du récepteur de mort (Krueger A et al. 2001).

4. Les membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2) constituent les principaux régulateurs de l'apoptose. Cette famille, contenant environ une trentaine de 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 régulateurs de l'apoptose participent à la décision d'entrée en apoptose ou de survie et ceci tout particulièrement au cours de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose.

4.1. Structure

Chez le nématode *C. elegans*, il existe deux protéines de la famille Bcl-2 : CED-9, un facteur anti-apoptotique et EGL-1, un facteur pro-apoptotique. Chez les eucaryotes supérieurs on retrouve une trentaine de membres de la famille Bcl-2 qui jouent des rôles anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques.

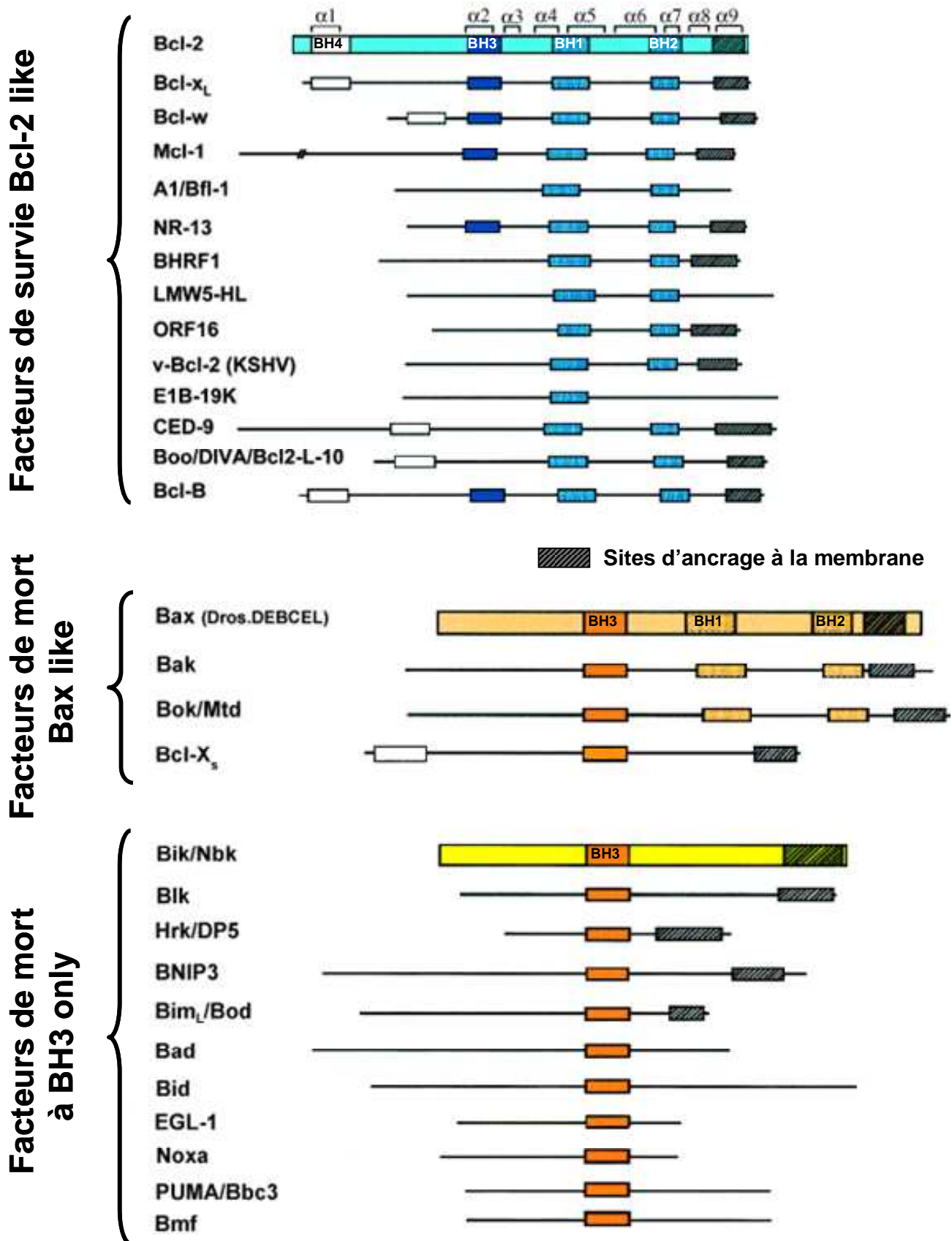


Figure 7 : Les protéines de la famille Bcl-2 (d'après Borner C 2003)

Les homologues de CED-9, les protéines Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl2-L-10 et Bcl-B sont des protéines anti-apoptotiques et font partie du groupe des facteurs de survie Bcl-2 like (Borner C 2003) (figure 7). Les homologues de EGL-1, les protéines Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNIP3, BimL/Bod, Bad, Bid, Noxa, PUMA/Bbc3 et Bmf constituent l'un des sous-groupes de protéines pro-apoptotiques et sont appelés facteurs de mort à BH3-only en référence à leur structure protéique (Borner C 2003) (figure 7). Un dernier groupe de protéines pro-apoptotiques, ne possédant pas d'homologue chez le nématode, est constitué par les protéines Bax, Bak, Bok/Mtd et Bcl-xS qui font partie des facteurs de mort Bax-like (Borner C 2003) (figure 7).

Tous ces membres de la famille Bcl-2 possèdent au moins l'un des quatre motifs conservés : BH1, BH2, BH3 et BH4 (BH pour Bcl-2 homology). Les régions BH1, 2 et 3 lorsqu'elles sont présentes forment un sillon très hydrophobe capable de lier un domaine BH3 appartenant à une autre protéine. Ces trois régions sont simultanément présentes sur les facteurs de survie Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, NR-13 et Bcl-B (figure 7). La région BH4 présente dans les protéines anti-apoptotiques uniquement permet de stabiliser la conformation du sillon hydrophobe BH1-3 lorsqu'il est constitué (Borner C 2003).

Une majorité de protéines de la famille Bcl-2 contient également un domaine carboxy-terminal hydrophobe de 20 acides aminés permettant leur ancrage membranaire et ceci principalement au niveau de la mitochondrie mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et du noyau (Krajewski S et al. 1993) (figure 7).

4.2. Mode d'action et rôle dans les processus apoptotiques

a. Les facteurs de survie de type Bcl-2

Les facteurs humains de survie les plus étudiés Bcl-2 et Bcl-xL présentent les quatre domaines d'homologie, de BH1 à BH4 et un domaine d'ancrage à la membrane qui concernant Bcl-2 principalement, est responsable de leur localisation au niveau des membranes mitochondriales en particulier. Ces protéines présentent dans leur conformation finale, un sillon hydrophobe constitué par les domaines BH1 à BH3 et stabilisé par le domaine BH4. La présence de ce sillon est essentielle au rôle de facteur de survie de ces protéines puisque des mutations dirigées dans les domaines BH abolissent les propriétés anti-apoptotiques de ces protéines (Borner C 2003). Le sillon BH1-BH3 permet en effet aux protéines anti-apoptotiques d'interagir avec le

domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques (figure 8). Cette hétérodimérisation permet aux protéines de type Bcl-2 de séquestrer les membres pro-apoptotiques et d'empêcher leur action. La régulation de l'apoptose par ces protéines résulte donc entre autre du niveau d'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques qui permet d'évaluer si les protéines pro-apoptotiques sont présentes à un taux suffisant pour induire l'apoptose selon un modèle du rhéostat contrôlé par les facteurs de survie de type Bcl-2 (Korsmeyer SJ 1992). Schématiquement, les cellules exprimant plus de protéines pro-apoptotiques seront sensibles à la mort, les autres seront résistantes (Hengartner MO 2000).

b. Les facteurs de mort de type Bax

Les facteurs de mort de type Bax sont très proches structurellement des facteurs de survie Bcl-2 puisqu'ils sont constitués des trois domaines d'homologie BH1 à BH3, par contre ils ne possèdent pas de domaine BH4 (Borner C 2003).

Les facteurs de type Bax sont semble-t-il séquestrés par les molécules de type Bcl-2 dans les cellules normales. A la suite d'un signal apoptotique, les molécules de type Bax vont être libérées des molécules Bcl-2 et vont s'insérer dans la membrane mitochondriale après exposition de leur domaine d'ancrage membranaire (Borner C 2003). Comme nous l'avons vu précédemment, les facteurs de type Bax sont alors capables de s'homodimériser ou d'interagir avec d'autres molécules pour former des canaux à travers la membrane mitochondriale (Ly JD et al. 2003). Ces canaux sont responsables de l'évasion des SIMPs qui sont à l'origine de l'exécution des voies caspase dépendantes et caspase indépendantes de l'apoptose mitochondriale (Antonsson B et Martinou JC 2000) (figure 8).

c. Les facteurs de mort à BH3-only

Les facteurs de mort à BH3-only ont été nommés ainsi car ils partagent seulement la présence du domaine BH3 avec les autres protéines de la famille Bcl-2. Ces facteurs agissent en se nichant par leur domaine BH3 dans le sillon hydrophobe des facteurs de survie Bcl-2. Cette interaction conduit au relargage des facteurs de mort de type Bax (figure 8). La protéine Bid tronquée peut également interagir directement avec Bax et s'insérer dans la membrane mitochondriale pour former un canal (figure 8). Ces facteurs de mort à BH3 seulement sont maintenus sous forme inactive dans les cellules normales.

Signaux apoptotiques : activation des BH3-only (Déprivation de cytokine, de facteurs de croissance, dommages à l'ADN, UV, agents toxiques)

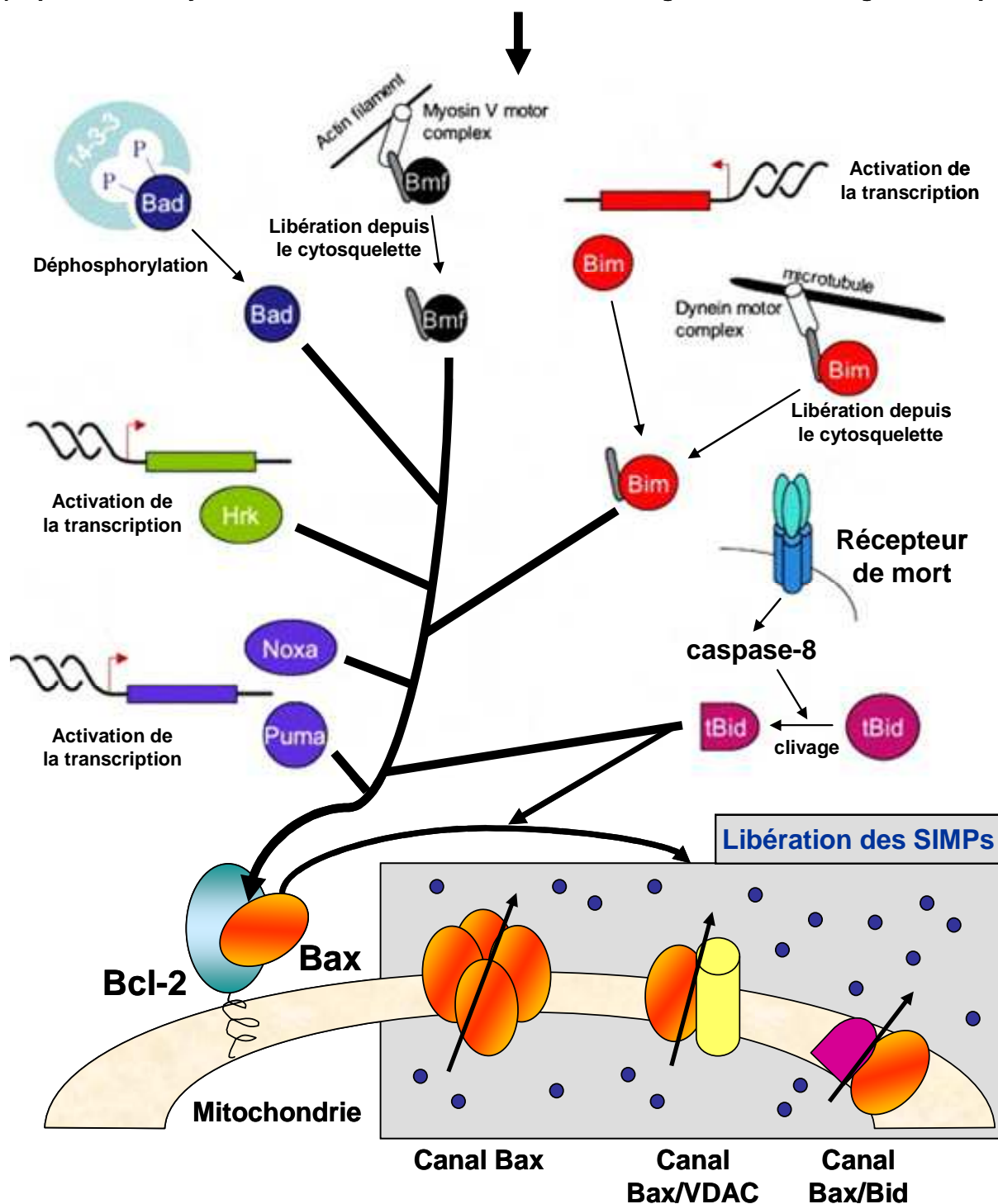


Figure 8 : La régulation de l'apoptose par les protéines de la famille Bcl-2 (adaptée d'après Lucken-Ardjomande S 2005).

La protéine Bad est phosphorylée par les kinases Akt ou MAP kinase dans les cellules normales et cette phosphorylation conduit à sa séquestration par la protéine 14-3-3. L'activation de Bad se fait par déphosphorylation et libération de 14-3-3, en réponse à des signaux apoptotiques. Les protéines Bmf et Bim sont quant à elles séquestrées au niveau du cytosquelette. L'activation d'un signal apoptotique conduit alors au relargage de ces protéines qui peuvent alors aller interagir avec les protéines de type Bcl-2 au niveau de la mitochondrie (Borner C 2003) (figure 8).

Selon le modèle proposé par C. Borner (2003), en réponse à des signaux apoptotiques, une protéine de la famille des facteurs de mort à BH3-only est activée. Cette activation peut résulter d'une induction transcriptionnelle ou de modifications post-traductionnelles conduisant à leur libération dans le cytosol. Les facteurs à BH3-only vont alors aller interagir avec les facteurs de survie de type Bcl-2 au niveau de la membrane mitochondriale. Cette interaction conduit à la libération des facteurs de mort de type Bax qui étaient retenus au niveau des protéines de type Bcl-2. Les protéines de type Bax subissent alors des changements conformationnels conduisant à leur insertion dans la membrane mitochondriale. Les protéines de type Bax vont alors s'oligomériser ou bien interagir avec d'autres protéines telles que Bid ou VDAC et former des canaux. La formation de ces canaux conduit au relargage des SIMPs responsables de l'exécution de l'apoptose mitochondriale (figure 8).

IV- LA THÉRAPIE DE DIFFÉRENCIATION

1. Généralités

Le processus de la transformation cancéreuse est un processus complexe qui implique généralement une accumulation progressive d'erreurs génétiques influencée par des facteurs environnementaux. Toutefois, même si les étapes conduisant à la transformation cancéreuse diffèrent en fonction du type cellulaire concerné, elles ont pour conséquence une altération des processus de différenciation et de maturation des cellules (Leszczyniecka M et al. 2001).

Les traitements classiques contre le cancer, radiothérapie et chimiothérapie, sont généralement efficaces mais sont peu spécifiques, c'est-à-dire qu'ils touchent également les cellules normales de l'organisme. Ces traitements sont également hautement toxiques et peuvent conduire à l'apparition de résistance aux produits chimiques utilisés (Harris AL et Hochhauser D 1992).

Depuis quelques années, une nouvelle approche s'est développée autour du concept de la thérapie de différenciation (Sachs L 1978, Leszczyniecka M et al. 2001).

Cette thérapie fait appel à des agents qui sont capables seuls ou en combinaison avec des agents chimiques classiques, de freiner la prolifération des cellules cancéreuses et de réinitialiser les programmes de différenciation cellulaire qui ont été modifiés au cours de la transformation maligne (Sachs L 1978, Leszczyniecka M et al. 2001).

A priori, du fait de leur caractère plus ou moins différencié tous les types de cancers peuvent être concernés. Toutefois, à ce jour un nombre restreint de cancers susceptibles de répondre aux agents différenciants ont été étudiés. Les cancers les plus concernés par le développement de cette thérapie de différenciation sont les leucémies (Tsiftoglou AS et al. 2003). De plus en fonction du type de leucémie concerné, les cellules malignes présentent un caractère hautement indifférencié et ceci particulièrement dans les leucémies aiguës. Les thérapies différenciantes étudiées en clinique ou en laboratoire concernent également les neuroblastomes (Sidell N et al. 1983, Ponzoni M et al. 1995), le cancer de la thyroïde (Coelho SM et al. 2005), le mélanome (Leszczyniecka M et al. 2001), ou encore les cancers

hormono-dépendants comme le cancer du sein ou celui de la prostate (Martirosyan AR et al. 2004, Beer TM et Myrthue A 2004).

Dans la suite de cette étude bibliographique, nous nous intéresserons plus particulièrement aux thérapies de différenciation et aux agents différenciants utilisés dans le traitement des leucémies.

2. La thérapie de différenciation des leucémies

L'induction de la différenciation comme stratégie thérapeutique a trouvé ses plus évidentes applications dans les hémopathies malignes et notamment les leucémies. En effet, les cellules hématopoïétiques subissent un programme génétiquement régulé de maturation dans lequel les cellules souches pluripotentielles, acquièrent graduellement leur spécificité de lignée et les caractéristiques fonctionnelles de cellules différenciées.

L'hématopoïèse normale est fortement régulée par une grande variété de facteurs de croissance et de cytokines qui favorisent la prolifération des cellules souches et la maturation des différentes cellules des lignées hématopoïétiques (Ghysdael J et al. 2000). Ces facteurs de croissance, en se fixant sur leurs récepteurs, activent différentes voies de transduction du signal qui conduisent à l'activation ou à l'expression de certains gènes spécifiques au cours de la maturation cellulaire. Dans le cas des cellules leucémiques, cette régulation est perdue, les cellules ne répondent plus aux facteurs de croissance et de différenciation et présentent des phénotypes de cellules indifférenciées (Tenen DG 2003).

Le mode d'action des agents différenciants, qu'ils soient chimiques ou naturels, consiste généralement à activer ou à réactiver les voies de transduction du signal normalement activées par la fixation des facteurs hématopoïétiques et à favoriser la transcription de gènes régulateurs de l'hématopoïèse (Tsiftoglou AS et al. 2003).

De nombreux agents différenciants ont donc été identifiés au cours des dernières années, ils présentent des modes d'action différents mais ils ont tous démontré un potentiel curatif soit en utilisation seule, soit en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques classiques en favorisant leur action pro-apoptotique.

Les principaux agents différenciants sont l'acide rétinoïque, qui fût l'un des premiers utilisés, la vitamine D₃ et ses analogues, les esters de phorbol, les inhibiteurs des histones désacétylases et certains agents chimiothérapeutiques classiques.

3.1. L'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque est un dérivé de la vitamine A qui joue un rôle dans la régulation de nombreux phénomènes physiologiques tels que la survie et la différenciation de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques (Leszczyniecka M et al. 2001).

Les premières études menées sur cet agent ont démontré que l'acide rétinoïque tout-trans (ATRA) était capable d'induire la différenciation granulocytaire des cellules HL-60 issues d'une lignée de leucémie promyélocytaire (Drach J et al. 1994). Par la suite, l'ATRA a démontré son efficacité dans le traitement de cancer et particulièrement des leucémies myéloïdes aiguës de type promyélocytaire (APL, LAM de type M3) (Degos L et Wang ZY 2001).

Il existe deux types de récepteurs nucléaires aux rétinoïdes, les RAR (retinoic acid receptor) et les RXR (retinoid X receptor). Dans les conditions physiologiques, en l'absence de ligand, ces récepteurs se lient à des répresseurs de la transcription qui recrutent des protéines comme les histones désacétylases. La désacétylation des histones conduit à un remodelage de la chromatine qui bloque l'activation de la transcription des gènes (Grignani F et al. 1998). La fixation de l'acide rétinoïque sur le récepteur RAR α conduit à la dissociation du complexe contenant les histones désacétylase et permet l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la maturation hématopoïétique (Grignani F et al. 1998, Tsiftoglou AS et al. 2003).

La leucémie promyélocytaire aiguë (APL) est caractérisée par des translocations chromosomiques conduisant à la production de protéines de fusion issues des translocations entre le locus du récepteur RAR α et les locus PML (promyelocytic leukemia) ou PLZF (promyelocytic leukaemia zinc finger). Ces protéines perturbent la dissociation du complexe récepteur aux rétinoïdes-histones désacétylases. Toutefois, chez les patients présentant la fusion PML-RAR α , de fortes doses d'ATRA sont capables de restaurer ce processus et conduisent à l'induction de la différenciation des cellules leucémiques promyélocytaïres (Grignani F et al. 1998). Ces premières études sont à la base du concept de thérapie de différenciation et ont conduit au développement et à l'identification de plusieurs autres agents différenciants.

3.2. La vitamine D₃ et ses analogues

La forme physiologiquement active de la vitamine D₃ est la 1 α ,25(OH)₂D₃, ce produit est capable d'induire la maturation des cellules myéloïdes normales et la différenciation des cellules de leucémie myéloïde vers la lignée granulocytaire/macrophage. La vitamine D₃ se lie à son récepteur, le VDR (récepteur à la vitamine D), qui a été identifié dans de nombreuses cellules hématopoïétiques (Kizaki M et al. 1991). La fixation de la 1 α ,25(OH)₂D₃ conduit à l'activation du VDR qui active la transcription de gènes cibles au niveau d'éléments de réponse au VDR (VDRE) sur l'ADN.

La principale limitation à l'utilisation de la vitamine D₃ en clinique est son fort pouvoir hypercalcémiant. De nombreux analogues de la vitamine D₃ ont donc été développés afin de garder les propriétés différenciantes tout en limitant le pouvoir hypercalcémiant. Ainsi les analogues 24-oxo-vitamine D₃ et 20-épi-2,22-diméthyl-1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ ont démontré des activités prodifférenciantes sur les lignées leucémiques HL-60, NB4 ou U937 tout en présentant une faible activité hypercalcémiant (Fujishima T et al. 2001, Shiohara M et al. 2001).

3.3. Les esters de phorbol

Le phorbol myristate acétate (PMA ou TPA) était initialement connu pour ces propriétés tumorigènes et notamment pour sa capacité à induire des tumeurs cutanées chez la souris (Baird WM et Boutwell RK 1971). Toutefois, cet agent a rapidement été identifié en tant qu'agent différenciant et notamment sur des cellules leucémiques (Huberman E et Callahan MF 1979). Le PMA se lie à la PKC, notamment à la PKC β , et active cette voie de transduction du signal. Lorsque la PKC est activée elle passe du compartiment cytosolique au compartiment membranaire d'une part et nucléaire d'autre part, où elle active la transcription de gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique (Carey JO et al. 1996, Zheng X et al. 2002). Par ailleurs, le PMA active également la voie de ERK (extracellular signal-regulated kinase). L'activation de la voie de ERK a été associée à la différenciation hématopoïétique normale (Secchiero P et al. 2004, Rouyez MC et al. 1997) et à l'induction de la différenciation des cellules leucémiques. En effet, il a été démontré que le PMA activait la voie de ERK au cours de la différenciation monocyttaire des cellules U937 et HL-60 (Pulverer B et al. 1993, Kharbanda S et al. 1994), et au cours

de la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562 (Racke FK et al. 1997, Whalen AM et al. 1997).

Malgré son potentiel tumorigène, le PMA a été testé en clinique humaine (Han ZT et al. 1998) et même si les résultats obtenus semblaient encourageants, son usage reste limité.

3.4. Les inhibiteurs des histones désacétylases

Dans des conditions normales, les promoteurs et leurs zones de régulation sont difficilement accessibles aux facteurs de transcription. Pour activer les gènes cibles, ces zones doivent acquérir une conformation plus lâche pour permettre l'accès à des régulateurs. L'acétylation des histones conduit à diminuer les interactions entre l'ADN et les histones ce qui permet l'activation de la transcription des gènes de la zone concernée. La désacétylation des histones par les histones désacétylases (HDAC) conduit à augmenter les interactions ADN-histones et réprime la transcription des gènes impliqués dans les phénomènes de différenciation cellulaire, de prolifération et d'apoptose. L'utilisation d'inhibiteurs des HDAC permet la dissociation des complexes et active la transcription des gènes intervenant dans la différenciation cellulaire.

Certains acides gras à courtes chaînes ont été étudiés pour leurs propriétés d'inhibition des HDAC et d'induction de la différenciation des cellules leucémiques. Le butyrate est le plus connu de ces acides gras pro-différenciants, il a été démontré qu'il induisait la différenciation monocyttaire des cellules HL-60 (Zucker RM et al. 1983) et la différenciation érythrocytaire des cellules K562 (Witt O et al. 2000). Des molécules apparentées telles que le phénylbutyrate de sodium ou le phénylacétate de sodium ont démontré des propriétés similaires (Witt O et al. 2000). D'autres inhibiteurs des HDAC tels que la trichostatine A ou l'acide suberoylanilide hydroxamique sont également capables d'induire la différenciation des cellules leucémiques (Richon VM et al. 1996, Richon VM et al. 1998).

3.5. Les agents chimiothérapeutiques classiques

Bien que les drogues cytotoxiques induisent principalement l'apoptose dans les cellules leucémiques, les mêmes agents peuvent déclencher, à des doses relativement basses et sub-toxiques, l'activation de la différenciation cellulaire plutôt qu'un programme de mort cellulaire. Les inhibiteurs de la synthèse d'ADN, tels que

l'ARA-C ou des inhibiteurs de l'ADN polymérase α , tels que l'aphidicoline, sont capables d'induire la maturation monocytique des cellules HL-60 (Griffin J et al. 1982). Dans les cellules K562 ces mêmes agents thérapeutiques inhibiteurs de la synthèse d'ADN dont fait aussi partie le 5-fluorouracile, induisent également une différenciation érythrocytaire (Murate T et al. 1990, Yang YW et Chang YH 1995, Takagaki K et al. 2005).

On a observé un phénomène semblable dans le cas des anthracyclines, telles que la doxorubicine (Jeannesson P et al. 1997), avec l'hydroxyurée (Park JI et al. 2001) ou encore avec des agents inhibiteurs de la formation des microtubules tels que la vincristine (Leung MF et Sartorelli AC 1992).

L'arsenic trioxyde (ATO) a quant à lui démontré son efficacité dans le cas des leucémies aiguës promyélocyaires. L'ATO à faibles doses peut en effet induire la différenciation de la lignée leucémique promyélocytaire NB4 (Cai X et al. 2000). L'ATO est maintenant utilisé en thérapeutique en combinaison avec l'ATRA dans les cas d'APL résistante à l'ATRA seul (Agis H et al. 1999).

V- LA MÉGACARYOCYTOPOÏÈSE

1. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse se définit comme un ensemble de mécanismes aboutissant à la production continue et régulée des cellules sanguines ayant pour but d'assurer l'homéostasie du tissu hématopoïétique. La production par la moelle osseuse des cellules différenciées, globules rouges (érythrocytes), polynucléaires (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), lymphocytes, monocytes et plaquettes qui apparaissent dans le sang, est le résultat d'un processus de différenciation progressif et multiple (Najman 1994). Les cellules hématopoïétiques peuvent être regroupées en quatre compartiments en fonction de leur degré de différenciation.

1.1. Les différents compartiments de l'hématopoïèse

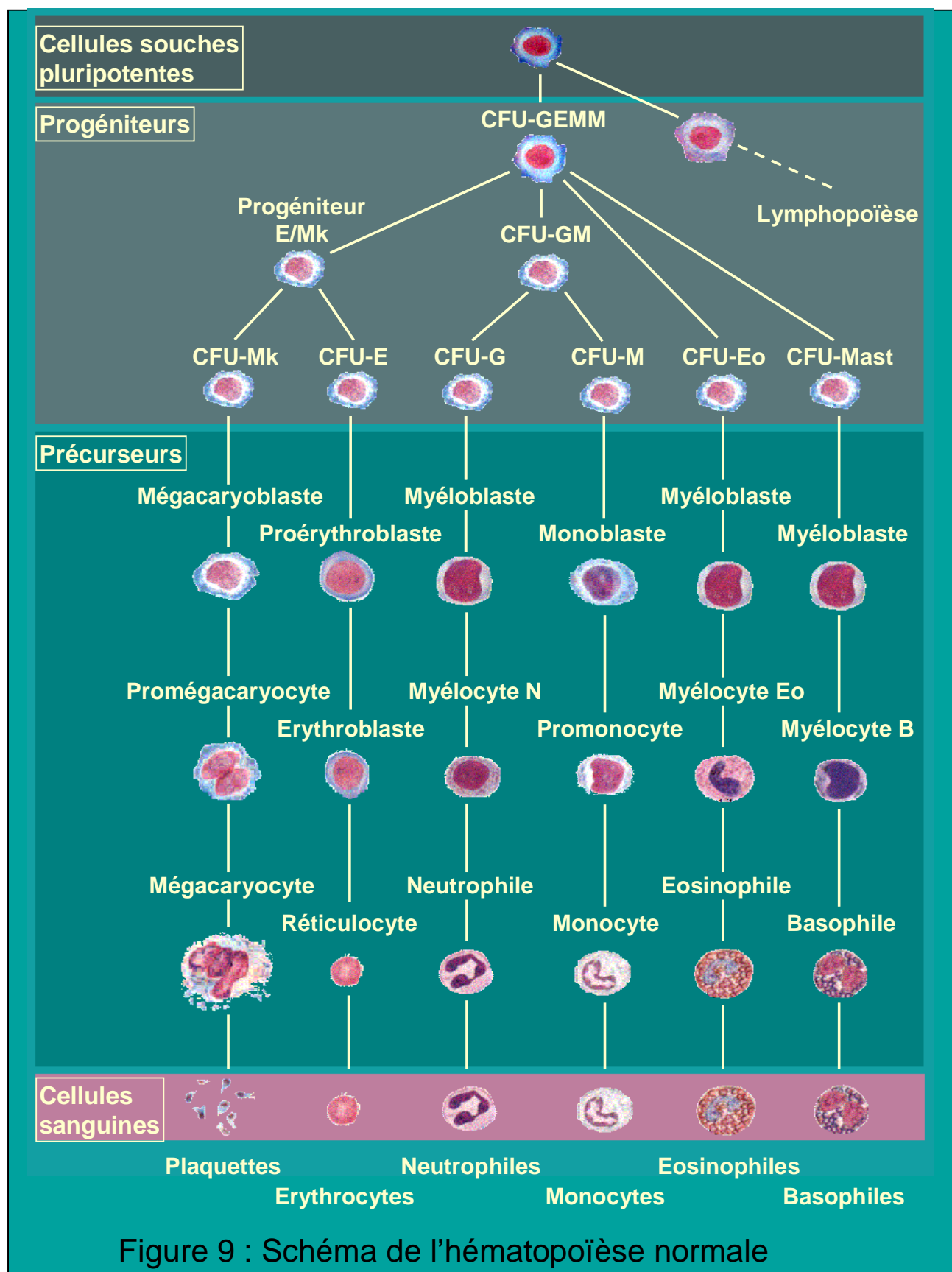
Les quatre compartiments de l'hématopoïèse sont ceux des cellules souches pluripotentes, des progéniteurs et des précurseurs qui sont localisées dans la moelle osseuse et celui des cellules matures qui se retrouvent dans la circulation sanguine (Najman A 1994) (figure 9).

a. Le compartiment des cellules souches

Minoritaires en nombre, les cellules souches maintiennent une hématopoïèse stable et équilibrée. Elles ont trois caractéristiques principales : la capacité d'autorenouvellement, la totipotence et la capacité d'engagement en différenciation cellulaire (Vial JP et Praloran V 2005) (figure 9).

L'autorenouvellement traduit la capacité d'une cellule à se diviser en deux cellules filles qui lui sont identiques. Cette propriété est spécifique des cellules souches dans la lignée hématopoïétique, ces cellules constituent un stock cellulaire stable et disponible en cas de besoin (Najman A 1994).

La totipotence désigne la capacité des cellules à donner naissance aux différentes lignées hématopoïétiques (Vial JP et Praloran V 2005).



La différenciation conduit à la production de cellules matures et fonctionnelles à partir des cellules souches. La différenciation nécessite l'action d'un stimulus de détermination qui oriente progressivement une cellule souche ou sa descendance vers une lignée particulière. Cette orientation implique la perte progressive de la pluripotentialité et l'acquisition de nouvelles fonctions (Vial JP et Praloran V 2005).

b. Le compartiment des progéniteurs

Issus des cellules souches qui s'engagent en différenciation, les progéniteurs ne sont pas identifiables morphologiquement. Ils sont mis en évidence par leur capacité à constituer en culture *in vitro* des colonies de cellules morphologiquement identifiables (Vial JP et Praloran V 2005).

Chaque nom de progéniteur est défini par l'association du préfixe CFU ("Colony Forming Unit") suivi de(s) lettre(s) qui caractérisent les lignées dont il garde le potentiel de différenciation (figure 9).

A partir du progéniteur multipotent CFU-GEMM (CFU-Granuleuse, Erythrocytaire, Macrophage et Mégacaryocytaire) issu des cellules souches, se différencient les progéniteurs de toutes les lignées myéloïdes (figure 9).

Les progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytaires sont issus d'un même progéniteur bipotent qui évoluera vers les progéniteurs érythroïdes qui sont nommés BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroïde) et CFU-E et vers les progéniteurs mégacaryocytaires BFU-MK et CFU-MK (figure 9).

Les progéniteurs des neutrophiles et des monocytes/macrophages évoluent de manière identique. Ils sont issus d'une même cellule, le CFU-GM (CFU-Granulo-Macrophagique) qui se différenciera en progéniteur CFU-G conduisant aux neutrophiles et CFU-M conduisant aux monocytes.

On distingue également les progéniteurs des éosinophiles CFU-Eo et des basophiles CFU-Mast (Najman A 1994) (figure 9).

c. Le compartiment des précurseurs

Les précurseurs hématopoïétiques sont les premières cellules morphologiquement identifiables de chaque lignée. Ce ne sont plus des cellules souches car elles ont perdu toute capacité d'autorenouvellement mais gardent un faible pouvoir de prolifération. Cette dernière étape est marquée par une maturation de chaque lignée pour aboutir à la cellule terminale entièrement fonctionnelle. Les précurseurs les plus

immatures sont les trois types de myéloblastes dont seront issus les polynucléaires, les proérythroblastes qui conduiront aux hématies, les mégacaryoblastes à la base de la lignée mégacaryocytaire générant les plaquettes, et les monoblastes dont seront issus les monocytes (figure 9). Tous ces précurseurs sont localisés dans la moelle osseuse (Najman A 1994).

d. Le compartiment des cellules matures

L'ensemble de l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse. Seules les cellules terminales, matures et fonctionnelles, vont passer dans le sang : polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, érythrocytes ou hématies, plaquettes et monocytes. Les monocytes seront de plus capables de nouvelles différenciations après leur séjour sanguin. Le temps nécessaire à la production des cellules matures est variable selon les lignées et selon les besoins.

1.2. Régulation de l'hématopoïèse

Les cellules sanguines ont une durée de vie limitée. Ces cellules meurent d'épuisement métabolique ou d'agression et sont donc remplacées en permanence. La régulation médullaire de la différenciation et de la maturation hématopoïétique, des étapes les plus précoces jusqu'à la maturation terminale, dépend essentiellement des cytokines et de l'existence d'un microenvironnement médullaire (Vial JP et Praloran V 2005).

Les facteurs de croissance hématopoïétiques ou cytokines hématopoïétiques sont généralement produits par les cellules du microenvironnement médullaire ou les cellules hématopoïétiques elles-mêmes, mais peuvent également être produits au niveau d'organes périphériques comme le foie ou les reins (thrombopoïétine, érythropoïétine) et être apportés par la circulation sanguine.

On distingue également les cytokines ayant un large spectre d'action (IL-1, IL-6, SCF, IL-3, GM-CSF,...) et les cytokines ayant une activité restreinte à un lignage hématopoïétique (IL-5, érythropoïétine (EPO), thrombopoïétine (TPO)).

L'IL-1 (interleukine-1), l'IL-6, et le SCF (Stem cell factor) agissent sur des progéniteurs primitifs pluripotents en activant le cycle cellulaire des progéniteurs quiescents. Les progéniteurs activés reçoivent un second message tel que l'IL-3 ou le GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) qui vont induire une prolifération prolongée des progéniteurs pluripotents et les rendre répondeurs à des

facteurs de croissance spécialisés qui vont les orienter vers les différents lignages hématopoïétiques. Ainsi, le G-CSF oriente les progéniteurs vers la lignée granulocytaire, le M-CSF vers la lignée monocytaire, l'EPO vers la lignée érythrocytaire, l'IL-5 vers la granulopoïèse éosinophile (Vial JP et Praloran V 2005). La TPO quant à elle, agit à différentes étapes de la mégacaryocytopoïèse, des progéniteurs jusqu'au compartiment de maturation plaquettaire. C'est cette dernière voie, celle de la différenciation mégacaryocytaire et de sa régulation, qui va nous intéresser dans la suite de cette étude bibliographique.

2. La mégacaryocytopoïèse

L'une des voies de l'hématopoïèse est la différenciation mégacaryocytaire appelée mégacaryocytopoïèse, mégacaryopoïèse ou encore thrombopoïèse conduisant à la production de plaquettes.

2.1. Définition

La mégacaryocytopoïèse est un système de différenciation complexe qui aboutit à la maturation d'un mégacaryocyte dont le cytoplasme se fragmente pour libérer les plaquettes dans la circulation sanguine. Un mégacaryocyte mature produit environ 2 à 3.10^3 plaquettes. Les plaquettes sont des cellules anucléées de petites tailles (2 à 5 μm) ayant un rôle essentiel dans l'hémostase et la coagulation (Sébahoum G 2005).

2.2 Le déroulement de la mégacaryocytopoïèse

a. Le compartiment des progéniteurs

Comme toutes les cellules hématopoïétiques, les mégacaryocytes proviennent des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Dans le modèle classique de l'hématopoïèse, les CSH donnent naissance à deux lignées avec l'apparition d'un progéniteur lymphoïde commun capable de produire des lymphocytes et l'apparition d'un progéniteur myéloïde (CFU-GEMM) commun à l'origine des lignées granulocytaire, érythrocytaire, mégacaryocytaire et monocytaire (figure 9). Par la

suite, les lignées érythroïde et mégacaryocytaire se différencient à partir d'un progéniteur commun mégacaryocyte-érythrocyte, lui-même issu du progéniteur myéloïde commun. Toutefois, des études récentes supposent que le progéniteur commun mégacaryocyte-érythrocyte pourrait être directement issu des CSH.

Quoiqu'il en soit, à partir du progéniteur bipotent, se différencient les progéniteurs précoces érythrocytaires (BFU-E) et mégacaryocytaires (BFU-MK) (figure 9).

Le BFU-MK est une cellule diploïde qui, isolée et cultivée sur milieu semi-solide en présence de facteurs de croissance donne des colonies de plus de 50 cellules en 21 jours.

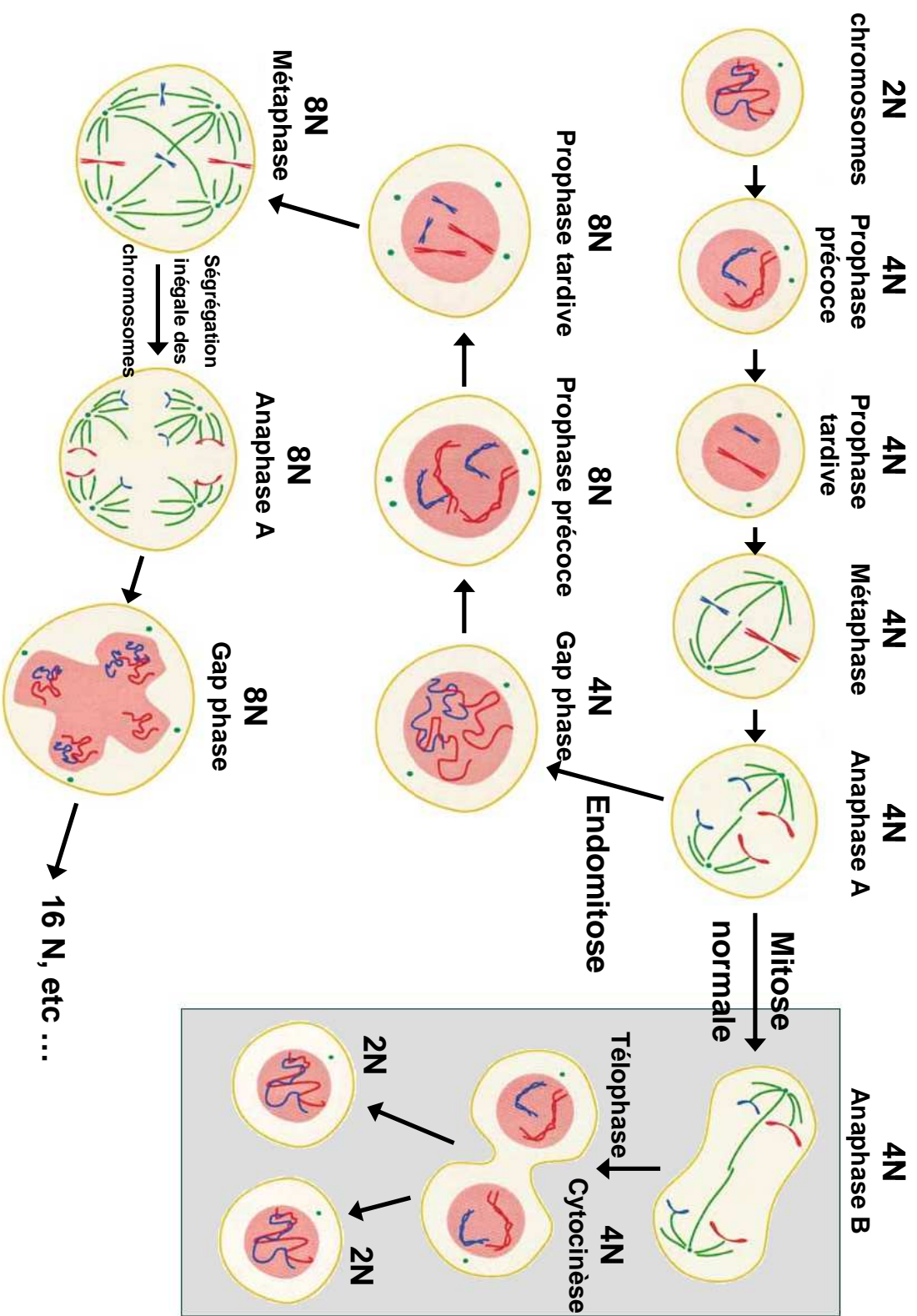
La première cellule qui est complètement engagée dans la lignée mégacaryocytaire est le CFU-MK qui est directement issue des BFU-MK. Cette cellule est caractérisée par un phénotype membranaire particulier déterminé par l'apparition d'un marqueur membranaire spécifique de la lignée mégacaryocytaire, le CD41a ou glycoprotéine IIb, qui sera conservé jusqu'au stade des plaquettes. La peroxydase plaquettaire, un autre marqueur de la lignée mégacaryocytaire, semble également apparaître à ce stade.

Les CFU-MK se différencient en promégacaryoblastes, cellules ayant un potentiel prolifératif très faible. Les promégacaryoblastes sont des cellules transitionnelles non morphologiquement reconnaissables et qui correspondent à un ensemble de stades intermédiaires entre les progéniteurs précoces proliférants et les cellules mégacaryocytaires postmitotiques.

Deux phénomènes débutent à partir de ce stade, un phénomène d'endomitose et un phénomène de maturation cytoplasmique et membranaire. La cinétique de ces deux phénomènes ou la concomitance de leur déroulement est encore en débat mais chacun est essentiel au développement de mégacaryocytes matures pouvant délivrer des plaquettes fonctionnelles.

b. L'endomitose

L'endomitose correspond à une réplication de l'ADN sans division cytoplasmique et nucléaire en deux cellules filles. Ce processus conduit à la polyploïdisation des mégacaryocytes c'est-à-dire à l'obtention d'un contenu en ADN supérieur à 2N ou 4N chromosomes. Le mégacaryocyte est une des rares cellules qui, au cours de sa différenciation normale, devient obligatoirement polyploïde.



**Figure 10 : Cycles cellulaires mitotiques et endomitotiques
(D'après Ravid 2002)**

Le processus exact de l'endomitose des mégacaryocytes n'est encore totalement élucidé mais des mécanismes généraux ont été avancés au cours des dernières années.

Plusieurs études ont montré que le cycle cellulaire des mégacaryocytes en cours de polyploïdisation était composé de séquences répétées de réplication de l'ADN, séparées par de courts intervalles (Odell TT et Jackson CW 1968, Zhang Y et al. 1996), excluant ainsi l'hypothèse d'une synthèse continue d'ADN.

L'étude de la prolifération de mégacaryocytes issus de moëlle osseuse et cultivés en présence de facteurs de croissance a permis de démontrer que l'endomitose correspond en fait à une mitose incomplète (figure 10). En effet, les phases G1, S et G2 sont normales ainsi que les premières étapes de la mitose. Dans la phase tardive de l'anaphase, anaphase B, il n'y a pas d'élongation du fuseau mitotique et donc pas de migration des chromosomes à chacun des deux pôles de la cellule (figure 10). Par la suite, il n'y a pas non plus de télophase, l'enveloppe nucléaire se reforme, englobant les deux lots de chromosomes dans le même noyau et ce au sein d'une seule cellule puisqu'il n'y a également pas de division du cytoplasme (cytocinèse) (figure 10) (Nagata Y et al. 1997, Vitrat N et al. 1998).

La régulation de ce cycle cellulaire tout à fait particulier n'est pas encore complètement élucidée, toutefois, il semblerait que le processus d'endomitose soit principalement dû à une augmentation de l'activité des régulateurs de la phase G1 ainsi qu'à une disparition de certaines phases de la mitose.

L'étude de l'expression et de l'activité des complexes cyclines-CDK a en effet permis de mettre en évidence le rôle des cyclines de type D au cours de l'endomitose. En effet, plusieurs études ont démontré que la cycline D3 était fortement exprimée dans les lignées cancéreuse mégacaryocytaires et dans les mégacaryocytes normaux (Wang Z et al. 1995, Zhang Y et al. 1996, Zimmet JM et al. 1997). D'autre part, il a été également montré dans ces cellules qu'une induction de la polyploïdisation induisait une augmentation de l'expression de la cycline D3 (Wang Z et al. 1995, Zhang Y et al. 1996, Zimmet JM et al. 1997). Une surexpression de la cycline D3 dans les mégacaryocytes de souris transgéniques induit également une augmentation de la ploïdie (Zimmet JM et al. 1997).

Concernant la cycline D1, elle jouerait le même rôle que la cycline D3 mais son expression et son activité semblent plus modérées (Sun S et al. 2001).

Dans le cas des cellules en cours de différenciation mégacaryocytaire, il a été démontré que la cycline D3 s'associait avec la CDK2 et que ce complexe présentait une très forte activité kinase dans les cellules polyploïdes (Datta NS et al. 1998).

Ces études illustrent bien le rôle crucial des régulateurs de la phase G1 dans l'établissement de la répétition des cycles endomitotiques conduisant à la polyploïdisation des mégacaryocytes.

En ce qui concerne la phase de mitose proprement dite, de nombreuses études ont porté sur l'expression de la cycline B1 au cours des premières étapes de la mitose dans les mégacaryocytes engagés dans un cycle cellulaire endomitotique.

Il semble toutefois que la cycline B1 soit présente dans les mégacaryocytes endomitotiques et qu'elle soit associée au fuseau mitotique permettant ainsi l'activation de CDK1 et la condensation des chromosomes. Elle est aussi dégradée normalement permettant ainsi la progression vers l'anaphase (Roy L et al. 2001).

Ainsi les premières phases de la mitose sont normales au cours du processus d'endomitose. Par contre, il a été montré que les cellules en cours de polyploïdisation ne passaient pas par les étapes de télophase et de cytokinèse (Nagata Y et al. 1997, Vitrat N et al. 1998).

Récemment, Aurora B, un membre de la famille des kinases Aurora, a été décrite comme potentiellement impliquée dans le processus endomitotique. Chez la levure, la perte de l'analogue d'Aurora B induit une ségrégation asymétrique des chromosomes et la mort des cellules (Francisco L et al. 1994). La ségrégation asymétrique des chromosomes étant un phénomène observé au cours de l'endomitose, les efforts se sont accentués afin de déterminer l'implication d'Aurora B dans la disparition de la télophase et de la cytokinèse (Terada Y 2001). Très récemment, il est apparu que cette protéine serait en fait présente et fonctionnelle au cours de l'endomitose (Geddis AE et Kaushansky K 2004). Toutefois, une autre étude précise que Aurora B, bien que présente, serait localisée de façon anormale et qu'elle serait même absente dans la phase tardive de l'anaphase du cycle endomitotique.

D'autres facteurs pourraient également intervenir dans la polyploïdisation des mégacaryocytes. Ainsi, le rôle des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que les protéines p21 et p27 a également été étudié.

En effet, il a été démontré que les inhibiteurs des CDK, les protéines de la famille Cip/Kip, tels que p21, p27 ou p57 pouvaient avoir un rôle crucial au cours des processus de différenciation dans divers types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques (Jiang H et al. 1994, Missero C et al. 1996, Steinman RA et al. 1994, Zhang P et al. 1999). De plus, p21 a également été impliquée dans les processus de polyploïdisation de divers modèles cellulaires. Ainsi, p21 induit la

polyploïdisation des hépatocytes en inhibant la cytocinèse. Une surexpression de p21 conduit également à l'apparition de phénomènes d'endoréplication dans les lignées Saos-2 (ostéosarcome) et HeLa (cancer du col de l'utérus) (Niculescu AB et al. 1998).

En ce qui concerne les mégacaryocytes, une forte expression de p21 et de p27 a été trouvée au cours de la différenciation (Taniguchi T et al. 1999). De plus, une suractivation de la transcription de p21 a été observée lors de l'induction de la différenciation mégacaryocytaire et une surexpression provoquée de p21 conduit également à l'obtention d'un noyau polylobé dans des lignées cancéreuses de type mégacaryocytaire (Kikuchi J et al. 1997, Matsumura I et al. 1997).

In vivo, dans des modèles de souris transgéniques, il a été montré d'une part que l'absence de p21 fonctionnelle n'induisait pas de fortes perturbations de la polyploïdisation des mégacaryocytes (Baccini V et al. 2001). D'autre part, la surexpression de p21 induit une diminution de la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques mais n'induit pas de modification de leur maturation (Albanese P et al. 2002). Concernant la lignée mégacaryocytaire, la surexpression de p21 n'induit pas de modification de la numération plaquettaire (Deng C et al. 1995, Albanese P et al. 2002). Toutefois, une étude précise du rôle de p21 au cours de l'endomitose semble indiquer qu'une forte expression de p21 dans les mégacaryocytes ayant atteint une ploïdie importante permet de sortir du cycle endomitotique et de poursuivre la maturation cytoplasmique (Baccini V et al. 2001).

Ainsi le cycle cellulaire endomitotique des mégacaryocytes est proche du cycle cellulaire normal avec une succession de phases G1/S/G2/M. Toutefois, la phase de mitose est incomplète puisqu'à l'anaphase A succède une phase de transition avant l'entrée à nouveau dans une phase G1 sans passer par la télophase et la séparation en deux cellules filles. Ce phénomène est vraisemblablement dû à une augmentation de l'expression et de l'activité des régulateurs de la phase G1 tels que les cyclines de type D et la CDK2 et d'autre part à un fonctionnement anormal des régulateurs de l'anaphase tardive, de la télophase et de la cytocinèse tel que la protéine kinase Aurora B. Néanmoins le mécanisme précis de la régulation du cycle endomitotique reste inconnu à ce jour et semble relativement complexe faisant vraisemblablement intervenir des inhibiteurs du cycle cellulaire comme la protéine p21.

Le processus d'endomitose est essentiel à la physiologie mégacaryocytaire en ce sens que la polyploïdisation permet une amplification fonctionnelle de l'expression des gènes ce qui conduit probablement à une augmentation de la synthèse des

protéines plaquettaires et à une augmentation de la taille des cellules (Raslova H et al. 2003). Cette augmentation de la synthèse protéique permet d'accroître la synthèse des marqueurs plaquettaires et permet d'accélérer la maturation cytoplasmique et membranaire des mégacaryocytes.

c. La maturation cytoplasmique et membranaire

La maturation des mégacaryocytes commence dès le stade 2N chromosomes et se produit essentiellement quand le phénomène d'endomitose s'arrête. Cette maturation se traduit par une modification progressive de l'expression de marqueurs membranaires caractéristiques de la lignée mégacaryocytaire.

Les progéniteurs mégacaryocytaires précoces BFU-MK et CFU-MK décrits précédemment expriment le marqueur CD34 comme tous les autres progéniteurs hématopoïétiques. Le CD34 disparaît lorsque la maturation du mégacaryocyte débute. Le marqueur CD41 apparaît lui aussi précocement au stade de CFU-MK mais sera conservé jusqu'au stade des plaquettes.

Les marqueurs membranaires qui vont ensuite apparaître à la surface du mégacaryocyte constitueront des complexes ayant des fonctions de récepteurs qui seront conservés sur les plaquettes et participeront à l'adhésion et à l'agrégation plaquettaire. L'apparition progressive de ces marqueurs témoigne de l'avancement de la maturation du mégacaryocyte (Lepage A et al. 2000).

Le marqueur CD61 (GpIIIa) apparaît après le CD41 et forme un complexe avec ce dernier. Le complexe CD41-CD61 (GpIIb-IIIa) constitue un récepteur pour les protéines adhésives, le fibrinogène, la fibronectine, le facteur von Willebrand et la vitronectine (Sébahoun G 2005).

La glycoprotéine Ib (GpIb ou CD42b) apparaît aussitôt après et forme un complexe avec la GpIX qui apparaît simultanément. Lorsque la GpV apparaît ensuite elle se complexe avec GpIb-GpIX et ce nouveau complexe (GpIb-V-IX) appelé CD42 constitue un récepteur fonctionnel au facteur von Willebrand d'agrégation plaquettaire (Lepage A et al. 2000, Sébahoun G 2005).

La GpIV ou CD36 apparaît encore un peu plus tard et constituera le récepteur de la thrombospondine (Sébahoun G 2005).

En parallèle, au cours de la phase terminale de la maturation, on observe également la production et la mise en place d'organelles plaquettaire conduisant principalement à l'apparition de membranes de démarcation et de granulations dans le mégacaryocyte (Sébahoun G 2005).

Les membranes de démarcation correspondent à un réseau membranaire de citernes et de tubules qui établit une continuité avec la membrane externe (Patel SR et al. 2005). Ce système divise le cytoplasme en territoires plaquettaires et sert principalement de réservoir de membranes pour la constitution des futures plaquettes (Patel SR et al. 2005, Sébahoun G 2005).

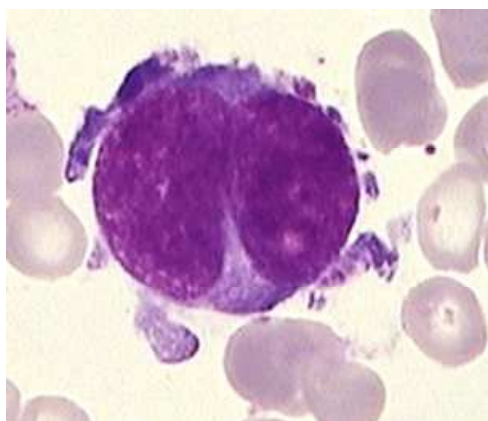
Plusieurs types de granulations peuvent être distinguées en fonction de leur contenu mais aussi en fonction de leur taille et de leur aspect. Les granulations α sont les plus nombreuses. Elles ont pour origine l'appareil de Golgi et contiennent de nombreuses substances telles que le facteur plaquettaire 4 (PF4), la β -thromboglobuline, la thrombospondine, le facteur von Willebrand (vWF), le platelet-derived growth factor (PDGF) et le fibrinogène (Sébahoun G 2005). Les granulations denses sont des sites de stockage et se composent essentiellement de sérotonine, de calcium et de nucléotides qui pourront être excrétés par les futures plaquettes (Sébahoun G 2005). Les granulations lysosomiales contiennent quant à elles des hydrolases, des phosphatases acides et des arylsulfatases (Sébahoun G 2005).

d. Les différents stades de maturation des mégacaryocytes

Les phénomènes d'endomitose et de maturation cytoplasmique et membranaire se produisent en continu à partir des stades de promégacaryoblastes et permettent de caractériser les différents stades de la différenciation des progéniteurs en mégacaryocytes matures.

Les mégacaryocytes correspondent à des cellules identifiables en 4 stades de maturation par leur morphologie. On distingue successivement les mégacaryoblastes qui se différencient en mégacaryocytes basophiles, en mégacaryocytes granuleux puis en mégacaryocytes thrombocytogènes (Sébahoun G 2005) (figure 11).

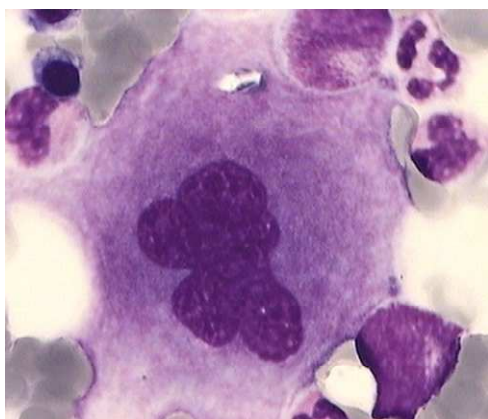
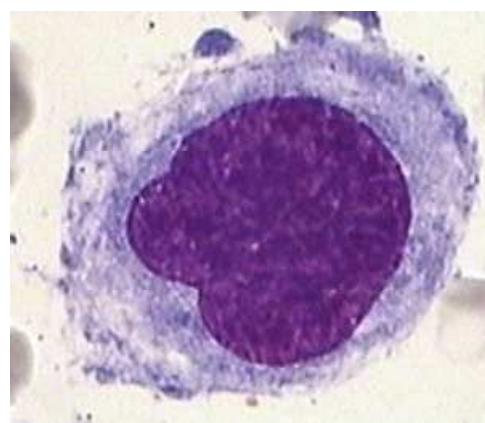
Le mégacaryocyte de stade I, ou mégacaryoblaste est la première cellule identifiable morphologiquement. Les mégacaryoblastes sont des cellules de 20 à 30 μm de diamètre, elles présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (compris entre 0,5 et 0,6), un noyau compact et lobé avec une ploïdie de 4N à 8N, un cytoplasme basophile, ne contenant pas de granulations (Sébahoun G 2005) (figure 11). Le mégacaryoblaste continue à synthétiser de l'ADN et à subir des endomitoses. A ce stade apparaissent des protéines plaquettaires telles que le facteur von Willebrand et la thrombospondine et les protéines spécifiques des futures granulations (PF4 et β -thromboglobuline). Au niveau membranaire, le marqueur CD41 est toujours présent et la Gplb tend à apparaître.



Mégacaryoblaste : ou MK stade I.
La ploïdie augmente (4 – 8 N) et la maturation cytoplasmique débute également. Sur étalement et coloration au MGG : cellules de 20 à 30 μm de diamètre avec un rapport N/C élevé. Poursuite des endomitoses.



Mégacaryocyte basophile : ou MK stade II ou promégacaryocyte. A ce stade la ploïdie atteint son apogée et la synthèse d'ADN cesse (la majorité des MK ont une ploïdie = 16N) ; quelques granulations apparaissent. Diamètre des cellules : 40 – 80 μm



Mégacaryocyte granuleux : ou MK stade III. Les organelles plaquettaires et le système de membranes de démarcation délimitant des territoires plaquettaires commencent à s'organiser.



Mégacaryocyte mature : ou MK stade IV ou plaquettogène ou thrombocytogène. Les granulations se regroupent en petits paquets dans le cytoplasme, ébauches des futures plaquettes : ce stade produit les plaquettes.

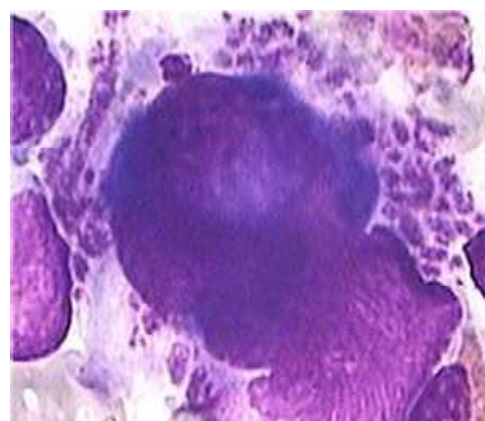


Figure 11 : Les différentes étapes de la maturation mégacaryocytaire d'après Sébahoun G 2005

Le mégacaryocyte de stade II, ou mégacaryocyte basophile, ou promégacaryocyte est une cellule d'une taille de 40 à 70 μm . Le mégacaryocyte basophile présente un noyau polylobé entouré d'un cytoplasme basophile contenant quelques granulations azurophiles (figure 11). A ce stade, la cellule atteint une ploïdie de 8N à 64N et peut arrêter sa synthèse d'ADN. La majorité des mégacaryocytes humains arrêtent leurs endomitoses à 16N (Sébahoun G 2005).

Au niveau membranaire, l'apparition du CD61 permet la formation d'un complexe CD41-CD61 fonctionnel. La synthèse du fibrinogène et des protéines des granules débute également à ce stade.

Les mégacaryocytes basophiles représentent de 15 à 25% des cellules de la lignée. Le mégacaryocyte de stade III, ou mégacaryocyte granuleux est une cellule de grande taille de 70 à 100 μm . Elle présente un noyau polylobé volumineux et son cytoplasme devient acidophile et granulaire (Sébahoun G 2005) (figure 11). La microscopie électronique met en évidence la production d'organelles plaquettaires et le développement du système de membranes de démarcations. A ce stade tous les marqueurs membranaires ou cytoplasmiques de la lignée sont présents. Le mégacaryocyte granuleux représente 50 à 60% des mégacaryocytes présents dans la moelle osseuse.

Le dernier stade correspond au mégacaryocyte de stade IV, ou mégacaryocyte mature, ou mégacaryocyte thrombocytogène. Le mégacaryocyte thrombocytogène présente un aspect général voisin du mégacaryocyte granuleux avec un noyau multilobé et dense (figure 11). Le cytoplasme est intensément acidophile et renferme de très nombreux grains azurophiles mais est également plus ou moins clivé en logettes limitées par des septums en continuité avec la membrane plasmique, autour des grains azurophiles regroupés en amas de 10 ou 12 à l'origine d'une plaquette. Par la suite, de fins prolongements cytoplasmiques appelés proplaquettes apparaissent. Le mégacaryocyte thrombocytogène présente alors un aspect en "pieuvre" et commence alors la libération des plaquettes.

Après l'étape ultime de la libération des plaquettes, le mégacaryocyte se résume à un noyau très pycnotique entouré d'une bande plus ou moins importante de cytoplasme. Ce mégacaryocyte est alors phagocyté par les macrophages.

La durée totale de maturation des mégacaryocytes est de 8 jours chez l'adulte.

2.3. Formation et libération des plaquettes

Bien que les plaquettes aient été identifiées il y a plus de 120 ans, les mécanismes régissant leur formation et leur libération par les mégacaryocytes matures sont encore controversés.

a. Formation des plaquettes

Plusieurs hypothèses existaient jusqu'alors, mais l'hypothèse qui semble réunir le plus de preuves expérimentales à ce jour est la formation de proplaquettes. En effet, la possibilité de cultiver des mégacaryocytes en présence de facteurs de croissance et de différenciation a permis l'observation de la formation de proplaquettes *in vitro*, à partir de mégacaryocytes matures. Les proplaquettes sont des extensions de type pseudopodes qui sont générés par évagination du réseau membranaire interne des mégacaryocytes (Radley JM et Haller CJ 1982) (figure 12). Les membranes de démarcation constituent ce réseau interne et délimitent de petits territoires dans le cytoplasme correspondants aux futures plaquettes. Les membranes de démarcations constituent la source de membrane des futures plaquettes (Schulze H et al. 2006).

La formation des proplaquettes débute par l'émission d'un ou plusieurs pseudopodes à partir du mégacaryocyte mature. Par la suite, le pseudopode s'allonge et il se forme de petites protubérances d'un diamètre de 2 à 4 μm (diamètre des plaquettes 2 à 3 μm), donnant aux proplaquettes l'apparence de petites billes reliées par un fin fil de cytoplasme (Italiano JE et al. 1999, Patel SR et al. 2005) (figure 12). A partir d'un mégacaryocyte mature se forment plusieurs pseudopodes qui s'étendent jusqu'à ce que le cytoplasme de la cellule soit entièrement transformé en un réseau complexe de proplaquettes interconnectées (Patel SR et al. 2005). Le noyau restant est condensé et entouré d'une fine bande de cytoplasme, il sera phagocyté après libération des plaquettes.

La formation des proplaquettes nécessite une grande réorganisation du cytosquelette en particulier par l'activation des microtubules (Tablin F et al. 1990, Cramer EM et al. 1997), la polymérisation des filaments d'actine (Rojnuckarin P et Kaushansky K 2001) et la phosphorylation de la myosine. Le réarrangement des microtubules est essentiel à la formation des proplaquettes puisque les proplaquettes ne peuvent pas se former à partir de mégacaryocytes traités avec des inhibiteurs de l'assemblage des microtubules tels que le nocodazole (Tablin F et al. 1990).

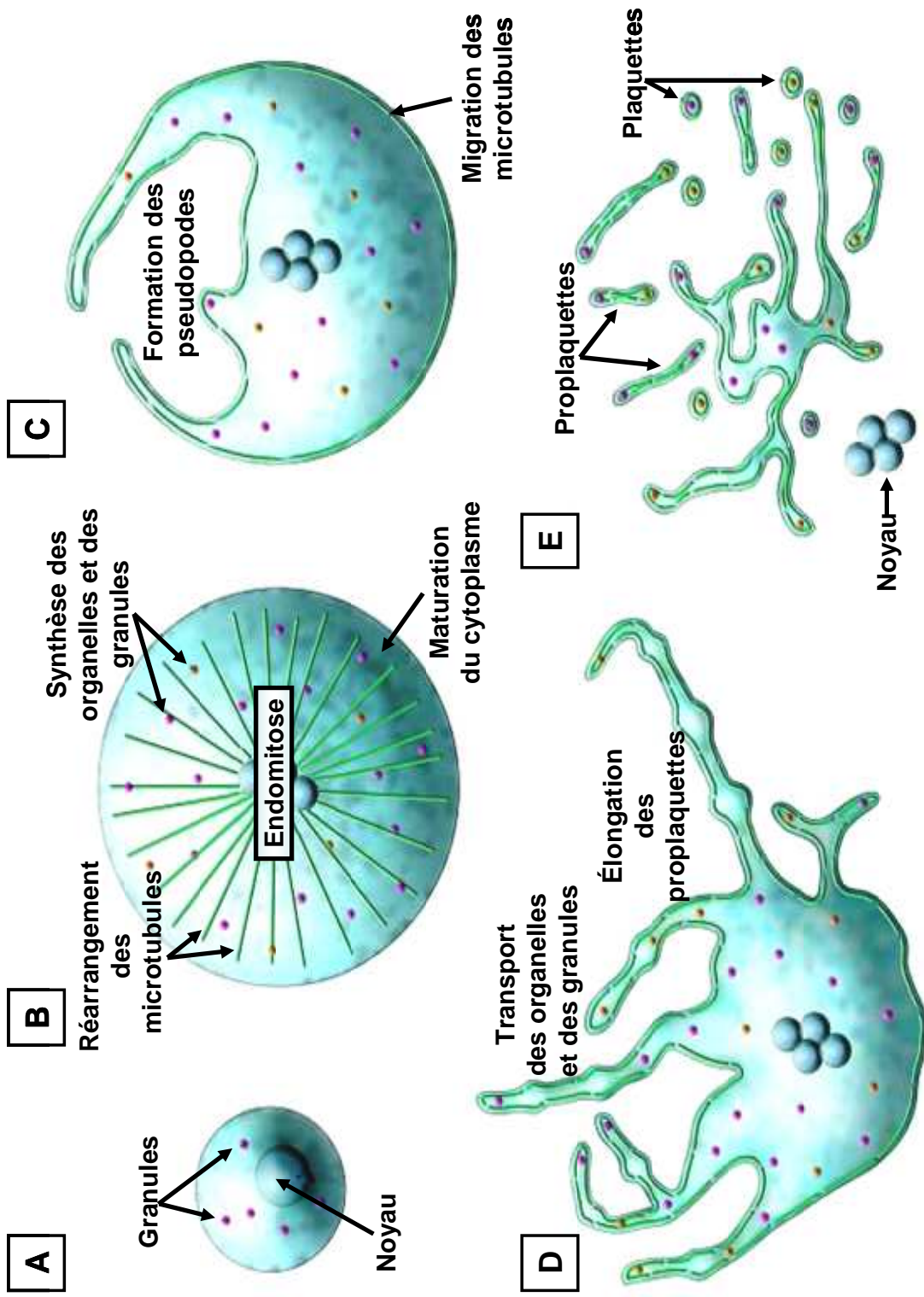


Figure 12 : La différenciation mégacaryocytaire et la formation des plaquettes
(D'après Patel SR 2005)

Les plaquettes se forment quant à elles aux extrémités de chacune des proplaquettes et les composants des plaquettes tels que les organelles ou les granules sont transportés le long des microtubules depuis le corps cellulaire du mégacaryocyte jusqu'à l'extrémité de la proplaquette (Italiano JE et al. 1999, Richardson JL et al. 2005) (figure 12).

b. Libération des plaquettes.

In vivo, le mécanisme précis de libération des plaquettes n'a pas été précisément décrit. Toutefois trois mécanismes possibles ont été proposés :

- émission de pseudopodes proplaquettaires à travers la paroi des sinusoides de la moelle et rupture de ces pseudopodes dans la circulation, libérant ainsi les plaquettes ;
- passage des mégacaryocytes dans la circulation à travers la paroi des sinusoides et arrêt au niveau des capillaires pulmonaires où ils se rompent ;
- rupture des mégacaryocytes dans l'environnement médullaire même (Sébahoun G 2005).

Au moment de la libération, les plaquettes ont une forme allongée et ce n'est que par la suite qu'elles prennent leur forme en disque.

In vitro, après la transformation complète du cytoplasme du mégacaryocyte en un réseau de proplaquettes, on observe une contraction du reste de la cellule qui conduit au relargage de la masse proplaquettaire et à l'isolement d'un noyau condensé entouré d'une fine bande de cytoplasme (Italiano JE et al. 1999, Patel SR et al. 2005). La masse proplaquettaire se fragmente alors libérant des proplaquettes constituées d'une chaîne de plaquettes reliées entre elles et libérant aussi des plaquettes fonctionnelles. Les proplaquettes libérées finiront également aussi par se fragmenter en plaquettes.

c. Rôle des régulateurs de l'apoptose

Le processus de formation des plaquettes au sein des mégacaryocytes présente certaines caractéristiques rappelant celles de l'apoptose, concernant principalement la réorganisation du cytosquelette et la condensation membranaire. Ces similitudes ont conduit à déterminer l'éventuelle implication de processus apoptotiques dans la formation des proplaquettes et libération des plaquettes. Il a par ailleurs été démontré que la destruction des noyaux des mégacaryocytes sénescents était due à

un processus apoptotique (Gordge MP 2005). Cependant, un processus apoptotique particulier et spécialisé pourrait mener à la libération des plaquettes. Des phénomènes apoptotiques ont été décrits dans les mégacaryocytes (Radley JM et Haller CJ 1983) avec une prévalence dans les mégacaryocytes matures par rapport aux cellules non mûres (Zauli G et al. 1997, Falcieri E et al. 2000). De plus un certain nombre de facteurs apoptotiques, proapoptotiques et antiapoptotiques, ont été identifiés dans les mégacaryocytes (Kaluzhny Y et Ravid K 2004). Les protéines inhibitrices de l'apoptose telles que Bcl-2 et Bcl-xL sont exprimées précocement dans les mégacaryocytes, mais Bcl-2 est absent des plaquettes sanguines, et Bcl-xL est absent dans les mégacaryocytes sénescents (Sanz C et al. 2001). Quand ces deux facteurs sont surexprimés dans les mégacaryocytes, ils empêchent la formation des proplaquettes (de Botton S et al. 2002, Kaluzhny Y et al. 2002). Les effecteurs de l'apoptose comme les caspases sont également exprimés en mégacaryocytes. Il a été démontré que la formation des proplaquettes est régulée par l'activation localisée des caspases, en particulier des caspases-3 et -9 dans le cytoplasme des mégacaryocytes matures et dans les proplaquettes. Cette activation des caspases se produit avant la formation des proplaquettes et l'inhibition des caspases entraîne un blocage de la formation des plaquettes (De Botton S et al. 2002).

Les faits décrits précédemment indiquent donc le rôle majeur que jouent certains acteurs de l'apoptose. Toutefois, les processus mis en jeu au cours de la maturation des mégacaryocytes et de la formation des proplaquettes tels que l'activation des caspases, ne conduisent pas à la fragmentation de l'ADN cellulaire, leur rôle n'est donc pas de participer à la mort des cellules.

2.4. Régulation de la mégacaryocytopoïèse

Chez l'Homme, des mécanismes de régulation de l'homéostasie permettent de maintenir le nombre de plaquettes sanguines entre 150 et 450×10^3 par cm^3 de sang circulant. Ces mécanismes régissent donc la production de plaquettes en modulant la mégacaryocytopoïèse. Cette régulation peut se faire par diverses cytokines qui modifient la survie, la prolifération et l'engagement des progéniteurs médullaires dans le processus de différenciation mégacaryocytaire. Au cours de ces événements, une série de facteurs de transcription régulent l'expression de différents gènes spécifiques de la lignée mégacaryocytaire.

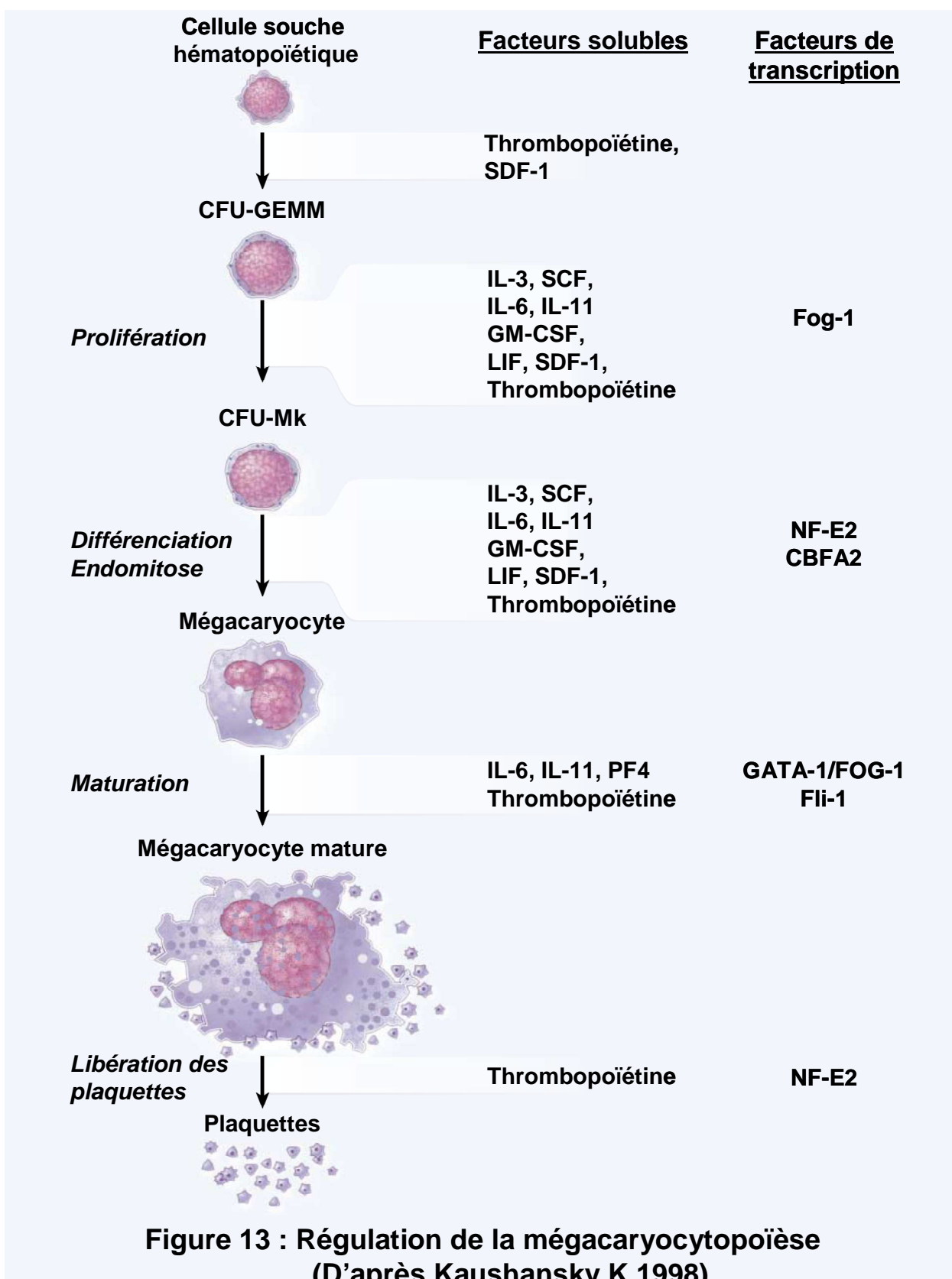
a. Régulation par les cytokines

De nombreux facteurs de croissance hématopoïétiques régulent la physiologie du mégacaryocyte à différents moments de sa maturation. Certaines cytokines dites hématopoïétiques telles que le GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-11, le Stem Cell Factor (SCF) et l'érythropoïétine mais aussi l'IL-1 α et le « leukemia inhibitory factor » (LIF) peuvent ainsi intervenir dans la régulation de la mégacaryocytopoïèse (Gordon MS et Hoffman R 1992, Pang L et al. 2005) (figure 13). Toutefois, 3 régulateurs principaux ont été identifiés : la thrombopoïétine (TPO) ou Mpl ligand (Mpl-l) qui est le régulateur majeur, et les chimiokines : stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) et facteur plaquettaire 4 (PF4) (Pang L et al. 2005) (figure 13).

La thrombopoïétine

La thrombopoïétine (TPO) est la cytokine clé de la mégacaryocytopoïèse. C'est le seul facteur qui est impliqué dans la régulation de la plupart, sinon de toutes, les étapes de la mégacaryocytopoïèse (figure 13). La TPO stimule en effet la croissance des cellules souches hématopoïétiques et la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires en culture (de Sauvage FJ et al. 1994, Kaushansky K et al. 1995) (figure 13). En présence de TPO, le nombre de colonies mégacaryocytaires augmente, ainsi que l'expression des marqueurs membranaires mégacaryocytaires et la taille des mégacaryocytes (Banu N et al. 1995). De plus, la sensibilité des mégacaryocytes à la TPO augmente avec le degré de différenciation des cellules (Paulus JM et al. 2004). Ainsi les mégacaryocytes non proliférants sont plus sensibles à la TPO que leurs progéniteurs et sont rapidement orientés vers la maturation terminale (Paulus JM et al. 2004). De même, le phénomène d'endomitose est accentué en présence de TPO (Rojnuckarin P et al. 1999) et le nombre de mégacaryocytes à forte ploïdie est plus important (Debili N et al. 1995b) (figure 13). La TPO stimule également la formation des structures intragranulaires et le développement des membranes de démarcation (Sébahoun G 2005) (figure 13).

La caractérisation du proto-oncogène c-mpl, homologue cellulaire de l'oncogène v-mpl (myeloproliférative leukemia virus) a révélé son homologie de structure avec les récepteurs aux cytokines hématopoïétiques et son implication dans la mégacaryocytopoïèse (Methia N et al. 1993). L'expression de ce récepteur de 82 kDa a lieu dans les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺, les mégacaryocytes et les plaquettes (Debili N et al. 1995a), et faiblement dans les cellules endothéliales (Sébahoun G 2005).



L'étude de l'implication de c-mpl dans la mégacaryocytopoïèse a conduit à l'identification et au clonage du ligand de mpl, appelé thrombopoïétine, et à la découverte de son rôle majeur dans la stimulation de la production de mégacaryocyte et de plaquettes (Bartley TD et al. 1994, Lok S et al. 1994, Kaushansky K et al. 1994, de Sauvage FJ et al. 1994).

Le gène de la TPO est localisé sur le chromosome 3q26-27 et a une structure proche de celle du gène de l'érythropoïétine (EPO). Il code pour une protéine hautement glycosylée de 35 kDa constituée de 332 acides aminés.

La partie N terminale de 153 acides aminés est responsable de l'activité biologique, elle présente une forte homologie avec l'EPO (23 à 50% d'homologie) et reflète bien la proximité évolutive retrouvée dans les voies de signalisation activées par leurs récepteurs respectifs. Cette partie N-terminale correspond au domaine qui est capable de se lier au récepteur, le c-mpl (Kaushansky K 1998).

Une fois que le c-mpl est activé par la fixation de la TPO, ses effets multiples sur les cellules souches hématopoïétiques, les mégacaryocytes, et les plaquettes résultent de l'activation de différentes voies biochimiques de signalisation. La principale voie induite par la TPO est la voie JAK-STAT. La TPO en se fixant sur son récepteur entraîne l'activation des protéines JAK2 par auto-phosphorylation et permet le recrutement au niveau du récepteur des protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), en particulier STAT5 (Pallard C et al. 1995, Drachman JG et al. 1999). Les protéines STAT sont alors phosphorylées par les kinases JAK et migrent dans le noyau où elles activent principalement la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire (Drachman JG et al. 1997, Liu RY et al. 1999).

La fixation de la TPO active également la voie PI3 Kinase/Akt en recrutant un complexe composé de la phosphatase SHP2, de la protéine Gab/IRS, et de la sous-unité p85 régulatrice de la PI3 Kinase, dans les mégacaryocytes et leurs précurseurs (Miyakawa Y et al. 2001, Bouscary D et al. 2001). Le blocage de cette voie empêche la survie des cellules et la prolifération induites par la TPO (Geddis AE et al. 2001). En plus de la voie PI3 Kinase/Akt, la TPO stimule deux des voies de MAPKs, p42/p44 ERK1 et ERK2 (Rojnuckarin P et al. 1999) et p38 MAPK (Kirito K et al. 2003). La protéine p38 agit principalement en stimulant la prolifération des cellules souches hématopoïétiques alors que ERK agit plus spécifiquement dans la différenciation des mégacaryocytes. En effet, l'activation de la voie de ERK a été mise en évidence au cours de la différenciation mégacaryocytaire de la lignée leucémique humaine UT7-mpl stimulée par la TPO (Rouyez MC et al. 1997).

La voie de ERK semble intervenir particulièrement dans le phénomène d'endomitose (Rojnuckarin P et al. 1999) et dans la formation des proplaquettes (Jiang F et al. 2002).

Les chimiokines SDF-1 et PF4

SDF-1 augmente la mégacaryocytopoïèse mais aussi l'implantation des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse au cours du développement fœtal (Wang JF et al. 1998). SDF-1 stimule la mégacaryocytopoïèse en augmentant l'activité chimiotactique des progéniteurs et participe également à la migration des mégacaryocytes vers la paroi des sinusoides de la moelle où ils libèrent les plaquettes (Avecilla ST et al. 2004). SDF-1 se fixe sur le récepteur CXCR4 qui est exprimé dans la lignée mégacaryocytaire, des progéniteurs aux plaquettes (Wang JF et al. 1998). Cette fixation active les voies de signalisation de ERK, p38 MAPK et Akt qui sont également activées par la liaison TPO-c-mpl (Majka M et al. 2000). SDF-1 augmente également la polyploïdisation des mégacaryocytes issus de progéniteurs en culture (Guerriero R et al. 2001) (figure 13).

Le PF4 aussi appelé facteur antihéparinique est un facteur plaquettaire contenu dans les granules α des thrombocytes et qui est libéré lors de la dégranulation. Il a été démontré que cette chimiokine inhibait le développement des mégacaryocytes et leur maturation *in vitro* (Gewirtz AM et al. 1995) (figure 13). La protéine PF4 inhibe également la polyploïdisation et la formation des proplaquettes (Oda M et al. 2003).

b. Régulation par les facteurs de transcription

Au cours de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs mégacaryocytaires, une série de facteurs de transcription règlent de façon conjointe et coordonnée la réorganisation de la chromatine, l'expression de gènes spécifiques de la lignée mégacaryocytaire et la formation et la libération des plaquettes.

Les principaux facteurs de transcription qui régulent la mégacaryocytopoïèse sont GATA-1, FOG-1, Fli-1 et NF-E2 (Shivdasani RA 2001, Pang L et al. 2005) (figure 13).

Le complexe GATA/FOG (figure 13)

GATA-1 est un facteur de transcription en doigt de zinc reconnaissant un motif consensus présent dans les régions régulatrices de nombreux gènes exprimés dans

la lignée érythrocytaire (Weiss MJ et Orkin SH 1995). GATA-1 est également exprimé et fonctionnel dans les mégacaryocytes, les mastocytes, et les éosinophiles (Zon LI et al. 1993, Lemarchandel V et al. 1993).

Plusieurs sites de fixation de GATA-1 ont été identifiés dans les promoteurs des gènes spécifiques de la lignée mégacaryocytaire tels que ceux du marqueur GpIIb (CD41), de la GpIb β (CD42b) ou encore du récepteur à la thrombopoïétine (Martin F et al. 1993, Deveaux S et al. 1996, Ludlow LB et al. 1996). L'inactivation du gène GATA-1 chez la souris est létale au stade embryonnaire (Fujiwara Y et al. 1996) et l'inactivation de GATA-1 dans les seuls mégacaryocytes conduit à une thrombocytopenie importante et à l'observation d'un grand nombre des mégacaryocytes immatures (Shivdasani RA et al. 1997).

Fog-1 (Friend of GATA-1, ou Zfp1) est un facteur de transcription spécifique des lignées hématopoïétiques qui a été isolé en tant que partenaire protéique de GATA-1 (Tsang AP et al. 1997). L'inactivation du gène Fog-1 empêche le développement érythrocytaire, causant la mort embryonnaire des souris par anémie sévère. L'étude détaillée de ces animaux et de cellules souches embryonnaires Fog-1^{-/-} a également démontré une inhibition précoce du développement mégacaryocytaire avec absence de précurseurs identifiables (Pang L et al. 2005).

Fog-1 ne semble pas se lier directement à l'ADN, mais s'associe plutôt aux gènes cibles indirectement par des interactions avec des protéines GATA. L'interaction entre les protéines FOG-1 et GATA-1 se fait au niveau de la partie N-terminale de GATA-1 (Tsang AP et al. 1997 ; Fox AH et al. 1999). Ainsi, GATA-1 et Fog-1 augmentent de façon synergique l'expression du gène GpIIb spécifique de la lignée mégacaryocytaire (Gaines P et al. 2000, Wang X et al. 2002a). Ce complexe FOG/GATA régule également l'expression d'autres gènes comme ceux du récepteur c-mpl de la glycoprotéine GpIX et du facteur de transcription p45 NF-E2 (Gaines P et al. 2000, Wang X et al. 2002a).

Le facteur de transcription Fli-1 (figure 13)

Les promoteurs proximaux des gènes spécifiques de la lignée mégacaryocytaire contiennent en général des sites de liaisons pour les protéines GATA et Ets (Lemarchandel V et al. 1993, Pang L et al. 2005).

De nombreux facteurs de transcription Ets ont été identifiés dans les mégacaryocytes et les lignées mégacaryocytaires (Athanasίου M et al. 1996, Terui K et al. 2000). Le facteur de transcription Fli-1 appartient à la famille Ets, il est exprimé dans plusieurs lignées cellulaires hématopoïétiques, on le retrouve ainsi exprimé au

niveau des mégacaryocytes et des plaquettes (Bastian LS et al. 1999). Les souris *Fli-1*^{-/-} meurent à l'état embryonnaire et les progéniteurs mégacaryocytaires de ces souris sont indifférenciés (Holmes ML et al. 2002, Eisbacher M et al. 2003). Dans les lignées hématopoïétiques indifférenciées, la surexpression de Fli-1 est capable d'induire l'apparition d'un phénotype mégacaryocytaire (Athanasidou M et al. 1996). De plus, l'expression de Fli-1 inhibe également la différenciation érythrocytaire (Athanasidou M et al. 2000). Fli-1 doit donc être un des facteurs permettant l'orientation vers la lignée mégacaryocytaire et le développement des mégacaryocytes.

Le facteur de transcription p45 NF-E2 (figure 13)

Ce facteur de transcription est constitué de deux sous-unités p18 et p45. La sous-unité p45 du facteur NF-E2 a une expression hématopoïétique alors que la sous-unité p18 a une expression ubiquitaire. Les souris *p45 NF-E2*^{-/-} développent une sévère thrombocytopénie associée à la présence d'un nombre anormalement élevé de mégacaryocytes immatures (Shivdasani RA et al. 1995). En l'absence de NF-E2, la différenciation mégacaryocytaire précoce, incluant les phénomènes d'endomitose et d'augmentation du volume cellulaire, est normale. Par contre, l'absence de NF-E2 compromet l'organisation du réseau de membranes de démarcation, la formation des proplaquettes et le relargage des plaquettes (Shivdasani RA et al. 1995).

p45 NF-E2 active la transcription de trois gènes principaux, ceux de la tubuline β 1, de la thromboxane synthase et de l'enzyme 3 β -hydroxy-stéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) (Nagata Y et al. 2003). NF-E2 agirait ainsi en activant la transcription de la tubuline β 1 nécessaire à la formation des proplaquettes (Schwer HD et al. 2001) et en augmentant l'expression de la 3 β -HSD, augmentant ainsi la synthèse d'oestradiol qui activerait la formation des proplaquettes (Nagata Y et al. 2003).

VI- TRANSDUCTION DU SIGNAL

La plupart des phénomènes régulant la physiologie cellulaire sont activés ou inhibés par différents stimuli externes ou internes. Ces stimuli activent des voies de transduction du signal qui permettent à leur tour d'activer des cibles cellulaires. La modulation de l'activation de ces cibles cellulaires participe à la physiologie cellulaire et régule des phénomènes tels que la prolifération cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. Les principales voies de transduction du signal au sein des cellules sont la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase, MAPK), la voie PI3 kinase (phosphatidyl inositol-3 kinase)/Akt (PI3K/Akt), la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) et la voie d'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa B).

L'activation de ces voies se fait en général par des cascades de phosphorylation de protéines kinases. Ces cascades d'activation par phosphorylation se déroulent jusqu'à l'activation de la cible cellulaire finale et sont régulées par des phosphatases qui en déphosphorylant les protéines kinases peuvent inhiber leur activité et interrompre la transduction du message.

Après une présentation générale de l'organisation de ces voies de transduction du message, nous étudierons leur implication dans la différenciation, principalement mégacaryocytaire, et dans les phénomènes d'apoptose des cellules leucémiques.

1. La voie des MAPKs

La voie des MAPKs peut être activée par une grande variété de stimuli externes ou internes mais le schéma classique d'activation de cette voie fait intervenir la fixation d'un ligand à son récepteur membranaire. Cette fixation induit une modification de la conformation du récepteur qui conduit à la phosphorylation du récepteur lui-même ou de protéines qui lui sont associées. Ceci conduit généralement à l'activation directe ou indirecte de protéines de la famille des protéines G, qui sont couplées au récepteur ou bien sous forme libre comme la protéine Ras.

L'activation du récepteur et des protéines associées se situe en amont de la cascade des MAPKs qui est constituée de trois kinases : une MAPK kinase kinase (MAP3K),

qui phosphoryle et active une MAPK kinase (MAP2K ou MKK), qui à son tour, active la MAPK (Johnson GL et Lapadat R 2002) (figure 14). L'activation des MAPKs est consécutive à leur phosphorylation au niveau de résidus thréonine (Thr) ou tyrosine (Tyr) situés sur des motifs Thr-X-Tyr et placés dans un domaine appelé boucle d'activation (activation loop).

Cette organisation en cascade permet une amplification du signal, mais fournit aussi de façon importante, des cibles supplémentaires de régulation de la cascade.

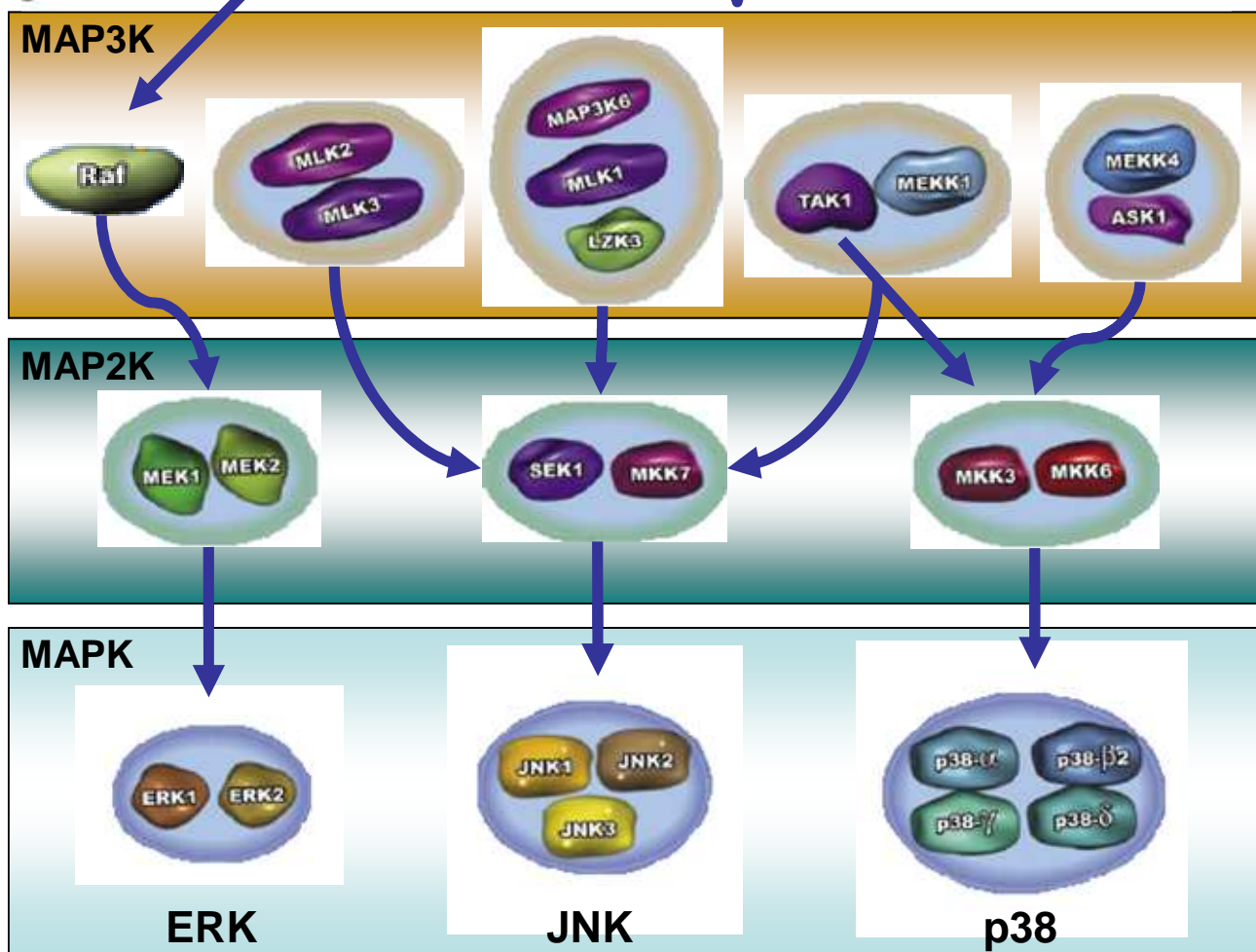
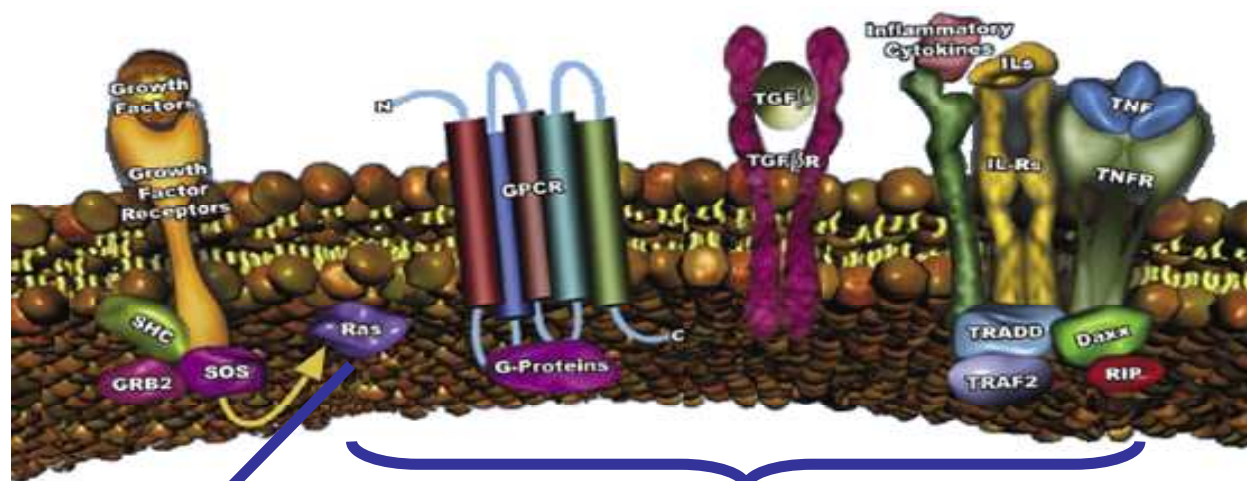
Les MAPKs se divisent en trois sous-familles nommées ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) et p38 (Johnson GL et Lapadat R 2002).

1.1 La voie de ERK

De nombreux stimuli tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des agents chimiques ou des infections virales peuvent activer la voie de ERK (Johnson GL et Lapadat R 2002). La voie de transduction de ERK est organisée en cascade qui conduit à la phosphorylation de ERK1 et/ou ERK2. La fixation d'un ligand sur son récepteur active le protooncogène Ras qui est à l'origine de l'activation de la MAP3K, la protéine Raf (Stokoe D et al. 1994) (figure 14). Les isoformes de Raf phosphorylent à leur tour les MAP2Ks de la famille MEK, MEK1 et MEK2. MEK1 et MEK2 sont activées par phosphorylation directe sur leurs résidus sérines (Pearson G et al. 2001). MEK1 et MEK2 sont alors en mesure de phosphoryler et activer ERK1 et ERK2 (figure 14). Ces MAPKs semblent être les seuls substrats connus de MEK1/2. Les deux MEKs phosphorylent ERK1/2 sur les résidus tyrosine et thréonine qui se situent dans le segment d'activation du domaine catalytique (appelé encore boucle d'activation) (Pearson G et al. 2001). ERK1 et ERK2 sont des protéines de 43 et 41 kDa qui sont homologues à 85%. ERK phosphoryle à son tour de nombreux substrats qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire et de la différenciation (figure 14).

1.2 La voie de JNK

Les protéines JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase), sont codées par trois gènes conduisant à la production d'au moins dix isoformes. Les isoformes identifiées sont JNK1/SAPK γ , JNK2/SAPK α , et JNK3/SAPK β , leurs domaines catalytiques présentent 85% d'homologie.



ERK
 Activation de la prolifération
 Survie cellulaire
 Différenciation

JNK
 Stress cellulaire
 Apoptose
 Différenciation
 Inflammation

p38
 Stress cellulaire
 Apoptose
 Différenciation
 Cycle cellulaire

Figure 14 : Cascades d'activation des MAPK

Les JNK/SAPKs sont activées par phosphorylation sur deux sites, tyrosine et thréonine, comme toutes les autres MAP kinases. Les JNK/SAPKs sont activées par les cytokines, certains ligands pour les récepteurs couplés aux protéines G, par un stress environnemental et dans une certaine mesure par des facteurs de croissance ainsi que des agents transformants (Kyriakis JM et al. 1994, Coso OA et al. 1995). L'activation de la voie de JNK implique de très nombreuses MAP3K dont l'action converge vers l'activation d'un nombre restreint de MAP2K. En effet, seulement deux membres de la famille des MAP2K, MKK4 (SEK1, MEK4, JNKK1, SKK1) et MKK7 (MEK7, JNKK2, SKK4), ont été impliqués dans les voies JNK/SAPK (Davis RJ 2000) (figure 14). L'activation de la voie de JNK est généralement associée à la régulation des processus de mort cellulaire, à la transduction du signal insulinaire et à la régulation du cycle cellulaire (Johnson GL et Lapadat R 2002, Sabapathy K et Wagner EF 2004).

1.3 La voie de p38

Il existe quatre isoformes de p38 chez les mammifères : p38 α (SAPK2_A), p38 β (SAPK2_B), p38 γ (ERK6 ou SAPK3), et p38 δ (SAPK4) (Pearson G et al. 2001). Une variété de facteurs, y compris les cytokines, les chocs osmotiques, les chocs thermiques ainsi que bien d'autres types de stress peuvent activer les membres de la famille de p38. Ces facteurs activent les MAP3K nommées MEKK4, TAK1 ou ASK1 qui vont à leur tour activer les MAP2K impliquées dans la voie de p38 mais peuvent également activer la voie de JNK (Ichijo H et al. 1997, Zarubin T et Han J 2005) (figure 14). Deux protéines MAP2K, MEK3 (MKK3) et MEK6 (MKK6), activent fortement les p38 MAP kinases (Davis RJ 2000) (figure 14). MEK3 paraît favoriser la phosphorylation de p38 α et les isoformes de p38 β , alors que MEK6 phosphoryle efficacement tous les membres de la famille p38 (Davis RJ 2000).

L'activation de la voie de p38 est généralement associée à l'activation de facteurs de transcription et de protéines kinases impliqués dans la régulation des processus de mort cellulaire, de différenciation et de réponse inflammatoire (Johnson GL et Lapadat R 2002, Zhang W et Liu HT 2002).

2. La voie PI3K/Akt

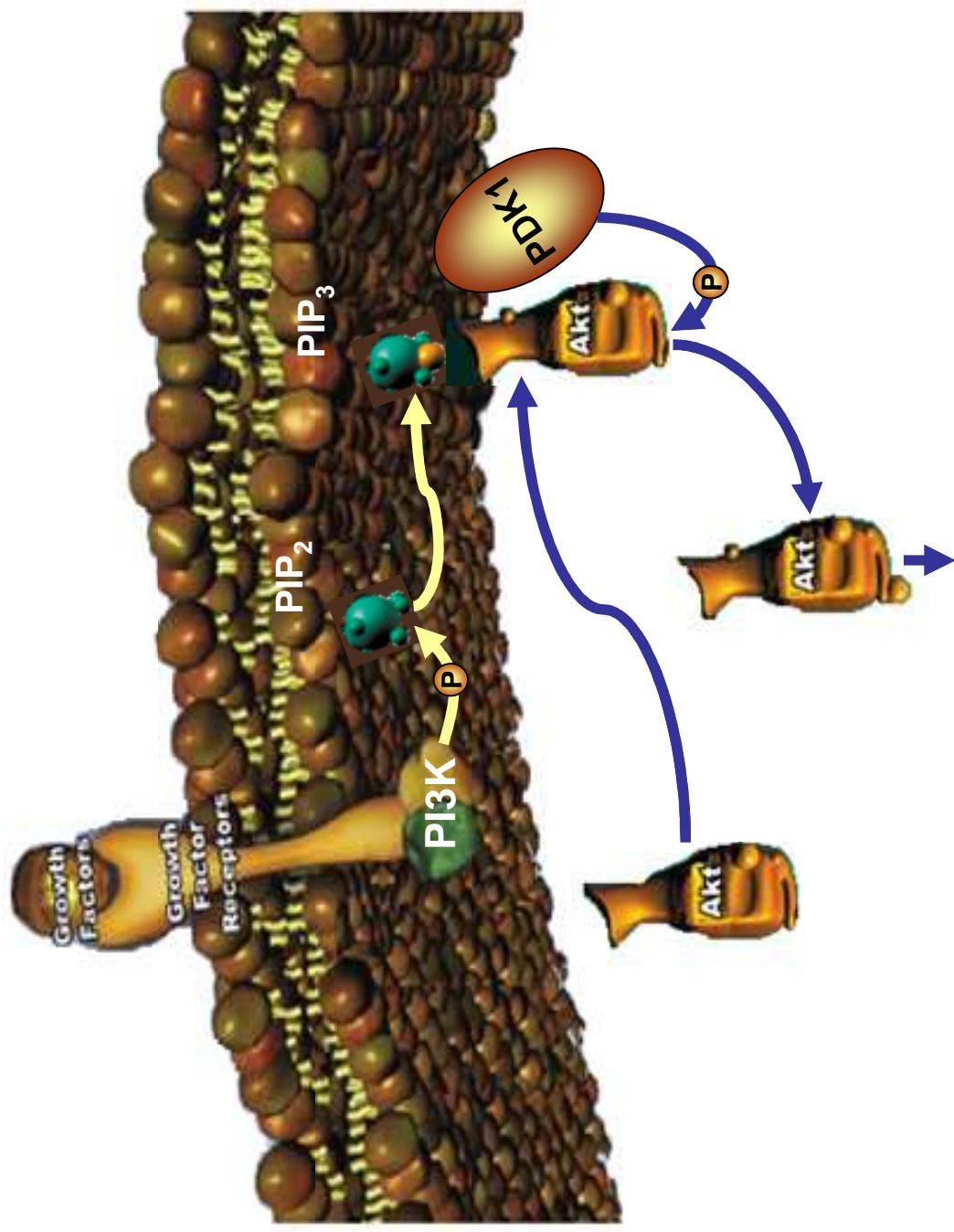
Chez les mammifères, il existe huit isoformes de PI3K qui sont séparées en PI3K de classe IA et IB, classe II et classe III. Seules les PI3K de classe I sont capables de générer du phosphatidyl inositide 3,4,5-triphosphate (PIP₃) qui est un messenger secondaire intervenant dans la transduction du signal (Amaravadi R et Thompson CB 2005). Les PI3K de classe I sont activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase ou par les récepteurs couplés aux protéines G (Osaki M et al. 2004). Une fois activées ces PI3K phosphorylent les phosphatidyl inositide 4,5-diphosphate (PIP₂) des phospholipides membranaires en PIP₃. Cette production de PIP₃ conduit au recrutement de la protéine kinase Akt (ou PKB, protéine kinase B) (figure 15). Il existe trois isoformes de Akt nommées Akt1, Akt2 et Akt3. Sur toutes les isoformes d'Akt on retrouve un domaine d'homologie avec la plekstrine (PH) qui se lie préférentiellement avec les PIP₃ (Osaki M et al. 2004). Cette interaction entre le domaine PH de Akt et le PIP₃ conduit à des changements conformationnels de Akt qui conduisent au démasquage de deux sites de phosphorylation (Thr308 et Ser473). La phosphorylation d'Akt est alors régulée par la protéine kinase PDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase 1) qui est également recrutée par son domaine PH au niveau du site de production de PIP₃ (Osaki M et al. 2004) (figure 15).

Une fois activée la protéine Akt phosphoryle divers substrats qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération, la survie et le métabolisme cellulaire.

3. La voie JAK/STAT

La voie JAK/STAT est l'une des principales voies impliquées dans la transduction de signaux activés par des cytokines ou des facteurs de croissance. Elle régule des phénomènes physiologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, la migration et la mort des cellules (Espert L et al. 2005).

La famille des JAK comporte quatre membres chez les mammifères : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. Ces tyrosine kinases sont associées aux domaines cytoplasmiques de différents récepteurs, comme les récepteurs aux cytokines, dont elles assurent la transduction du message.



Phosphorylation de cibles cellulaires
Activation des voies de survie de la cellule

Figure 15 : Voie d'activation de PI3K/Akt

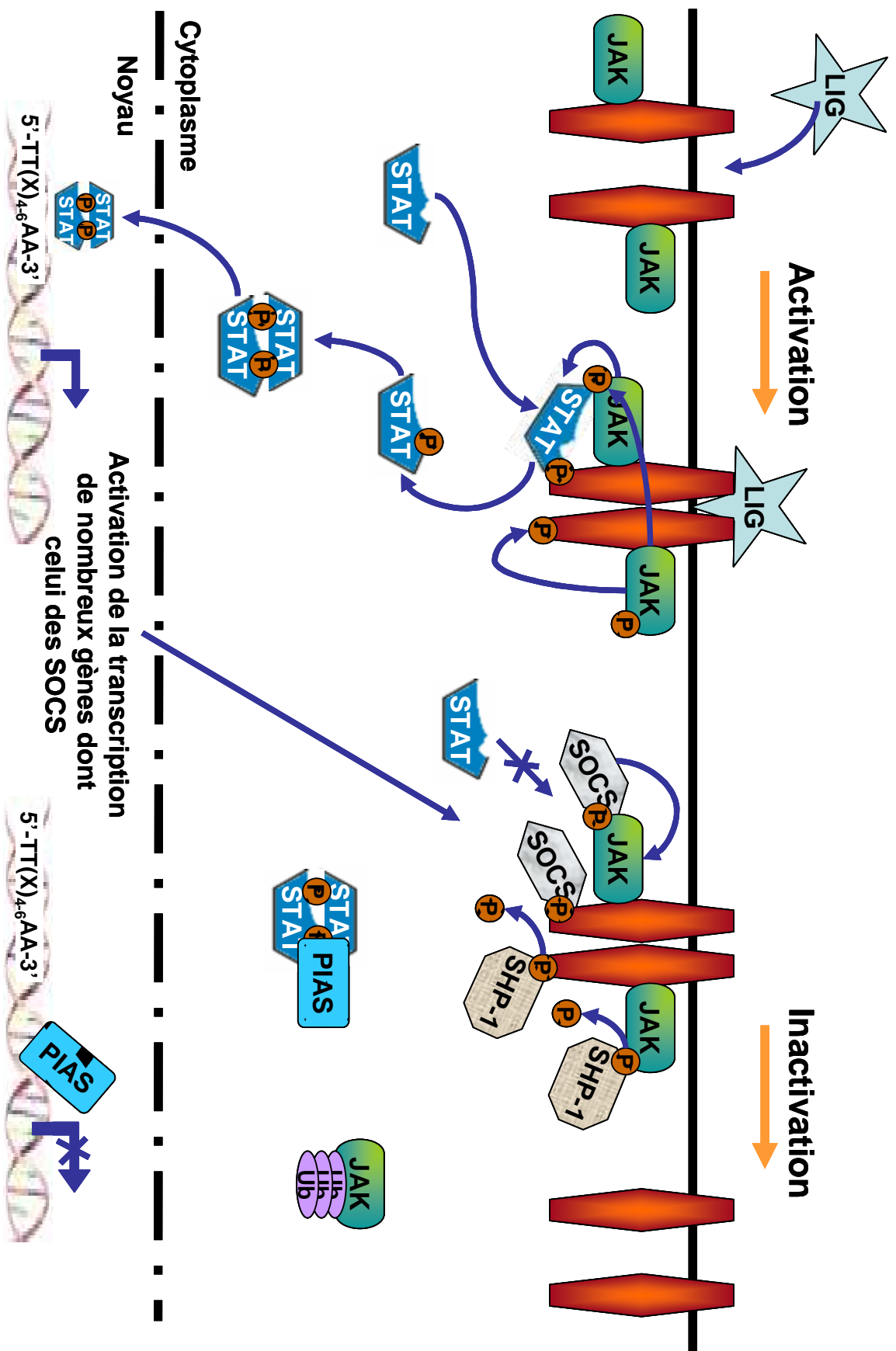


Figure 16 : Activation de la voie des JAK/STAT (d'après Rawlings JS 2004)

La fixation d'un ligand sur ce type de récepteurs conduit à leur oligomérisation. La formation de ces oligomères rapproche deux JAK et permet leur phosphorylation réciproque ce qui conduit à leur activation (figure 16). Les JAK activées phosphorylent ensuite le récepteur auquel elles sont associées (Rawlings JS et al. 2004). Cette phosphorylation de résidus tyrosine du récepteur crée des sites de recrutement pour les protéines possédant un domaine SH2 (Src-homology 2). Parmi ces protéines on trouve les facteurs de transcription STAT. Chez les mammifères il existe sept gènes différents qui sont à l'origine des sept membres de la famille STAT : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6. Ces sept STAT possèdent toutes un résidu tyrosine conservé dont la phosphorylation par les JAK activés conduit à l'homo ou à l'hétérodimérisation des STAT (Espert L et al. 2005) (figure 16). Les dimères de STAT sont alors rapidement transloqués au noyau et peuvent se lier à des régions promotrices des gènes cibles dont ils induisent une très forte augmentation de la transcription (Aaronson DS et Horvath CM 2002).

Par ailleurs, il existe trois différents types de régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT. Les tyrosine phosphatases telles que les protéines SHP1 et SHP2 (SH2-domain containing phosphatase) qui se lient aux récepteurs activés ou directement aux protéines JAK, par leur domaine SH2 et déphosphorylent alors ces protéines (Espert L et al. 2005). Les protéines SOCS (Suppressor of cytokine signaling) font partie d'une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie JAK/STAT. En effet, la transcription de ces gènes est activée par les dimères de STAT. Les protéines SOCS peuvent interagir par leur domaine SH2 avec les résidus tyrosines phosphorylés des récepteurs activés ou des JAK activés. Il en résulte une inhibition du recrutement des facteurs STAT par compétition au niveau des sites de liaison aux récepteurs, ou bien inhibition de l'activité kinase des JAK (Espert L et al. 2005). Les protéines PIAS (protein inhibitor of activated STAT) quant à elles se lient directement aux dimères de STAT et empêchent la liaison de ces dimères avec l'ADN (Aaronson DS et Horvath CM 2002).

4. L'activation du facteur de transcription NFκB

La voie d'activation de NFκB est un mécanisme de réponse rapide à une grande variété de stimuli environnementaux tels que des conditions inflammatoires ou de stress, nécessitant une modulation rapide de l'expression de certains gènes.

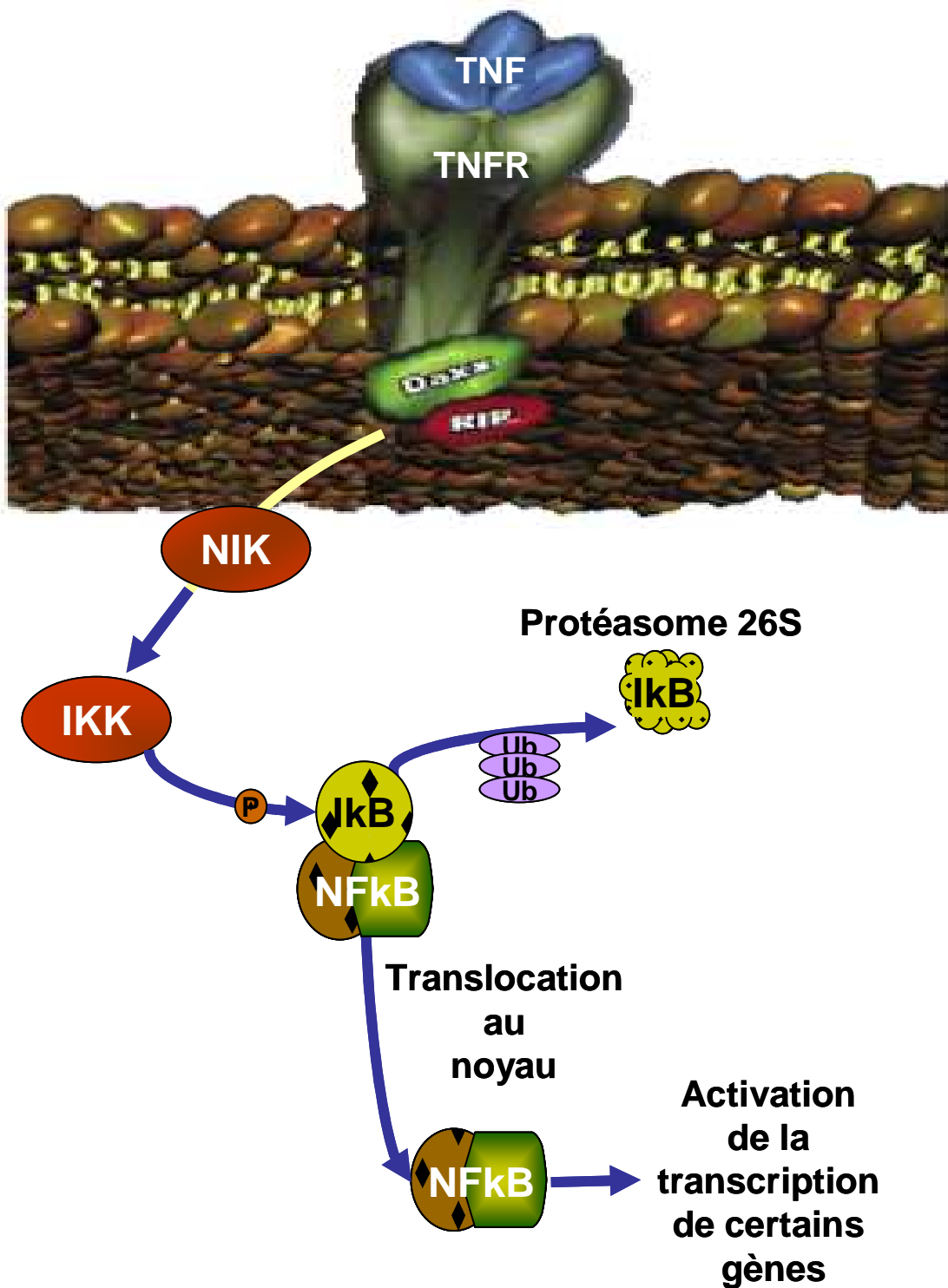


Figure 17 : Activation du facteur de transcription NFκB

Chez les mammifères, la famille des facteurs de transcription NFκB/Rel est composée de cinq membres : Rel A (p65), Rel (c-Rel), Rel B, NFκB1 (p50 et son précurseur p105) et NFκB2 (p52 et son précurseur p100) (Ghosh S et al. 1998). Chacune de ces protéines possède un domaine N-terminal qui intervient dans les phénomènes de dimérisation, de translocation au noyau et de liaison à l'ADN. La majorité des dimères NFκB sont constitués par l'association p50-p65. Ces dimères sont maintenus à l'état inactif par leur association avec les protéines inhibitrices de la famille des IκB : IκBα, IκBβ, IκBε et Bcl-3 (Moynagh PN 2005) qui inhibent en partie la translocation au noyau et inhibent également la capacité de liaison de NFκB à l'ADN.

L'activation de NFκB est réalisée par le complexe IκB kinase (IKK) qui est composé de deux sous-unité catalytiques IKKα et IKKβ et d'une protéine régulatrice IKKγ/NEMO. Lorsque IKK est activé, il phosphoryle IκB au niveau de sérines placées en position N-terminale. Cette phosphorylation est suivie de la fixation d'un complexe à activité ubiquitine ligase qui induit une polyubiquitination de IκB et son adressage vers le protéasome 26S où elle sera dégradée. Les dimères NFκB sont alors transloqués dans le noyau où ils activent la transcription de nombreux gènes NFκB-dépendants (Moynagh PN 2005).

L'activation de IKK se fait quant à elle en réponse à de multiples stimuli et peut résulter de l'activation d'autres voies de transduction du signal. IKK peut être activée par la kinase NIK (NFκB-inducing kinase) dans le cas de la transduction du message induite par la fixation d'un ligand sur un récepteur appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF. IKK peut également être activée par des MAP3K comme MEKK1, MEKK3 ou TAK1 impliquées également dans les cascades des voies de JNK et ERK (Moynagh PN 2005). L'activation de IKK peut enfin aussi être réalisée par Akt, elle-même activée dans la voie PI3K/Akt.

5. Voies de transduction du signal impliquées dans la différenciation mégacaryocytaire

La plupart des voies de transduction du signal décrites précédemment jouent un rôle au cours des processus de différenciation cellulaire et notamment au cours de la différenciation mégacaryocytaire.

Physiologiquement, la fixation de la TPO sur son récepteur, le Mpl, dans les mégacaryocytes normaux conduit à une activation de la prolifération et de la maturation et induit l'activation de différentes voies biochimiques de signalisation. En effet, il a été démontré que la stimulation du Mpl induisait dans les cellules CD34⁺ et les mégacaryocytes, une activation des voies JAK/STAT, MAPK et PI3K/Akt (Majka M et al. 2002).

Dans la lignée UT7 transfectée avec le récepteur murin à la TPO (UT7-Mpl), et dans les lignées MO7e et DAMI qui expriment le Mpl, le traitement par la TPO induit la prolifération et la différenciation des cellules et active JAK2 et les facteurs de transcription STAT5 et STAT3 (Pallard C et al. 1995, Tortolani PJ et al. 1995, Bacon CM et al. 1995). De plus, dans les cellules UT7-Mpl exprimant un Mpl qui n'active pas la voie JAK/STAT, la TPO conserve son activité de stimulation de la prolifération mais a perdu son pouvoir différenciant (Dorsch M et al. 1999). La voie JAK/STAT serait donc impliquée dans la transduction du signal de différenciation induit par la TPO plutôt que dans la stimulation de la prolifération.

L'activation de ERK a également été largement décrite et semble impliquée de façon importante dans la différenciation mégacaryocytaire. En effet, dans la lignée érythroleucémique K562, le traitement au PMA induit une différenciation mégacaryocytaire des cellules. Cette différenciation s'accompagne d'une activation prolongée de ERK. Dans ces mêmes cellules, la transfection par des formes constitutivement actives de MEK1 et MEK2 induit la différenciation mégacaryocytaire sans stimulation externe (Whalen AM et al. 1997). De plus, le traitement par un inhibiteur de MEK, le PD98059 bloque la réponse au PMA (Whalen AM et al. 1997, Racke FK et al. 1997, Herrera R et al. 1998).

La fixation de la TPO sur son récepteur active également la voie de transduction de ERK. Dans la lignée UT7-Mpl, la TPO induit une activation forte et prolongée de ERK qui corrèle avec l'induction de la différenciation mégacaryocytaire (Rouyez MC et al. 1997). Cette induction de différenciation est inhibée par le PD98059 dans ces cellules.

D'un point de vue plus physiologique, il a été démontré que la stimulation de cellules CD34⁺ issues de sang de cordon, ou de mégacaryocytes primaires par la TPO induisait une activation soutenue de ERK (Fichelson S et al. 1999, Rojnuckarin P et al. 1999). L'inhibition de la voie de ERK par le PD98059 inhibe la différenciation mégacaryocytaire dans ces cellules (Fichelson S et al. 1999, Rojnuckarin P et al. 1999).

En ce qui concerne les autres voies des MAPK p38 et JNK, elles semblent plutôt impliquées dans la différenciation érythrocytaire des cellules leucémiques et hématopoïétiques (Nagata Y et al. 1998, Uddin S et al. 2004). Les voies p38 et JNK d'une part et ERK d'autre part semblent avoir des effets opposés au cours des phénomènes de différenciation des cellules leucémiques (Sawafuji K et al. 2003, Huang HM et al. 2004, Kohmura K et al. 2004).

Enfin, la fixation de la thrombopoïétine active aussi la voie PI3 Kinase/Akt. L'activation de cette voie semble impliquée dans la stimulation de la prolifération induite par la TPO dans les mégacaryocytes primaires et les cellules leucémiques répondant à la TPO (Sattler M J et al. 1997, Miyakawa Y et al. 2001, Bouscary D et al. 2001). Le blocage de cette voie empêche la prolifération induite par la thrombopoïétine (Geddis AE et al. 2001). Toutefois l'expression d'une forme constitutivement active d'Akt ne permet pas la prolifération des cellules en l'absence de TPO, l'activation de PI3K/Akt est donc nécessaire mais pas suffisante pour induire la prolifération des mégacaryocytes (Geddis AE et al. 2001).

Le rôle de l'activation du facteur de transcription NFκB a principalement été étudié au cours de la différenciation mégacaryocytaire de lignées leucémiques induite par le PMA. Dans les cellules érythroleucémiques K562, le PMA active la voie de ERK et induit la différenciation mégacaryocytaire. Toutefois l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de NFκB en prétraitement avant le traitement au PMA entraîne le blocage de la différenciation mégacaryocytaire (Kang CD et al. 1996). Il semblerait que la protéine kinase RSK fasse le lien entre les deux voies et permette l'activation de NFκB qui pourrait alors participer à l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire (Kim KW et al. 2001).

Par ailleurs, dans les mégacaryocytes proliférants, il a également été démontré qu'il y avait une activation constitutive de NFκB (Zhang Y et al. 2002). Toutefois, après traitement des cellules à la TPO, on observe une diminution de l'activation de NFκB. Il a alors été proposé que l'activation constitutive de NFκB en stimulant la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et l'inhibition de l'apoptose favoriserait la survie et la prolifération des mégacaryocytes. L'inhibition de NFκB par la stimulation du Mpl serait alors plutôt corrélée avec l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose qui sont observées dans les phases tardives de la mégacaryocytopoïèse (Zhang Y et al. 2002).

6. Voies de transduction du signal impliquées dans la régulation de l'apoptose des cellules leucémiques

De nombreuses voies de transduction du signal sont capables de moduler les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire. Toutes les voies décrites précédemment ont été impliquées dans la modulation de la mort cellulaire. Les effets de l'activation de ces différentes voies au niveau de l'induction ou de la modulation négative de l'apoptose dépendent très souvent du type cellulaire concerné et du contexte environnemental. Toutefois, et de manière schématique, on peut distinguer les voies JNK et p38 MAPK qui seraient plutôt impliquées dans la transduction du message apoptotique, et les voies de ERK, JAK/STAT, NF κ B et PI3K/Akt qui sont généralement impliquées dans la survie cellulaire.

Concernant les MAPK, les travaux de Xia Z et al. (1995), ont été parmi les premiers à suggérer des effets opposés des voies p38 et JNK d'une part et ERK d'autre part dans la modulation de l'apoptose. Ces travaux ont été réalisés sur des cellules PC-12 de phéochromocytome murin différenciées par le NGF (Nerve Growth Factor). Dans ces cellules différenciées, la déprivation en NGF induit l'apoptose et au cours de cette apoptose, il a été observé une forte activation de p38 et JNK (Xia Z et al. 1995). La transfection des cellules PC-12 différenciées par des activateurs des voies p38 et JNK constitutivement actifs (MKK3 et MEKK1 et MKK4 respectivement) induit également l'apoptose. Inversement, l'expression de dominants négatifs des activateurs de p38 et JNK inhibe l'apoptose induite par la déprivation en NGF.

Par ailleurs au cours de ces travaux, il a également été démontré que l'induction de l'apoptose par déprivation en NGF induisait une diminution de l'activité de ERK. De plus, l'expression d'un activateur de ERK (MKK1) constitutivement actif, ou le traitement des cellules par des agents protecteurs de l'apoptose, conduisent à l'activation de ERK et à l'inhibition de l'apoptose induite (Xia Z et al. 1995).

Ces travaux suggèrent donc que les voies p38 et JNK contribuent à l'induction de l'apoptose dans les cellules neuronales, alors que la voie de ERK favorise la survie des cellules en plus de stimuler leur prolifération (Xia Z et al. 1995).

La voie de ERK semble également impliquée dans la leucémogénèse, dans la stimulation de la prolifération et de la survie des cellules leucémiques (Platanias LC 2003). En effet, l'une des cibles de la voie de ERK est le facteur de transcription CBFA2, aussi appelé AML1 (pour acute myelogenous leukemia 1) qui est impliqué dans la différenciation hématopoïétique mais qui possède également un pouvoir

transformant lorsqu'il est activé par ERK (Tanaka T et al. 1996). La voie de ERK stimule la prolifération des cellules leucémiques et leur confère une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance (Blalock WL et al. 2000, Hoyle PE et al. 2000). De plus, l'activation constitutive de la voie de ERK a été observée dans de nombreux cas de leucémies (Towatari M et al. 1997, Kim SC et al. 1999). L'inhibition de la voie de ERK est également impliquée dans l'induction de la mort des cellules leucémiques par différents agents chimiothérapeutiques (Morgan MA et al. 2001, Yu C et al. 2001).

En ce qui concerne les voies de p38 et JNK, quelques études ont également révélé leur activation dans les cellules leucémiques en cours de prolifération (Cripe LD et al. 2002, Srinivasa SP et Doshi PD 2002). Toutefois ces deux voies semblent plutôt impliquées dans l'induction de la mort des cellules leucémiques. De nombreux agents chimiothérapeutiques induisent l'activation des voies p38 et JNK dans les cellules leucémiques. La voie de JNK est ainsi activée au cours des traitements à la daunorubicine (Laurent G et Jaffrezou JP 2001), à la staurosporine et à l'ARA-C (Sampath D et al. 2006), à l'arsenic trioxide (Huang C et al. 1999, Davison K et al. 2004), ou encore par des inhibiteurs des histones desacétylases (Yu C et al. 2003).

La voie de p38 est également activée par les agents chimiothérapeutiques. Elle peut être activée seule (Iwama K et al. 2001, Verma A et al. 2002), mais elle est souvent activée en parallèle de la voie de JNK (Kutuk O et al. 2005, Miyoshi N et al. 2004).

La voie JAK/STAT pour sa part, est principalement impliquée dans la régulation des processus physiologiques de prolifération et de différenciation cellulaire. La découverte de phénomènes d'activation constitutive de la voie JAK/STAT au cours du processus oncogénique (Ward AC et al. 2000, Bromberg J 2002) a également permis de préciser son rôle dans les processus de survie et de mort cellulaire. Dans les leucémies, ces perturbations conduisant à l'activation constitutive de la voie JAK/STAT sont souvent observées et touchent aussi bien les éléments constitutifs que les régulateurs de cette voie (Espert L et al. 2005).

Dans la famille des protéines JAK, la protéine JAK2 est celle qui est la plus impliquée dans la transformation leucémique. Dans des cas de leucémies lymphoïdes aiguës, l'activation de JAK2 joue un rôle majeur dans la stimulation de la prolifération cellulaire (Lacronique V et al. 1997).

Il est également maintenant bien établi que l'activation constitutive des facteurs de transcription STAT concourt à la transformation oncogénique (Bromberg J 2002). Les protéines STAT3 et STAT5 (5a et 5b) sont généralement activées dans les leucémies (Benekli M et al. 2003, Cochet O et al. 2006).

L'altération de la régulation négative de la voie JAK/STAT a également été observée dans certains cas de lymphomes et de leucémies et la surexpression de protéines SOCS pourrait intervenir dans l'échappement de certaines lignées leucémiques aux actions anti-tumorales des interférons (Reddy J et al. 2005, Espert L et al. 2005). Ainsi l'activation de la voie JAK/STAT contribue à la prolifération des cellules tumorales mais semble également les protéger de l'apoptose (Ruchatz H et al. 2003, Yu HM et al. 2006).

La voie PI3K/Akt est quant à elle très largement décrite comme une voie impliquée dans la survie cellulaire, l'oncogenèse et la résistance aux agents chimiothérapeutiques (West KA et al. 2002, Wendel HG et al. 2004).

L'activation constitutive de cette voie peut résulter de l'activation en continu des récepteurs membranaires à l'origine du signal transduit par PI3K/Akt ou également par une altération de l'expression de l'un des composants de cette voie (Osaki M et al. 2004).

L'expression de formes constitutivement actives de Akt, associées à l'expression de protéines Pim (une autre kinase de survie) actives, conduit à l'apparition de lymphome T chez des souris transgéniques (Hammerman PS et al. 2005). Des cellules T issues de ces souris survivent également en culture en l'absence de stimulation cytokinique. La voie PI3K/Akt lorsqu'elle est activée régule donc positivement la survie et la croissance cellulaire (Hammerman PS et al. 2005).

De nombreux inhibiteurs de la voie PI3K/Akt sont à l'étude et pourrait ainsi permettre des avancées dans le domaine de la lutte anti-tumorale notamment en réduisant les phénomènes de chimiorésistance médiée par cette voie (O'Gorman DM et al. 2000, Ramos AM et al. 2005, Martelli AM et al. 2006). En effet, la protéine Akt activée compte parmi ses substrats deux effecteurs majeurs de l'apoptose, à savoir la protéine pro-apoptotique Bad de la famille des protéines Bcl-2, et la caspase-9 (Datta SR et al. 1997, Cardone MH et al. 1998, Thompson JE et Thompson CB 2004). La phosphorylation de ces deux protéines conduit à une inhibition de leur activité et diminue les phénomènes apoptotiques (Osaki M et al. 2004). De plus, Akt phosphoryle et inhibe les facteurs de transcription de la famille Forkhead qui sont impliqués dans la transcription de molécules pro-apoptotiques telles que le ligand au récepteur de mort Fas (Brunet A et al. 1999).

Enfin, la protéine Akt activée phosphoryle également la protéine kinase IKK et permet ainsi l'activation de la voie du facteur de transcription NF κ B (Kane LP et al. 1999, Datta SR et al. 1999).

Le facteur de transcription NFκB a tout d'abord été étudié pour son rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire. Depuis, les études du rôle physiologique de NFκB ont également démontré que ce facteur de transcription régissait également l'expression de gènes codant des protéines essentielles dans la réponse au stress, la régulation de la prolifération et de l'apoptose des cellules (Siebenlist U et al. 1994, Garg A et Aggarwal BB 2002). La dérégulation de la voie d'activation de NFκB a été impliquée dans de nombreuses pathologies incluant les infections virales, les maladies inflammatoires aiguës et le cancer (Baeuerle PA et Baichwal VR 1997, Karin M et al. 2002).

Ainsi, NFκB est activé de manière constitutive dans divers cancers et notamment dans les lymphomes et les leucémies (Bargou RC et al. 1997, Guzman ML et al. 2001).

NFκB intervient principalement dans l'oncogénèse en activant la transcription de facteurs impliqués dans la prolifération et l'inhibition de l'apoptose (Barkett M et al. 1999, Baldwin AS 2001). En effet, parmi les gènes cibles de NFκB, on trouve principalement des régulateurs du cycle cellulaire comme la cycline D1, des chimiokines et des facteurs de croissance (Richmond A 2002) et de nombreux gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques comme c-IAP, la survivine, les protéines Bcl-2 et Bcl-XL ou encore COX-2 (Baldwin AS 2001).

Par ailleurs, il a été démontré que les inhibiteurs de NFκB étaient capables d'induire l'apoptose des cellules leucémiques en culture (Estrov Z et al. 2003, Shishodia S et Aggarwal BB 2004). Ces inhibiteurs de NFκB peuvent agir seuls mais ils peuvent également agir en synergie avec les traitements chimiothérapeutiques classiques pour induire la mort des cellules leucémiques (Romano MF et al. 2003).

Toutefois, dans certains cas particuliers, l'activation de NFκB peut également favoriser la mort des cellules en activant la transcription de facteurs pro-apoptotiques comme le Fas-ligand (Kasibhatla S et al. 1998, Kasibhatla S et al. 1999).

VII- LES STÉROÏDES VÉGÉTAUX

Les différents travaux menés dans de nombreux laboratoires à travers le monde démontrent l'intérêt croissant pour les produits d'origine naturelle. Les études réalisées visent à développer l'utilisation de ces produits naturels dans les stratégies thérapeutiques concernant diverses affections. Dans ce domaine, les stéroïdes végétaux sont de plus en plus étudiés dans le domaine biologique en raison de leur diversité structurale, de leurs activités biologiques (anti-cholestérolémique, anti-tumorale, anti-diabétique ou anti-inflammatoire) et de leur faible toxicité.

Parmi ces stéroïdes végétaux, les saponines sont particulièrement étudiées. Les saponines sont des hétérosides complexes composés d'une partie aglycone ou génine (sapogénine) et d'une ou plusieurs parties glucidiques. La partie aglycone est constituée d'un noyau stéroïdique ou triterpénique et la ou les parties glucidiques sont composées d'oses classiques comme le D-glucose ou le D-galactose.

Les saponines sont très fréquentes dans les végétaux supérieurs, surtout dans les tissus riches en substances nutritives, comme les racines, les tubercules, les feuilles, les fleurs et les graines. On les trouve dans les légumes, comme le soja, les pois, les épinards, les tomates, les pommes de terre et l'ail, et dans les herbes aromatiques comme le thé et le ginseng.

Ce groupe de composés présente une grande diversité de structure et par là une grande variabilité dans ses caractères biologiques. Plusieurs saponines ont été reconnues pour leur activité biologique et particulièrement pour leur activité anti-tumorale. En effet, des études menées sur les saponines triterpéniques de la famille des Avicines issues de l'acacia mûrier australien ont démontré que ces molécules présentent un effet inhibiteur sur le cancer de la peau chez la souris et sont capables d'induire l'apoptose et d'inhiber la croissance cellulaire (Mujoo K et al. 2001, Haridas V et al. 2001).

Les ginsenosides issus du ginseng présentent également des propriétés anti-prolifératives et pro-apoptotiques sur plusieurs types de cancer (Kim SE et al. 1999, Lee JY et al. 2005).

Le guggulstérone est un composé extrait de la gomme guggul (*Commiphora mukul*) utilisée en médecine traditionnelle indienne, il présente également des propriétés pro-apoptotiques sur des cellules cancéreuses (Shishodia S et Aggarwal BB 2004, Singh SV et al. 2005).



Igne en lisière de bois



Tubercules d'ignames

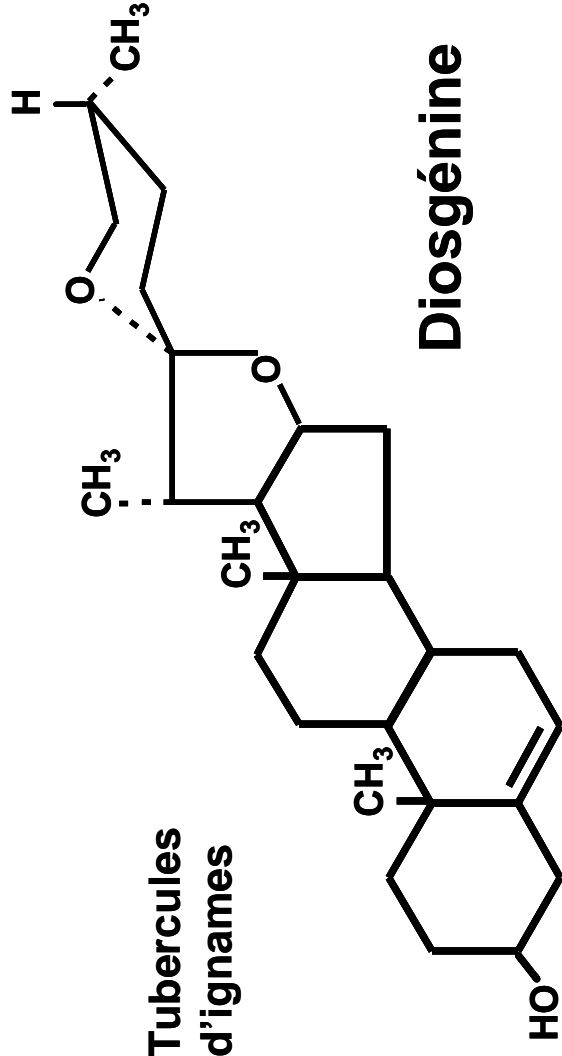


Figure 18 : La diosgénine, origine végétale et structure chimique

La diosgénine est une sapogénine à noyau stéroïdique. Cette molécule est constituée du noyau spirostane seul et ne présente pas de partie glucidique ramifiée en C3. La diosgénine est l'aglycone de la saponine appelée dioscine. On trouve la diosgénine en grande quantité dans les tubercules des plantes de la famille des Dioscorées telles que l'igname ou dans des plantes comme le fenugrec (*Trigonella foenum graecum*) (figure 18). La diosgénine sert de base à l'hémisynthèse des hormones stéroïdiennes produites dans l'industrie pharmaceutique.

La diosgénine présente par ailleurs de nombreuses propriétés biologiques et particulièrement des propriétés anti-cholestérolémiques, anti-ostéoporose et anti-tumorales. En effet, la diosgénine est capable de moduler *in vivo* la sécrétion de cholestérol dans la bile (Nervi F et al. 1988). La diosgénine augmente en effet la sécrétion du cholestérol biliaire en favorisant une augmentation de la concentration en cholestérol dans les membranes canaliculaires des hépatocytes et en augmentant l'expression des transporteurs ABC G5 et G8 à la surface de ces membranes (Amigo L et al. 1999, Yamaguchi A et al. 2003, Kamisako T et Ogawa H 2003, Yu L et al. 2005). 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 et entraîner une réduction de la taille des glandes surrénales (Higdon K et al. 2001, Benghuzzi H et al. 2003). De plus il a récemment été démontré que la diosgénine inhibait également l'ostéoclastogénèse, phénomène responsable de l'ostéolyse, ce qui expliquerait son effet contre l'ostéoporose (Shishodia S et Aggarwal BB 2006).

La diosgénine possède également des propriétés angiogéniques. En effet, la diosgénine pourrait se lier au récepteur aux oestrogènes ER α dans les ostéoblastes et activerait alors la synthèse de VEGF via l'activation du facteur de transcription HIF-1 α (Yen ML et al. 2005).

Par ailleurs, il a été démontré que la diosgénine possédait également des propriétés anti-prolifératives et pro-apoptotiques sur différentes lignées cancéreuses. En effet, au sein du laboratoire nous avons démontré que la diosgénine induit un arrêt de la prolifération des cellules érythroleucémiques humaines (HEL) qui est associé avec une différenciation mégacaryocytaire de ces cellules (Beneytout JL et al. 1995). La diosgénine induit également l'apoptose de cellules issues de lignées d'ostéosarcome (Moalic S et al. 2001, Corbière C et al. 2003), de mélanome et de laryngocarcinome (Corbière C et al. 2004b). D'autres auteurs ont également démontré que la diosgénine avait des effets chimiopréventifs *in vivo* dans le cas de cancer du côlon (Raju J et al. 2004).

VIII- LE MÉTABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE

L'étude du métabolisme de l'acide arachidonique a conduit au développement d'un nouveau secteur d'étude rattaché aux lipides bio-actifs. Ces lipides bio-actifs sont libérés à partir des phospholipides membranaires et seront à l'origine de la production de médiateurs cellulaires jouant un rôle dans des processus physiologiques aussi divers que l'inflammation, la néo-angiogénèse, la régulation de l'apoptose ou encore les processus néoplasiques (Lagarde M 2003).

Le lipide qui est le plus souvent impliqué dans ces phénomènes est l'acide arachidonique. Il est à l'origine de la synthèse des prostanoïdes et des leucotriènes par les voies métaboliques des cyclooxygénases et des lipoxygénases respectivement. Ces médiateurs cellulaires ont été impliqués dans un nombre croissant de processus physiologiques et pathologiques.

1. L'acide arachidonique (AA) et la phospholipase A₂

L'acide arachidonique (20 :4, n-6) ou acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque (ETE) est un acide gras polyinsaturé essentiel qui est synthétisé à partir de l'acide linoléique (18 :2, n-6) 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 préférentiellement estérifié en position sn-2 des glycérophospholipides membranaires.

Les lipides bio-actifs comme l'AA sont libérés à partir de lipides membranaires par l'action de phospholipases. La principale voie de libération de l'AA des phospholipides membranaires est catalysée par les phospholipases A₂ ou PLA₂. Les PLA₂ sont des estérases qui hydrolysent les liaisons ester en position sn-2 des phospholipides membranaires, permettant ainsi la libération d'un acide gras libre (AA ou autre) et d'un lysophospholipide.

Plusieurs isoenzymes de PLA₂ ont été identifiées et classifiées en 12 groupes principaux. Il existent trois grands types de PLA₂ : les PLA₂ sécrétées (sPLA₂), les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂) qui sont dépendantes du calcium et les PLA₂ intracellulaires indépendantes du calcium (iPLA₂) (Leslie CC 2004, Lagarde M 2003).

La famille des cPLA₂ comprend les cPLA₂α, cPLA₂β, cPLA₂γ, cPLA₂δ qui sont des enzymes de 85 kDa principalement impliquées dans la libération de l'AA utilisé au cours de la synthèse des eicosanoïdes.

La cPLA₂α est l'enzyme qui présente la plus forte sélectivité pour les glycérophospholipides contenant de l'AA estérifié en position sn-2. La cPLA₂α est activée par divers stimuli extracellulaires tels que des cytokines, des hormones, des neurotransmetteurs, des agents mitogènes ou des endotoxines. L'activation de la cPLA₂α induit sa translocation du cytoplasme vers la membrane périnucléaire principalement où elle trouve son substrat et où l'acide arachidonique libéré pourra rapidement être métabolisé. Cette activation est régulée par une augmentation du taux de calcium intracellulaire et par la phosphorylation de l'enzyme au niveau de résidus sérines (Leslie CC 2004). Le calcium intracellulaire en se fixant au niveau du domaine C2 situé dans la partie N-terminale de l'enzyme conduit à des changements de conformation qui permettent l'insertion de résidus hydrophobes dans la bicouche membranaire (Bittova L et al. 1999, Perisic O et al. 1999). La phosphorylation des résidus sérine du domaine catalytique joue également un rôle dans la stabilisation de l'insertion membranaire de la PLA₂ en l'absence de stimulation calcique (Evans JH et al. 2004) et pourrait favoriser son action enzymatique (Das S et al. 2003).

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.

Les principales voies d'oxydation de l'AA sont la voie des lipoxygénases (LOX) et la voie des cyclooxygénases (COX). Les LOX catalysent la formation des leucotriènes et des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) ; et les COX sont responsables de la synthèse des prostanoides : prostaglandines (PG), thromboxanes (TX) et prostacyclines.

2. Les lipoxygénases ou LOX

Les linoléate oxygène oxydoréductases ou LOX sont une famille de dioxygénases non hémiques qui catalysent l'oxydation du système cis, cis-1,4 pentadiénique des acides gras polyinsaturés pour former un hydroperoxyde diénique conjugué.

Le substrat préférentiel des LOX animales est l'acide arachidonique. Ainsi, on décrit couramment 3 types de LOX selon le numéro du carbone oxygéné dans l'AA : les 5-, 12- et 15-LOX (Lagarde M 2003) (figure 19).

La 5-LOX est la lipoxigénase la plus étudiée en raison des propriétés biologiques des produits de son action. La 5-LOX est physiologiquement exprimée par les macrophages, les mastocytes, et par les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Lorsqu'elle est activée la 5-LOX est transloquée vers les membranes et notamment la membrane nucléaire où elle se retrouve à proximité de la cPLA₂ qui lui fournit l'AA. Pour être complètement active, la 5-LOX nécessite des cofacteurs comme le calcium, de l'ATP et une protéine de 18 KDa, la FLAP (pour « five-lipoxygenase-activating-protein ») (Dixon RA et al. 1990).

La 5-LOX 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 également réduit en acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque ou 5-HETE (Leval X et al. 2002). Le LTA₄ est un composé biologiquement actif mais relativement instable. 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. La leucotriène C₄ synthétase qui est une glutathion-S-transférase transforme le LTA₄ en acide 5-hydroxy-6-glutathionyl-eicosatétraénoïque ou LTC₄, qui sera par la suite métabolisé en LTD₄ puis LTE₄ (Claria J et Romano M 2005) (figure 19).

La 15-LOX catalyse l'oxygénation du carbone 15 de l'AA pour produire du 15-HPETE, mais également l'oxygénation du carbone 13 de l'acide linoléique pour produire du 13-HPODE. Il existe deux types de 15-LOX humaine. La 15-LOX_a a été identifiée dans les réticulocytes de lapin et on la trouve principalement dans les leucocytes (éosinophiles) et les cellules épithéliales bronchiques humaines (Nadel JA et al. 1991). La 15-LOX_b est pour sa part exprimée dans les cellules de la prostate, de la peau, des poumons et de la cornée (Brash AR et al. 1997). La 15-LOX_a convertit principalement l'acide linoléique en 13-HPODE et l'AA en 15-HPETE, elle produit également du 12-HPETE mais de façon minoritaire. La 15-LOX_b convertit elle, l'AA en HPETE avec une faible action sur l'acide linoléique. Le 15-HPETE peut être transformé en acide 15-HETE) par l'action d'une glutathion peroxydase mais aussi en dérivés époxydes, dihydroxylés et trihydroxylés (figure 19).

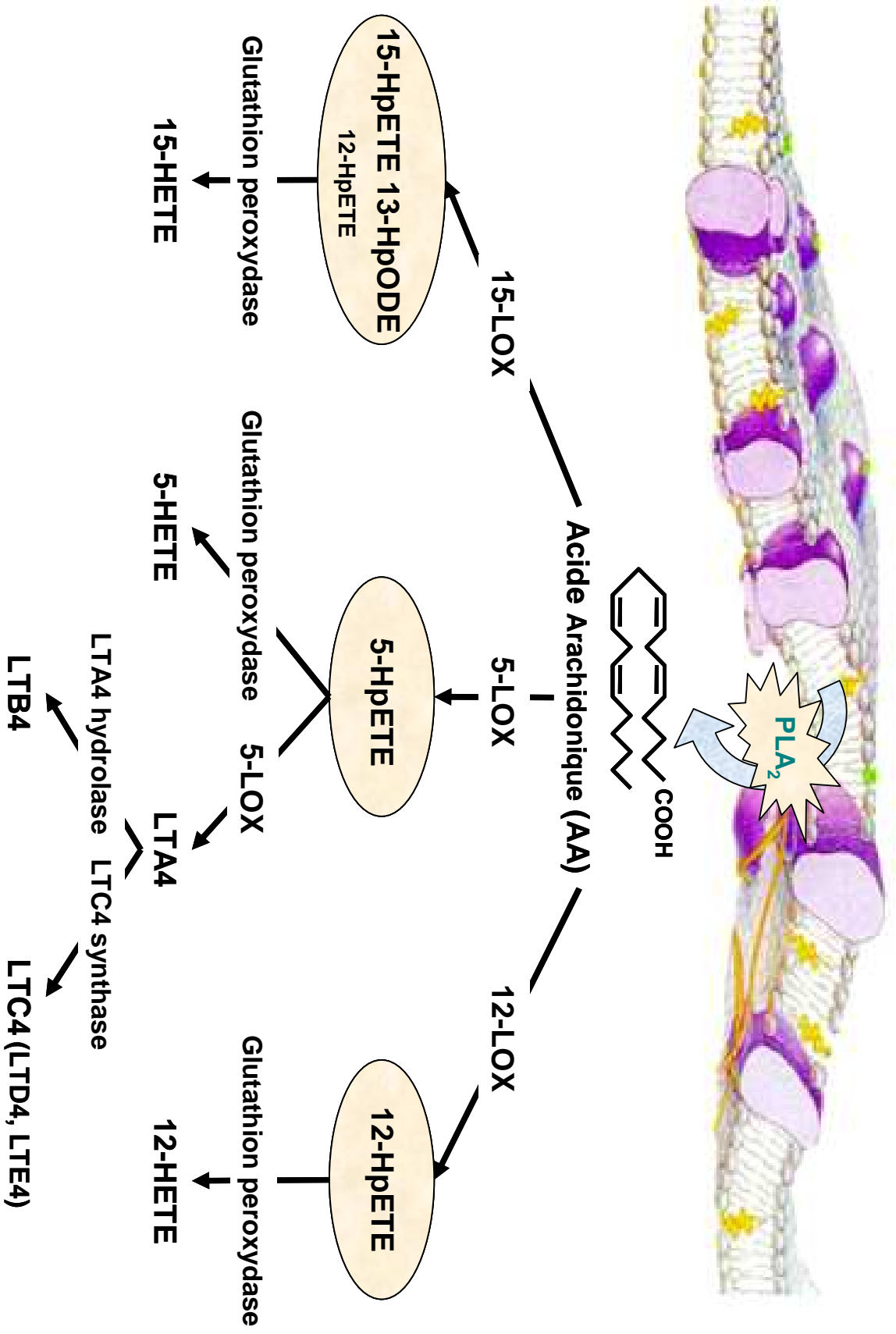


Figure 19 : La voie des lipoxygénases

La 12-LOX a été la première LOX animale découverte. Trois isoformes de 12-LOX ont été identifiées et nommées en fonction du type cellulaire dans lequel elles ont été décrites pour la première fois : plaquettes, leucocytes et cellules épidermiques (Yoshimoto T et Takahashi Y 2002). Le type leucocytaire est largement distribué dans différents types cellulaires mais sa distribution tissulaire varie en fonction des espèces. Les types plaquettaires et épidermiques sont quant à eux exprimés dans un nombre limité de cellules. La 12-LOX catalyse la transformation de l'AA en 12-HPETE et possède une activité LTA4 synthétase. Le 12-HPETE est réduit par une glutathion peroxydase en 12-HETE (Yamamoto S et al. 1997) (figure 19).

3. Les cyclooxygénases ou COX

Les cyclooxygénases (prostaglandine endoperoxyde G/H synthases ou PGHS) sont des glycoprotéines membranaires homodimériques qui possèdent un noyau hème et deux sites catalytiques, un site cyclo-oxygénase et un site peroxydase. Les cyclooxygénases permettent la conversion d'acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique en prostanoïdes. Le terme prostanoïde désigne l'ensemble des composés issus de la voie des COXs qui sont les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) et les prostacyclines (figure 20).

Les COXs existent sous deux isoformes principales, de structures et de fonctions proches mais codées par des gènes différents (Smith WL et al. 2000).

Les gènes de la COX-1 et de la COX-2 sont situés respectivement sur les chromosomes 9 et 1.

La COX-1 est la forme constitutive des cyclooxygénases. C'est une enzyme de 67 kDa qui est exprimée dans tous les tissus, elle est à l'origine des précurseurs prostanoïques nécessaires à l'homéostasie, à la coagulation, aux fonctions rénales et gastro-intestinales, à la reproduction et à la régulation de l'équilibre immunitaire (Vane JR et al. 1998, Harizi H et al. 2001).

La COX-2 est une enzyme inductible de 72 kDa, absente dans la plupart des tissus normaux, elle est rapidement mobilisée dans les conditions pathologiques comme l'inflammation ou le cancer. La COX-2 est le produit d'un gène de petite taille (8,3 kb). Cette taille inférieure à 10 kb est caractéristique des gènes rapidement transcrits, mécanisme susceptible de faciliter une maturation rapide et une réponse adaptée à l'environnement (Rodrigues S et al. 2004).

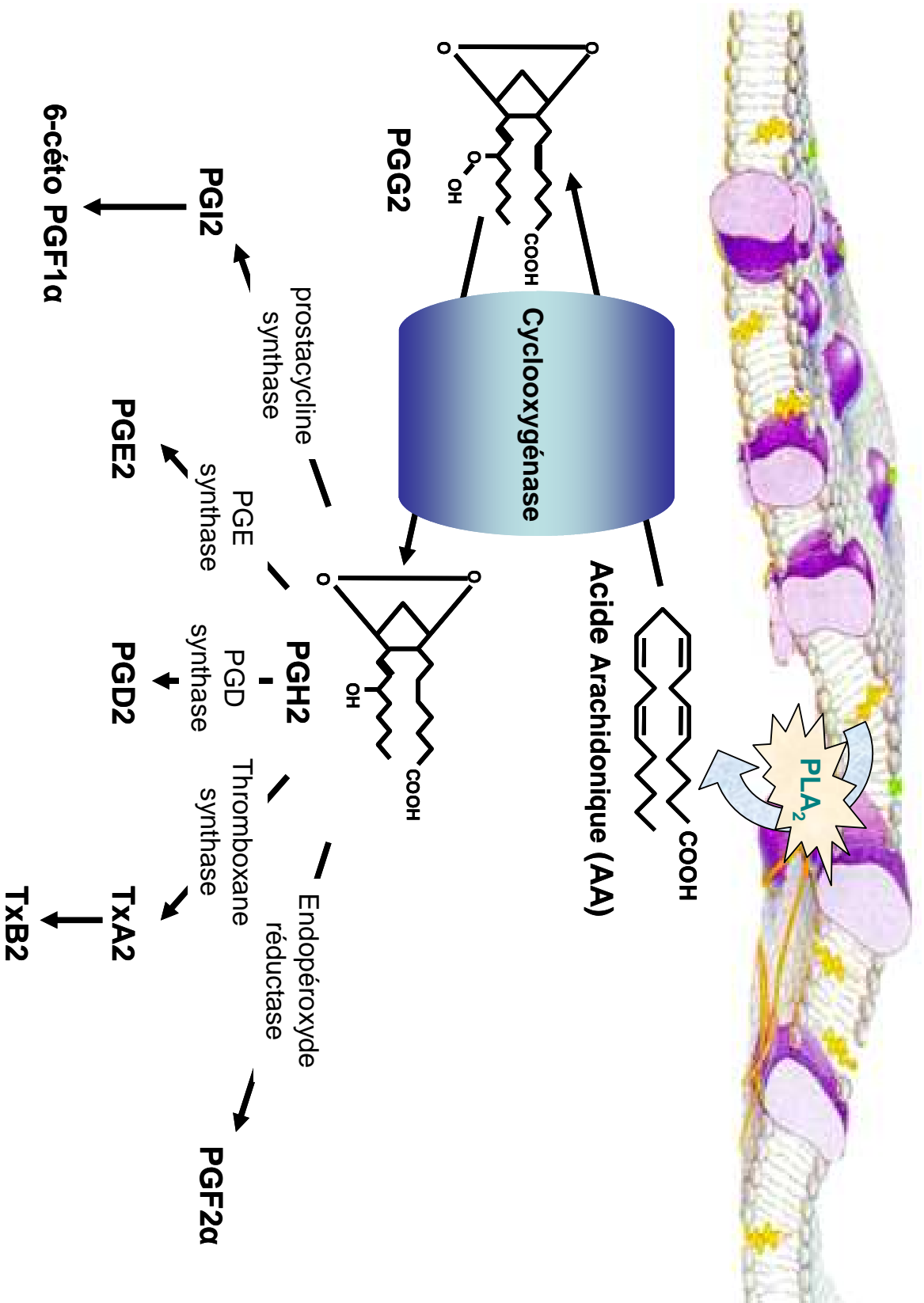


Figure 20 : La voie des cyclooxygénases

Plusieurs facteurs incluant des cytokines et des agents proinflammatoires, des facteurs de croissance, le sérum, des oncogènes, des hormones et des promoteurs de tumeurs sont connus pour induire COX-2 dans différents types cellulaires (Rodrigues S et al. 2004). En effet, les inducteurs de l'inflammation comme les lipopolysaccharides (LPS), les cytokines IL1 β , TNF α (tumor necrosis factor α), l'interféron γ (INF γ) et le PMA (phorbol myristate acetate) contribuent aux processus inflammatoires en induisant COX-2 et la synthèse de prostaglandines pro-inflammatoires (Rodrigues S et al. 2004).

De manière générale, l'induction de COX-2 est sous la dépendance des MAPK incluant les cascades ERK1/2, JNK/SAPK, et p38. Ces voies de transduction convergent vers l'activation de facteurs de transcription susceptibles de se fixer au niveau de la région promotrice du gène codant COX-2. Le promoteur de COX-2 (pCOX-2) est constitué d'une boîte régulatrice de type TATA box et de nombreux motifs de type CRE (cAMP response element), NFIL6, AP2, et NF κ B (Claria J et Romano M 2005).

Récemment, une troisième isoforme, COX-3, a été identifiée comme variant d'épissage alternatif du messenger de COX-1. COX-3 est présente dans le coeur et le cortex cérébral où elle exercerait un rôle anti-inflammatoire. Ce variant est impliqué dans les phénomènes de fièvre et de douleur (Chandrasekharan NV et al. 2002).

Les protéines COX-1 et COX-2 catalysent les mêmes réactions biochimiques et présentent les mêmes constantes cinétiques concernant la conversion de l'AA en prostanoïdes.

La première étape de la réaction de métabolisation de l'AA correspond à l'insertion via le site cyclo-oxygénase, 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 ensuite réduite en PGH₂ (figure 20).

L'activation de différentes enzymes de type isomérase, synthase et réductase, permet ensuite la conversion du PGH₂ en prostanoïdes. Ces prostanoïdes incluent les prostaglandines PGD₂ et PGE₂ qui proviennent de l'isomérisation de PGH₂, respectivement via les PGD et PGE synthases, la prostaglandine PGF₂ α résultant de la réduction de la PGH₂ ou de la PGE₂, les prostacyclines PGI₂ issues de la conversion de la PGH₂ par la prostacycline synthase, les thromboxanes TXA₂/TXB₂ formés par la conversion de la PGH₂ par la TX synthase (TX-S) et les cyclopentones PGA₂ et PGJ₂ qui dérivent des PGE₂ et des PGD₂ (figure 20).

La COX-2 semble jouer un rôle important dans la carcinogénèse tant par son expression cellulaire et son activité métabolique que par les effets physiologiques des prostanoïdes (Cao Y et Prescott SM 2002). La surexpression de COX-2 a également été décrite dans divers types de cancers tels que entre autres, le cancer du pancréas, les adénocarcinomes de l'œsophage, le cancer de l'estomac, le cancer du sein, le cancer de la prostate, les carcinomes bronchiques non à petites cellules et dans les adénomes colorectaux (Nie D et Honn KV 2002, Masmoudi A et al. 2005).

Plusieurs mécanismes semblent être à l'origine de l'implication de COX-2 dans les processus de cancérisation (figure 21). Une action directe de COX-2 au cours de la cancérisation peut être imputée à son implication dans le métabolisme des xénobiotiques dans les tissus non hépatiques. Ainsi, la sous-unité à activité peroxydase de COX-2 catalyse la conversion de procancinogènes tels que le benzo[a]pyrène en carcinogènes comme le benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (Dannenber AJ et al. 2001) (figure 21). De plus, les cyclooxygénases libèrent des radicaux hydroperoxydes qui exercent un rôle dans l'activation de carcinogènes en catalysant l'oxydation de nombreux xénobiotiques en intermédiaires réactifs susceptibles de lier l'ADN.

La COX-2 génère également le malonaldéhyde (MDA), un agent mutagène capable de former des adduits à l'ADN et dont la synthèse est sous la dépendance de l'activité de la TXA2 synthase qui transforme 50 % de la PGH2 en TXA2 et 50 % en MDA (Dannenber AJ et al. 2001, Rodrigues S et al. 2004) (figure 21).

La COX-2 participe également à la stimulation de la néoangiogénèse au niveau des tumeurs en augmentant la production de VEGF (vascular endothelial growth factor) qui stimule l'angiogénèse et favorise la vascularisation des tumeurs (Dannenber AJ et al. 2001).

Plusieurs travaux ont également décrit qu'une forte concentration d'AA exogène peut provoquer l'apoptose, indépendamment de la formation de prostaglandines (Surette ME et al. 1996, Surette ME 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 l'apoptose. L'action de la COX-2 dans les processus de cancérisation passe également par les effets biologiques des produits de COX-2.

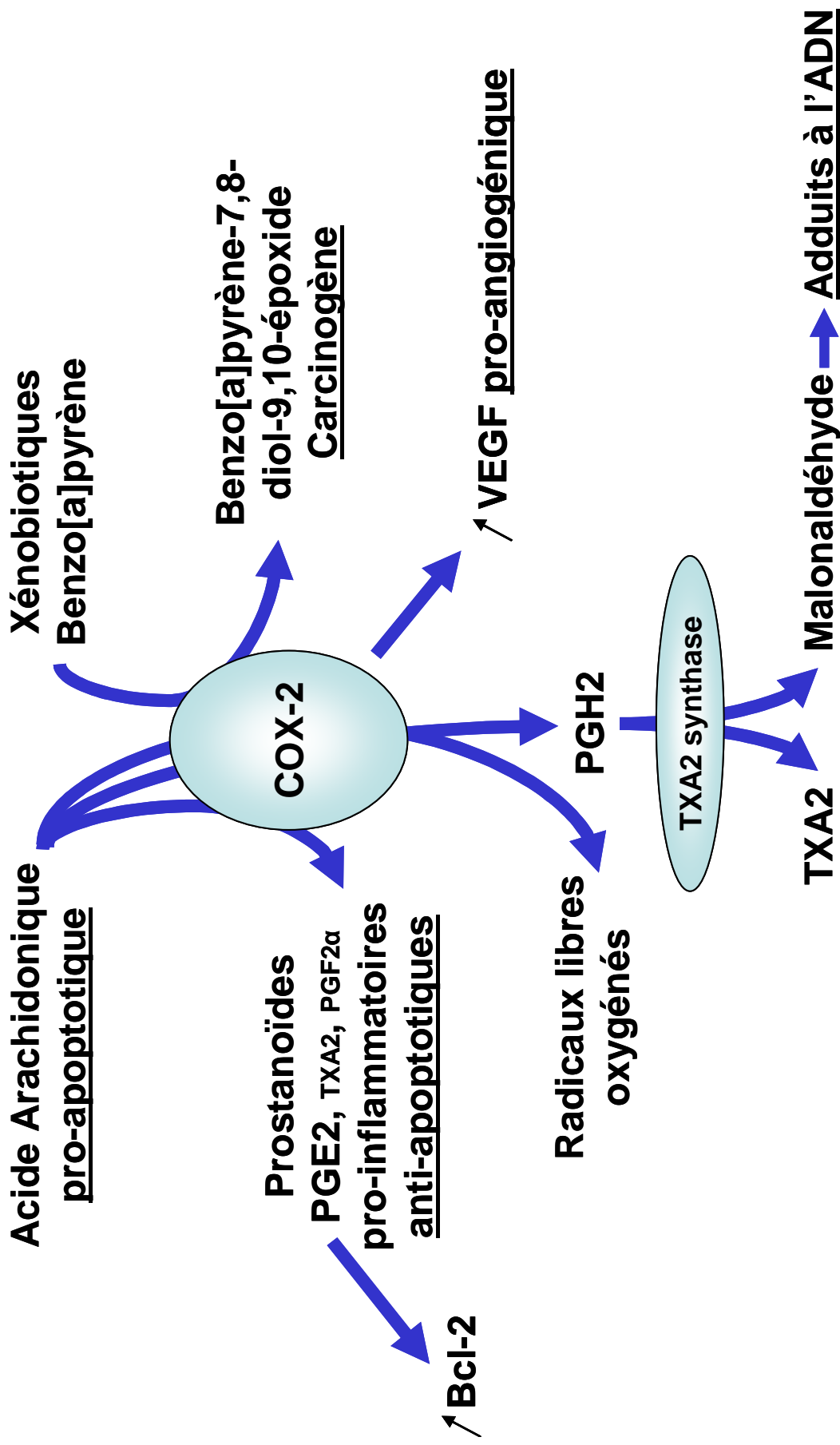


Figure 21 : Rôle pro-carcinogène de COX-2

Ces effets sont transmis par l'activation de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques ou de récepteurs nucléaires appartenant à la famille des PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) qui agissent directement comme facteurs de transcription après fixation du ligand (Rodrigues S et al. 2004). Certains prostanoïdes comme les cyclopentones (PGJ2/PGA2) exercent des effets non transformants en inhibant le cycle cellulaire et en régulant l'expression génique par la fixation sur les récepteurs nucléaires de la famille des PPAR (Rodrigues S et al. 2004).

Les autres prostanoïdes (PGE2, TXA2 et PGF2 α) exercent des effets pro-inflammatoires et participent à la progression tumorale. PGE2 constitue le principal produit dérivé des COX. La surproduction de PGE2 a été décrite dans de nombreux cancers comme le cancer du pancréas (Kokawa A et al. 2001), de l'estomac (van Rees BP et al. 2002), le cancer de la prostate (Fujita H et al. 2002), le cancer du poumon (Hasturk S et al. 2002), les cancers du sein (Soslow RA et al. 2000) ou le cancer de l'oesophage (Buskens CJ et al. 2002).

Les prostaglandines participent en effet au contrôle de la prolifération cellulaire (Hakeda Y et al. 1991) et rendent les cellules résistantes à l'induction de l'apoptose (Tsuji M et DuBois RN 1995, Kroll B et al. 1998).

De plus, de nombreux travaux portant sur les inhibiteurs de COX-2 ont démontré leur importance dans le traitement de divers cancers (Masmoudi A et al. 2004).

IX- LE LÉFLUNOMIDE

Le léflunomide (LEF) est un dérivé isoxazole synthétique (N-[4-trifluoro-méthyl-phényl]-5-méthylisoxazol-4-carboxamide). Il s'agit d'un agent immunomodulateur utilisé dans le traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde (PR), commercialisé sous le nom d'Arava[®]. La PR est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. La PR est une affection dont l'origine précise n'est pas connue. Cependant on classe la PR comme une maladie auto-immune à cause de la présence de signes biologiques d'auto-réactivité. Cette maladie se manifeste par une inflammation chronique de la membrane qui entoure les articulations (la membrane synoviale). L'inflammation de la synoviale réalise une synovite chronique caractérisée par l'interaction entre des cellules du système immunitaire (lymphocytes et macrophages principalement) issues du sang qui après migration entrent en contact avec les cellules mésenchymateuses articulaires (fibroblastes / synoviocytes) et sont à l'origine de manifestations inflammatoires. La formation de la synovite de PR réalise un pannus dont la chronicité entraîne la destruction de l'os et du cartilage. Le LEF répond à la définition de DMARD (Disease Modifying AntiRheumatic Drug), avec une amélioration des signes et symptômes de la maladie et une diminution des dommages structuraux causés par la PR (Osiri M et al. 2003, Kalden JR et al. 2003). Le LEF est une prodrogue qui est rapidement métabolisée au niveau du foie en son métabolite actif nommé A77 1726. Ce métabolite est responsable de la quasi-totalité des effets pharmacologiques du LEF.

Le principal effet du LEF est l'inhibition de la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), une enzyme clé de la voie de biosynthèse de novo de pyrimidine dans les cellules à division rapide. Cette inhibition a pour effet l'induction d'un arrêt réversible du cycle cellulaire qui peut être réversé après adjonction d'uridine (Fox RI 1998, Rückemann K et al. 1998).

Dans le cadre du traitement de la PR, le léflunomide semble être actif sur différentes cibles. De par son activité d'inhibition de la DHODH, le LEF inhibe la prolifération des lymphocytes activés qui ont envahi la membrane synoviale. Le LEF diminue également l'expression de molécule d'adhésion sur les monocytes et inhiberait leur migration trans-endothéliale vers le site inflammatoire articulaire (Grisar J et al. 2004).

Le LEF modifie également le phénotype et les fonctions des cellules dendritiques ce qui perturbe leur capacité à stimuler la prolifération des cellules T (Kirsch BM et al. 2005).

Au niveau du processus inflammatoire, il a été observé que le LEF diminue la production de PGE2 dans plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* et notamment dans les cultures de cellules synoviales (Burger D et al. 2003, Vergne-Salle P et al. 2005). En fait, le LEF inhibe l'activité de COX-2, c'est-à-dire la production de prostanoïdes, sans affecter l'expression de COX-2 (Curnock AP et al. 1997).

Le LEF est également un puissant inhibiteur de l'activation de NFκB, notamment dans les lymphocytes T stimulés par le TNFα (Manna SK et Aggarwal BB 1999, Manna SK et al. 2000).

Le LEF inhibe également à forte dose, l'activité des tyrosine kinases et celle des récepteurs à tyrosine kinase (Xu X et al. 1995, Arora A et Scholar EM 2005).

Depuis quelques années, des usages thérapeutiques du LEF, autres que son utilisation dans le traitement de la PR, ont eu tendance à apparaître. Ainsi le LEF a pu être utilisé dans les traitements immunosuppresseurs après implantation de greffes (Yan Y et al. 2005, Chong AS et al. 2006). Des études ont été également menées sur l'utilisation du LEF dans certaines affections auto-immunes comme le lupus érythémateux (Tam LS et al. 2004) bien que ces études soient sujettes à controverse.

De plus, le LEF et certains de ses dérivés semblent posséder un potentiel anti-tumoral mis en évidence par une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose dans certaines lignées cellulaires cancéreuses en culture (Ghosh S et al. 1998, Xu X et al. 1999, Huang M et al. 2002).

MATERIELS ET METHODES

I- LIGNÉES CELLULAIRES, CULTURE ET TRAITEMENTS

Les lignées cellulaires étudiées sont les lignées érythroleucémiques humaines HEL (human erythroleukemia) et K562 et la lignée de leucémie mégacaryoblastique Meg-01. La lignée HEL provient de l'American Type Culture Collection (ATCC) et nous a été gracieusement fournie par le Pr. J.P. Cartron (INSERM U76, Paris). Cette lignée a été obtenue en cultivant des cellules mononucléées du sang circulant d'un malade qui présentait une érythroleucémie après rémission d'une maladie de Hodgkin (Martin P et Papayannopoulou T 1982). La lignée K562 provient de l'ATCC et nous a été gracieusement fournie par le Dr I. Dusanter-Fourt (INSERM U576, Paris). Les cellules K562 ont été isolées par mise en culture de cellules provenant d'une effusion pleurale d'une femme atteinte de leucémie myéloïde chronique (Lozzio BB et Lozzio CB 1977). La lignée Meg-01 provient de l'ATCC. Les cellules Meg-01 proviennent de la moelle osseuse d'un homme présentant une leucémie myéloïde chronique en phase de crise blastique (Ogura M et al. 1985).

Les cellules HEL et K562 sontensemencées en flacons de culture de 75 cm², à une densité de 10⁵ cellules/ml de milieu de culture et maintenues entre 10⁵ et 10⁶ cellules/ml. Le milieu utilisé est du RPMI 1640 (GibcoBRL) complémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, GibcoBRL), 1% de pyruvate de sodium (GibcoBRL), 1% d'HEPES (GibcoBRL) et par une solution de pénicilline/streptomycine (100U/ml et 100µg/ml, GibcoBRL). Les cellules Meg-01 sont cultivées dans le milieu de culture complet des cellules HEL et K562 dans lequel sont ajoutés 1,5 g/l de bicarbonate de sodium (GibcoBRL) et 4,5 g/l de glucose (GibcoBRL).

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 10⁵ cellules/ml de milieu pour les cellules HEL et K562 et à une densité de 2x10⁵ cellules/ml pour les cellules Meg-01.

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 pendant 24h afin d'atteindre leur phase exponentielle de croissance, 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-3 β -ol, Sigma), de léflunomide (N-(4-trifluorométhylphényl)-5-méthylisoxazol-4-carboxamide, Aventis Pharma), de LY294002 (Inhibiteur de PI3K, Calbiochem), de phorbol myristate acétate (PMA, Sigma) et de staurosporine (Sigma) sont préparées dans l'éthanol puis diluées dans le milieu de culture à 10 % de SVF pour obtenir les concentrations finales voulues. Les solutions mères de U0126 (inhibiteur de MEK, Calbiochem) et d'étoposide (Sigma) sont préparées dans le DMSO. La solution mère d'arsenic trioxyde (Sigma) est préparée dans une solution d'hydroxyde de sodium 1M et l'hydroxyurée (Sigma) est préparé dans du PBS.

Les cellules témoins sont traitées par le même volume d'éthanol, de DMSO, d'hydroxyde de sodium 1M et de PBS que celui transportant les molécules d'intérêt.

II- ETUDE DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES LEUCÉMIQUES

1. Etude de la prolifération par le test au MTT

Le test au MTT (Mosmann T 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 témoins à celle des cellules traitées par les molécules.

Les cellules (HEL, K562, Meg-01) sontensemencées en plaques 96 puits selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans 100 μ l de milieu contenant 10 % de SVF avant d'être traitées. Pour chaque condition analysée, 12 puits différents sont réalisés (n = 12). Le traitement est réalisé pendant la phase de croissance et dure de 3 à 6 jours sans changement du milieu de culture.

Pour chaque temps étudié, 10 μ l de la solution de MTT (Sigma) (5 mg/ml, en tampon PBS) sont ajoutés dans chaque puits. Après 4 h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, 100 μ l d'une solution de lyse (SDS 10 % ; HCl 0,01 N) sont ajoutés par puits et les plaques sont incubées à 37°C sur la nuit afin de lyser les cellules et 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 : (DO moyenne des cellules traitées / DO moyenne des cellules contrôles) \times 100 \pm écart-type ; ou présentés sous forme de courbes retraçant l'évolution de l'absorbance en fonction du temps.

La viabilité et le nombre de cellules ont également été estimés par le test d'exclusion au bleu trypan après numération des cellules sur lame de Mallassez.

2. Etude de la morphologie des cellules traitées à la diosgénine par microscopie optique à contraste de phase

La morphologie des cellules traitées ou non par la diosgénine a été observée en microscopie optique à contraste de phase. Pour cela, les cellules HEL sontensemencées à une densité de 10^5 cellules/ml de milieu de culture, cultivées pendant 24 h puis traitées par de la diosgénine 40 μ M pendant 24 h ou par de la diosgénine 10 μ M pendant 48h. Les cellules sont ensuite observées au microscope à contraste de phase.

III- ANALYSE DE LA QUANTITÉ D'ADN (NIVEAU DE PLOÏDIE) PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

Les cellules HEL sontensemencées à une densité de 10^5 cellules/ml de milieu de culture, cultivées pendant 24 h puis traitées par de la diosgénine 40 μ M pendant 6h, 12h et 24 h ou par de la diosgénine 10 μ M pendant 24h, 48h, 96h et 144h. Les cellules sont ensuite 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 mises dans un nouveau tube, centrifugées, 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 μ l de PBS froid contenant de la RNase A (30 μ l), et incubées 20 min à température ambiante.

Une solution mère de RNase A à 100 mg/ml (Roche diagnostics, 40 U/mg) 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 μ g/ml) juste avant analyse.

Les analyses sont effectuées par cytométrie en flux à l'aide d'un analyseur-trieur Facs Vantage (Becton Dickinson, USA). Les résultats sont présentés sous forme de cytogramme : pic du signal de fluorescence (FL3, fluorescence de l'IP) en fonction du nombre de cellules passées. 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 différents niveaux de ploïdie (cycle cellulaire normal et polyploïdisation) est réalisée à partir des cytogrammes précédents avec le logiciel ModFit LT (Verity Software, USA). Les résultats peuvent alors être également présentés sous forme d'histogrammes indiquant le pourcentage de cellules dans les différents niveaux de ploïdie.

IV- ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR WESTERN BLOT

1. Extraction des protéines

1.1. Extraction des protéines totales

Les cellules sontensemencées dans des flacons de culture de 75 cm² selon la densité déterminée auparavant. Après 24 h de prolifération, les cellules sont traitées ou non par 40 µM de diosgénine (pendant 6h, 12h, 24h et 48h), 10 µM de diosgénine (6h, 12h, 24h, 48h, 96h, 144h et 192h) ou 10 µM de léflunomide (pendant 3h, 6h, 12h, 24 h, 48h et 72h). Les cellules sont ensuite récupérées, centrifugées et lavées en tampon PBS 1X froid.

Les culots cellulaires peuvent alors 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 -80°C avant de déterminer la concentration protéique par la technique colorimétrique de Bradford 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 15 µg/ml).

1.2. Extraction des protéines cytosoliques et membranaires.

Le fractionnement subcellulaire a été réalisé sur les cellules HEL traitées avec la diosgénine pendant 6 h, 12h et 24h. Les cellules sont récupérées, centrifugées et lavées en tampon PBS 1X froid. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du tampon d'extraction (Tris-HCl 40 mM pH=7,4 ; saccharose 0,25 M ; EDTA 1 mM ; dithiothréitol 5 mM ; leupeptine 10 µg/ml ; pepstatine 1 µg/ml ; aprotinine 10 µg/ml ; fluorure de sodium 10 mM ; phénylméthylsulfonyl fluoride 100 µM) et lysées par sonication. Le lysat cellulaire est alors centrifugé 1h à 100 000 g et à 4°C. Le

surnageant est alors récupéré et constitue la fraction cytosolique. Le culot composé des membranes cellulaires est resuspendu dans du tampon RIPA et constitue la fraction membranaire. Les concentrations protéiques de chaque fraction sont déterminées par la technique colorimétrique de Bradford contre une gamme étalon de BSA.

2. Analyses de l'expression des protéines.

Les protéines (20 à 80 µg) sont mélangées à un volume identique de tampon d'échantillon 2X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 ; SDS 2 % ; Glycerol 10 % ; dithiothréitol 100 mM ; Bleu de Bromophénol 0,1 %), puis dénaturées 5 min à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) (10 à 15% selon les protéines). La migration s'effectue pendant 2h (90 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 fabricant (Invitrogen). Le transfert s'effectue pendant 1h30 (20V, 100 mA).

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-Lait 4 % ou TBS 1X-Lait 4 %) 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 monoclonaux de souris sont dirigés contre les protéines humaines suivantes β -actine (Sigma, 1/5000), p21 (Santa Cruz Biotechnology, 1/500), p53 (Santa Cruz Biotechnology, 1/1000), cycline D1 (Santa Cruz Biotechnology, 1/500), cycline D3 (Santa Cruz Biotechnology, 1/500), Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, 1/500), Bax (Santa Cruz Biotechnology, 1/500), PARP (Santa

Cruz Biotechnology, 1/100), cPLA₂ (Santa Cruz Biotechnology, 1/100) et COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, 1/100).

Les protéines phospho-p53 (Ser 15), Akt1/2, phospho-Akt1/2/3 (Thr 308) et Bcl-xL sont révélées par des Ac polyclonaux de lapin (Santa Cruz Biotechnology, 1/500).

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 (Dako)]. La révélation des complexes antigène-anticorps spécifiques se fait sous agitation douce 1h à température ambiante en présence de l'Ac secondaire dilué au 1/1000 ou au 1/5000 (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 de marqueurs de poids moléculaires connus (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen). L'intensité relative des bandes est déterminée grâce au logiciel Kodak 1D (BioLabo).

V- ETUDE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL

Le potentiel membranaire mitochondrial ou $\Delta\Psi_m$ est estimé en utilisant la sonde JC-1 (5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétréthylbenzimidazole 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 de fortes concentrations. 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 ST et al. 1991).

Les cellules HEL sontensemencées à une densité de 10^5 cellules/ml et prolifèrent pendant 24h avant d'être traitées ou non par 40 μ M de diosgénine pendant 6h, 12h et 24h. Les cellules sont récupérées puis incubées dans 1 ml de milieu contenant la sonde JC-1 (1 μ g/ml) pendant 30 min à 37°C. Les photos ont été prises avec un microscope confocal laser Zeiss LSM 510 Meta (grossissement x 200).

VI- ETUDE DE L'ACTIVATION DE LA CASPASE-3

Le dosage de la quantité de caspase-3 active se fait à partir du kit « Quantikine[®] Human active caspase-3 » (R&D Systems). Ce kit ELISA est basé sur l'utilisation d'un inhibiteur de caspase biotinylé, le biotine-ZVKD-fmk. L'inhibiteur rentre dans les cellules et interagit avec la grande sous-unité de la caspase-3. Cette interaction se fait par la création d'un pont de type thio-ester stable entre l'inhibiteur et la cystéine du site catalytique de la caspase-3. Seules les caspase-3 actives sont ainsi modifiées car les formes inactives n'interagissent pas avec l'inhibiteur.

Les cellules HEL sont cultivées dans des flacons de culture de 75 cm². Les cellules sont traitées par 40 μ M de diosgénine pendant 12h, 24h et 48h ; par 10 μ M de diosgénine pendant 12h, 24h, 48h, 96h, 144h et 192h ; ou prétraitées ou non au léflunomide 10 μ M pendant 24h puis traitées par 10 μ M d'étoposide pendant 24h, 1 μ M de staurosporine pendant 24h ou déprivées en sérum pendant 96h.

A la fin du traitement, les cellules sont récupérées, rinçées dans du milieu et 10^6 cellules sont incubées pendant 1h à 37°C avec 10 μ M de l'inhibiteur biotine-ZVKD-fmk dans du milieu de culture.

Les cellules HEL sont ensuite récupérées, rinçées au PBS 1X et lysées dans du tampon d'extraction complété par des inhibiteurs de protéases [leupeptine (25 μ g/ml) ; pepstatine (25 μ g/ml) ; PMSF (100 μ M) ; aprotinine (3 μ g/ml)].

Les essais sont réalisés en plaque de 96 puits recouverts d'un anticorps monoclonal dirigé contre la caspase-3. Les échantillons sont dilués 20 fois et 100 μ L

sont déposés dans la plaque. En parallèle, une gamme étalon est préparée avec de la caspase-3 recombinante couplée à de la biotine.

La plaque est incubée 2h à température ambiante. La plaque est ensuite lavée afin d'éliminer tout ce qui n'a pas été retenu par l'anticorps anti-caspase-3, puis 100 μ L d'une solution de streptavidine-HRP (horseradish peroxydase) sont ajoutés.

La plaque est alors incubée 1h à température ambiante et la streptavidine se fixe sur la biotine portée par l'inhibiteur lui-même fixée aux caspase-3 actives. La plaque est ensuite lavée afin d'éliminer la streptavidine-HRP qui ne s'est pas fixée.

Enfin, une solution contenant le substrat de la HRP et une substance chromogène sont rajoutées. Au cours de l'incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, il se développe une réaction colorée qui est proportionnelle à la quantité de caspase-3 active présente.

La réaction est stoppée au bout des 30 min par l'adjonction d'une solution d'acide chlorhydrique et la densité optique est déterminée à 450 nm contre une longueur d'onde de correction de 540 nm.

La quantité de caspase-3 active dans les échantillons est alors déterminée par rapport à la gamme étalon de caspase-3 recombinante couplée à la biotine.

VII- ETUDE DE L'EXPOSITION DE LA PHOSPHATIDYLSÉRINE AU COURS DE L'APOPTOSE

Les cellules HEL sontensemencées en flacon de culture de 75 cm² à une densité de 10⁵ cellules/ml. Après 24h de prolifération, les cellules sont prétraitées ou non par 10 μ M de léflunomide pendant 24h puis traitées par 10 μ M d'étoposide pendant 24h, 1 μ M de staurosporine pendant 24h ou déprivées en sérum pendant 96h.

L'exposition de la phosphatidylsérine a été évaluée après marquage des cellules à l'annexine V. Les cellules témoins et traitées sont récupérées et lavées deux fois dans du PBS 1X. 10⁵ cellules sont alors reprises dans du tampon d'incubation (HEPES 10 mM, pH=7,4 ; NaCl 140 mM ; CaCl₂ 2,5 mM) en présence d'annexine V conjuguée à la phycoérythrine (Annexin V-PE, BD Pharmingen) pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité.

Les cellules sont lavées deux fois dans le tampon d'incubation et l'intensité du marquage à l'annexine V et le pourcentage de cellules marquées sont évalués par cytométrie en flux. Les cellules sont marquées à l'iodure de propidium (IP, 50 µg/ml) juste avant analyse afin de s'assurer de l'intégrité membranaire des cellules et de distinguer ainsi les cellules mortes des cellules vivantes ou en cours d'apoptose.

VIII- ANALYSE QUALITATIVE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN

Les cellules HEL et K562 sontensemencées en flacon de culture de 75 cm² à une densité de 10⁵ cellules/ml. Après 24h de prolifération, les cellules sont traitées comme suit :

Tests pour la diosgénine : les cellules HEL sont traitées par 40 µM de diosgénine pendant 12h, 24h et 48h.

Tests pour le léflunomide :

Cellules HEL et K562 : Les cellules ont été prétraitées ou non avec du léflunomide 10 µM pendant 24h avant d'être traitées par l'étoposide 10 µM pendant 24h, la staurosporine 1 µM pendant 24h, l'arsenic trioxyde 5 µM pendant 24h, l'hydroxyurée 5 mM pendant 24h ou déprivées en sérum pendant 96h par remplacement du milieu de culture.

Cellules HEL : Afin d'étudier le rôle de l'activation de la voie PI3K/Akt dans l'effet protecteur du léflunomide, les cellules sont exposées ou non à 10 µM de LY294002, un inhibiteur de PI3K pendant 2h, puis les cellules sont prétraitées ou non au léflunomide et traitées comme décrits précédemment avec les inducteurs d'apoptose.

Les cellules HEL et K562 sont ensuite récupérées, lavées au PBS 1X et un culot de 10⁵ cellules est constitué. Le culot cellulaire est alors repris dans du tampon de lyse (4 ml/10⁶ cellules) et incubé 30 min à température ambiante. La fragmentation de l'ADN est alors quantifiée par le kit « Cell Death Detection ELISA^{PLUS} » (Roche Diagnostics).

Après centrifugation (10 min à 200 g), 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 mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA. Le blanc de lecture est représenté par la solution d'ABTS (longueur d'onde de référence 490 nm).

Chaque condition est testée trois fois et les valeurs moyennes d'absorbance (405 nm - 490 nm) sont ensuite déterminées pour chaque échantillon et comparées aux valeurs obtenues pour les contrôles cellulaires (cellules non traitées).

IX- MESURE DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM INTRACELLULAIRE $[Ca^{2+}]_i$

Les cellules HEL sontensemencées à 10^5 cellules/ml puis après 24h de prolifération sont traitées ou non par la diosgénine 40 μ M pendant 6, 12, et 24h.

Les cellules sont centrifugées à 1300 rpm pendant 5 min puis reprises dans du tampon d'incubation (NaCl 110 mM ; KCl 5,4 mM ; $NaHCO_3$ 25 mM ; $MgCl_2$ 0,8 mM ; KH_2PO_4 0,4 mM ; NaH_2PO_4 0,33 mM ; HEPES 20 mM) à 2% de BSA.

La suspension cellulaire (5×10^4 cellules) est incubée 30 min à 37°C sous agitation en présence de la sonde Indo-1 (2 μ M). Cette sonde Indo-1 (acide 1-[2-amino 5-(6-carboxyindol-2-yl) phénoxy] 2-(2'-amino-5'-méthylphénoxy) éthane-N,N,N',N'-tétraacétique) présentant une forte affinité pour le calcium ($K_d=250$ nM), franchit la membrane cellulaire grâce à un groupement ester d'acétométhoxyl (AM). Une fois dans les cellules, la liaison Indo-1/AM est coupée par des estérases empêchant ainsi la sonde d'être relarguée dans le milieu extracellulaire.

En fin d'incubation les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 1300 rpm puis resuspendues dans du tampon de mesure (tampon d'incubation sans BSA) contenant du CaCl_2 (NaCl 110 mM ; KCl 5,4 mM ; NaHCO_3 25 mM ; MgCl_2 0,8 mM ; KH_2PO_4 0,4 mM ; NaH_2PO_4 0,33 mM ; HEPES 20 mM ; CaCl_2 1,2 mM).

Toutes les demi-secondes, la fluorescence émise par la sonde à 405 nm en réponse à une excitation à 345 nm est mesurée à partir de 5×10^5 cellules par spectrophotométrie (SFM 25, KONTRON).

Au bout de 500 mesures, le maximum de fluorescence relative est déterminé par l'addition de ionomycine (5 μM). Ce ionophore rend la membrane cellulaire spécifiquement perméable aux cations divalents comme le calcium saturant ainsi la sonde.

De la même façon, au bout de 700 mesures, le minimum de fluorescence relative est déterminé par l'addition de MnCl_2 (2 mM). Les ions Mn^{2+} entre en compétition avec les ions Ca^{2+} pour la liaison avec la sonde car celle-ci présente une plus forte affinité pour les ions Mn^{2+} que pour les ions Ca^{2+} .

La concentration en calcium intracellulaire $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est déterminée selon la méthode de Grynkiewicz et al. (1985) basée sur les différences de fluorescence entre les formes libres et liées au calcium de la sonde. La quantité de sonde liée est proportionnelle à la différence entre la fluorescence basale (F) et la fluorescence minimale (Fmin). La quantité de sonde libre est proportionnelle à la différence entre la fluorescence maximale (Fmax) et la fluorescence de base (F).

On a ainsi : $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times [(F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)]$

X- SUIVI SPÉCIFIQUE DE LA DIFFÉRENCIATION MÉGACARYOCYTAIRE

Afin d'évaluer le degré de différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL, les cellules ont été observées en microscopie optique après coloration au May-Grunwald-Giemsa et en microscopie électronique. L'évolution de l'expression des marqueurs membranaires a également été suivie par immunomarquage et cytométrie en flux.

1. Suivi de la différenciation en microscopie optique

Les cellules HEL sontensemencées à la densité de 10^5 cellules/ml et prolifèrent pendant 24h avant d'être traitées ou non par $10\ \mu\text{M}$ de diosgénine pendant 48h, 96h et 192h.

Les cellules sont ensuite récupérées et projetées sur lame par cyto centrifugation (300 rpm, 15 min). La lame est ensuite colorée au May-Grunwald pur pendant 3 min puis après rinçage à l'eau distillée, la lame est plongée dans un bain de Giemsa dilué au 1/10 durant 20 min.

Les préparations sont ensuite observées en microscopie optique à contraste de phase.

2. Suivi de la différenciation en microscopie électronique

Les cellules HEL sontensemencées à la densité de 10^5 cellules/ml et prolifèrent pendant 24h avant d'être traitées ou non par $10\ \mu\text{M}$ de diosgénine pendant 192h.

Les cellules sont ensuite fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 0,5% pendant 30 min à 4°C . Après rinçage, les cellules sont post-fixées dans une solution de tétr oxyde d'osmium à 1% pendant 30 min.

Après rinçages, les cellules sont déshydratées par passage dans les bains de solution alcoolique de degrés croissants puis incluses dans de la résine.

Des coupes « ultra-fines » sont réalisées et les préparations sont colorées avec le citrate de plomb et l'acétate d'uranyl. Les préparations sont ensuite examinées au microscope électronique.

3. Marquages membranaires du CD41 et de la glycophorine A

Les cellules HEL sontensemencées à la densité de 10^5 cellules/ml et prolifèrent pendant 24h avant d'être traitées ou non par $10\ \mu\text{M}$ de diosgénine pendant 24h, 48h, 96h et 144h.

Les cellules (10^6) sont récupérées, lavées et resuspendues dans du PBS 1X à 1% de BSA. Les cellules sont ensuite incubées dans ce tampon en présence d'un anticorps monoclonal de souris anti-CD41 couplé au FITC (1/100, Southern Biotech) et d'un anticorps monoclonal de souris anti-glycophorine couplé à la R-PE (1/100, Dako). Les cellules sont ainsi incubées pendant 1h à température ambiante puis lavées en PBS-BSA 1% et resuspendues en PBS avant d'être analysées par cytométrie en flux.

XI- ANALYSE DE L'ACTIVATION DES MAP KINASES

1. Analyse quantitative des formes phosphorylées des MAP Kinases ERK, p38 et JNK

Les cellules HEL, K562 et Meg-01 ont étéensemencées aux densités usuelles de 10^5 cellules/ml (HEL, K562) et 2×10^5 cellules/ml (Meg-01) et cultivées dans des flacons de culture de 75 cm^2 pendant 24h avant traitement.

Les cellules sont alors traitées par $40 \mu\text{M}$ de diosgénine pendant 20 min, 6h, 12h, 24h et 48h (cellules HEL) ; par $10 \mu\text{M}$ de diosgénine pendant 5min, 20 min, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 96h, 144h et 192h (cellules HEL) ; par $10 \mu\text{M}$ de léflunomide pendant 5min, 20 min, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h et 96h (cellules HEL, K562 et Meg-01) ; ou par 10 nM de PMA pendant 5 min et 20 min et par 300 mM de sorbitol pendant 30 min.

Les cellules (10^6) sont ensuite homogénéisées dans du tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases conformément au protocole du fabricant (R&D Systems).

Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés à $2000g$ pendant 5 min, puis les surnageants ont été dilués six fois. La détection de phospho-ERK [ERK1 (Thr 202/Tyr 204), ERK2 (Thr 185/Tyr 187)], phospho-JNK [JNK1-JNK2 (Thr 183/Tyr 185), JNK3 (Thr 221/Tyr 223)] ou phospho-p38 α (Thr 180/Tyr 182) a été réalisée selon les instructions du fabricant (R&D Systems).

Avant l'expérience, une plaque 96 puits a été recouverte avec 100 µl par puits d'anticorps spécifiques d'ERK, de p38 et de JNK (4 µg/ml) pendant la nuit à température ambiante. Cet anticorps lie la protéine non phosphorylée et phosphorylée.

Après trois lavages (400 µl/puits de tampon de lavage) et blocage en PBS-BSA 1% (300 µl/puits) pendant 1-2h à température ambiante, 100 µl d'échantillons dilués sont ajoutés dans chaque puits et incubés 2h à température ambiante. Une gamme étalon est préparée avec chacune des MAP kinases recombinantes phosphorylées.

Après lavages, un anticorps biotinylé spécifique de chaque MAP kinase est rajouté dans les puits. Cet anticorps est spécifique des formes phosphorylées de chaque MAP kinase.

Après 2h d'incubation, une solution de streptavidine couplée à une peroxydase (HRP) est ajoutée dans chaque puits pendant 20 min.

Après lavages, 100 µl d'une solution contenant le substrat de la HRP et une substance chromogène sont rajoutées. Au cours de l'incubation de 20 min à l'obscurité et à température ambiante, il se développe une réaction colorée qui est proportionnelle à la quantité de MAPK phosphorylée présente.

La réaction est stoppée au bout des 20 min par l'adjonction d'une solution d'acide sulfurique 2N et la densité optique est déterminée à 450 nm contre une longueur d'onde de correction de 540 nm.

La quantité de MAPK phosphorylée présente dans les échantillons est alors calculée en fonction de la gamme étalon préparée.

2. Analyse de la phosphorylation de ERK par cytométrie en flux

Les cellules HEL ont étéensemencées à une densité 10^5 cellules/ml et cultivées dans des flacons de culture de 75 cm² pendant 24 h avant traitement.

Les cellules sont alors traitées par 10 µM de léflunomide pendant 20 min, 6h et 24h.

Les cellules (10^6) sont rinçées au PBS 1X et reprises dans du tampon de fixation (Intrastain Reagent A, Dako). Les cellules sont ainsi fixées pendant 15 min à température ambiante puis rinçées au PBS.

Les cellules sont alors reprises dans un tampon de perméabilisation (Intrastain Reagent B, Dako) et incubées pendant 15 min à température ambiante.

Les cellules perméabilisées sont ensuite lavées et reprises dans du tampon de blocage PBS-BSA 1% pendant 30 min.

Les cellules sont alors incubées dans le tampon de blocage avec un anticorps primaire de souris anti-phospho-ERK (Tyr 204) (Santa Cruz Biotechnology, 1/50) pendant 1h à température ambiante.

Après rinçage au PBS, les cellules sont incubées pendant 45 min à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire de lapin anti-IgG de souris couplé à un fluorophore, l'Alexa 488 (Invitrogen, 1/2000).

Les cellules sont ensuite rincées au PBS et analysées par cytométrie en flux.

XII- PRÉPARATION DES EXTRAITS NUCLEAIRES ET ÉTUDE DE L'ACTIVATION DE NF-KB PAR DES ANALYSES DE RETARD SUR GEL

Les cellules HEL et K562 sontensemencées en flacon de culture de 75 cm² et prolifèrent pendant 24h avant d'être traitées ou non par 40 µM de diosgénine pendant 12h, 24h et 48h ; par 10 µM de diosgénine pendant 24h, 48h, 96h, 144h et 192h ; par 10 µM de léflunomide pendant 3h, 6h, 12h, 24h et 48h ou par 25 ng/ml de TNFα pendant 30 min.

1. Préparation des extraits nucléaires

Les cellules HEL sont récupérées, lavées dans du PBS froid et remises en suspension dans du tampon de lyse (10 mM HEPES pH 7,9 ; 1,5 mM MgCl₂ ; 10 mM KCl ; 0,5 mM dithiothreitol ; 0,2 mM PMSF, inhibiteurs de protéase; 0,5% Nonidet P-40) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete™ Mini, Roche Diagnostics), puis la solution est agitée vigoureusement et incubée 20 min dans la glace.

Le lysat cellulaire est centrifugé (2000 g, 10 min à 4°C) et le surnageant correspondant à l'extrait cytosolique est récupéré et la quantité de protéines est dosée par la méthode de Bradford.

Le culot de noyaux est alors repris dans un tampon d'extraction nucléaire (20 mM HEPES pH 7,9 ; 420 mM NaCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 10 mM KCl ; 15% glycerol ; 0,2 mM EDTA ; 0,5 mM dithiothreitol ; 0,2 mM PMSF, inhibiteurs de protéase Complete™ Mini).

Après incubation de 30 min dans la glace sous agitation intermittente (au vortex), les débris nucléaires sont éliminés par centrifugation (13000 g, 10 min à 4°C).

Le surnageant correspondant à l'extrait nucléaire est dosé par la méthode colorimétrique de Bradford et conservé à -80°C.

2. Analyse de retard sur gel

L'analyse du retard sur gel a été réalisée grâce à un kit « DIG GEL SHIFT » (Roche diagnostics).

Une quantité de 10 µg de protéines nucléaires sont incubées pendant 15 min à température ambiante avec une sonde spécifique de NFκB marquée par de la digoxigénine en accord avec les instructions du fabricant.

Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 5% et les protéines nucléaires et les complexes protéines-sonde sont séparés par électrophorèse en conditions natives et la migration se fait à 80 V pendant 1h30 dans du tampon TBE 0,5X (Tris-Borate-Acétate).

Les protéines nucléaires et les complexes protéines-oligonucléotides sont ensuite transférés sur une membrane en nylon (Roche). La membrane est ensuite séchée et fixée par exposition aux UV pendant 3 min.

La membrane est alors bloquée dans une solution de blocage pendant 30 min puis incubée pendant 30 min en présence d'un anticorps polyclonal de chèvre anti-digoxigénine couplé à une phosphatase alcaline.

La révélation se fait par incubation de la membrane dans un réactif de chimiluminescence CSPD® puis par exposition sur un film autoradiographique.

XIII- ETUDE DE L'ACTIVITÉ COX-2 PAR DOSAGE DE LA PGE2

Le kit « Prostaglandin E2-monoclonal enzyme immuno assay » (Cayman Chemical) permet de mesurer la production au cours du traitement de PGE2 synthétisée par les cyclooxygénases cellulaires à partir du métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique.

Les cellules HEL sontensemencées à 10^5 cellules/ml puis après 24h de prolifération sont traitées ou non par la diosgénine 40 μ M pendant 6, 12, et 24h. Le surnageant de culture est recueilli puis utilisé pour le dosage ou peut être congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

Le nombre de cellules présentes dans le milieu est estimé par numération au bleu trypan sur cellule de Mallassez afin de ramener la production de PGE2 au nombre de cellules vivantes.

Le dosage est basé sur le principe de compétition entre la PGE2 cellulaire libre présente dans l'échantillon et une PGE2 conjuguée à l'acétylcholinestérase (traceur) introduite en quantité connue dans le milieu réactionnel. Ces deux fractions entrent en compétition pour la liaison avec un anticorps anti-PGE2 de souris. La quantité de traceur capable de se fixer à l'anticorps anti-PGE2 est inversement proportionnelle à la concentration de PGE2 dans les échantillons.

Les complexes anticorps-PGE2 (cellulaire ou traceur) se lient également à des anticorps anti-souris de chèvre fixés dans chaque puits de la plaque 96 puits.

Pour chaque dosage, la plaque EIA doit comporter 2 blancs (réactif de Ellman seul) permettant de mesurer le bruit de fond, 2 puits « Non Specific Binding », (tampon EIA, traceur, réactif de Ellman) permettent d'évaluer la liaison non spécifique du traceur, 2 puits B0 (tampon EIA, traceur, anticorps anti-PGE2, réactif de Ellman) permettent de mesurer la liaison maximale du traceur en présence d'anticorps anti-PGE2 et 2 puits « Total Activity » (traceur, réactif de Ellman) permettent de mesurer l'activité du traceur sans compétition.

Une gamme standard de PGE2 allant de 0 à 1 ng/ml est également préparée. La gamme et les échantillons sont alors introduits dans les puits, le traceur et l'anticorps anti-PGE2 sont ensuite ajoutés.

Après incubation 18h à 4°C, la plaque est vidée et lavée 5 fois 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. Après incubation (60 min à température ambiante, à l'obscurité et sous agitation), 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 PGE2 présente dans nos échantillons. La concentration de l'échantillon en PGE2 est déterminée contre la gamme standard de PGE2 allant de 0 à 1 ng/ml.

Les résultats sont exprimés en quantité de PGE2 par ml (pg/ml) rapporté au nombre de cellules viables présentes dans les puits (pg/ml/10⁶ cellules). La concentration de PGE2 est obtenue en tenant compte des valeurs d'absorbance des blancs et en utilisant la courbe de référence d'équation : $\text{standard}/B_0 = f([PGE2])$.

XIV- ANALYSE DE L'EXPRESSION DES ARNm DE CERTAINS MARQUEURS DE DIFFÉRENCIATION MÉGACARYOCYTAIRE

1. Extraction des ARNs totaux

Les ARNs totaux sont extraits des cellules HEL traitées ou non à la diosgénine 10 µM pendant 24h, 48h, 96h, 144h et 192h.

L'extraction des ARN totaux est réalisée sur colonne à partir du kit RNeasy Mini kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

Environ 4x10⁶ cellules sont récupérées, centrifugées, lavées deux fois au PBS 1X froid et de nouveau centrifugées. Le culot cellulaire est lysé par 350 µl de tampon RLT. Ce tampon contient un détergent à haute concentration, un agent dissociant et de l'isothiocyanate de guanidine afin d'inhiber les RNases. Ce tampon est complété par de l'éthanol et du β-mercaptoéthanol selon les instructions du fabricant.

Après ajout d'un volume d'éthanol à 70% (350 µl), le lysat est homogénéisé à la pipette automatique puis transféré sur une colonne. Cette colonne comporte une membrane constituée par un gel de silice qui va retenir les ARNs.

La colonne est alors centrifugée (8000 g 15 sec à température ambiante) et ce qui n'a pas été retenu par le gel de silice est éliminé.

La colonne est alors transférée sur un tube propre et lavée une fois dans du tampon RW1 contenant de l'éthanol et deux fois dans du tampon de lavage RPE par centrifugation 15 sec à 8000 g.

La membrane est ensuite séchée par centrifugation 2 min à 8000 g. Les ARNs sont ensuite élués par de l'eau stérile dépourvue de RNase à partir de la membrane de silice par centrifugation 1 min à 8000 g.

La qualité de l'extraction ainsi que la quantité d'ARN ont été évaluées au moyen d'une plaque RNA 6000 Nano LabChip® (Agilent Technologies), par mesure spectrophotométrique sur un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies).

Les ARNs sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation .

2. Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire

L'expression des gènes codant le CD41, le CD61, le CD62, la GpV et la GpIX est évaluée par la technique de TaqMan® Low-Density Array (TLDA) basée sur l'analyse d'une Micro Fluidic Card Applied Biosystems 7900HT en prenant l'expression de la GAPDH comme référence.

Les ARN totaux extraits des cellules HEL traitées à la diosgénine sont rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit «High Capacity cDNA Archive» (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant.

Les sondes TaqMan et les amorces spécifiques des gènes CD41, CD61, CD62, GpV, GpIX et GAPDH ont été sélectionnées à partir de la banque de séquences TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Les séquences sélectionnées peuvent être consultées sur le site du fabricant (Applied Biosystems) avec les numéros d'accession suivants (Assay ID) :

- CD41 : Hs00166246_m1
- CD61 : Hs00173978_m1
- CD62 : Hs00174583_m1

- GpV : Hs00174754_m1
- GpIX : Hs00236828_m1
- GAPDH : Hs 99999905_m1

Pour chaque condition étudiée, 20 μ l de cDNA (correspondant à 100 μ g d'ARN totaux) sont mélangés à 30 μ l d'eau sans nucléase et 50 μ l de TaqMan Universal PCR Master Mix. Pour chacune des conditions, les 100 μ l de ce mélange de PCR sont déposés dans un réservoir de la Micro Fluidic Card.

Cette carte est ensuite centrifugée 1 min à 280g pour répartir le mélange dans les différents puits de la carte. Dans chaque puits, on retrouve une sonde TaqMan spécifique d'un des gènes d'intérêt.

Les puits sont ensuite scellés et la carte est introduite dans l'appareil de détection de séquences ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems).

L'amplification des séquences correspondant aux différents gènes d'intérêt est suivie en temps réel et la quantité relative de chacun des gènes amplifiés est rapportée à celle de la GAPDH.

Ce ratio est ensuite comparé entre les différents échantillons.

XV- UTILISATION DU MODÈLE HEL/DIOSGÉNINE EN SdFFF

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

Les méthodes de séparation par couplage flux-force (Field Flow Fractionation, FFF) représentent une famille de techniques apparentées à la chromatographie liquide où la colonne est remplacée par un canal en forme de ruban de très faible épaisseur (80-250 μ m) devant la largeur (1-2 cm) et la longueur (50-90 cm).

La technique de SdFFF (sedimentation field flow fractionation) a été développée dans les années 60. Son principe est basé sur l'élution différentielle de diverses espèces dans une phase mobile qui passe dans un canal de très faible épaisseur soumis à un champ externe gravitationnel perpendiculaire au canal.

La SdFFF utilise un champ multigravitationnel généré par la rotation du cylindre, elle est préférentiellement utilisée pour séparer des espèces de la grandeur du micron comme les cellules (Figure MXV-1).

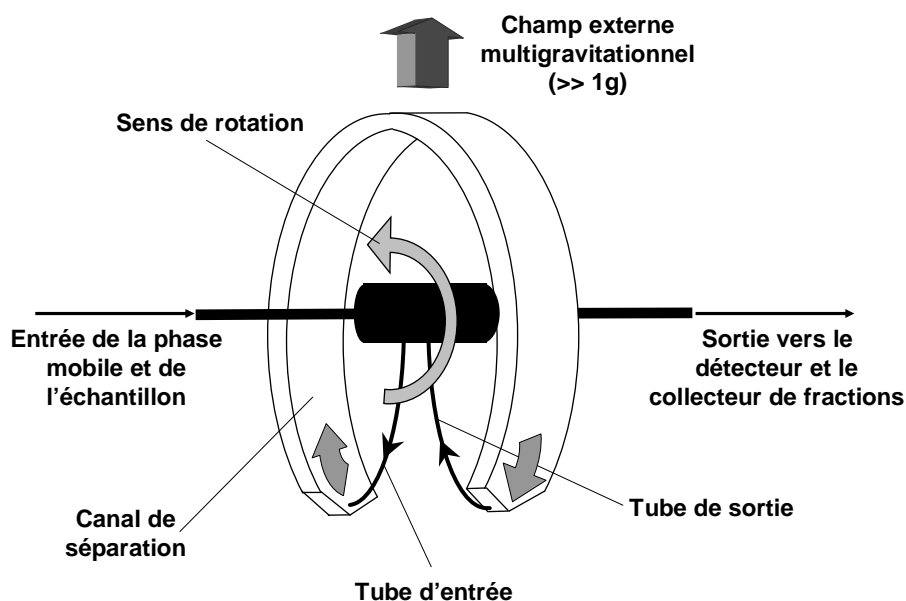


Figure MXV-1 : Schéma du canal de SdFFF.

L'utilisation du mode dit « hyperlayer » permet de faire circuler les cellules dans le canal tout en évitant les interactions des cellules avec la paroi d'accumulation qui pourraient altérer leur intégrité. La séparation des espèces cellulaires dépend alors de leur sensibilité à deux forces antagonistes:

- une force résultant d'un champ externe multigravitationnel ;
- une force d'élévation d'origine hydrodynamique.

La balance de ces deux forces définit une position d'équilibre pour chaque population de particules (Figure MXV-2).

En mode « hyperlayer », les caractéristiques de la SdFFF permettent la séparation de cellules en fonction de leur taille, de leur densité et de leur forme. 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 génèrent plus de forces hydrodynamiques, elles se positionnent donc plus près du milieu du canal et sont éluées plus rapidement et sortent donc en premier par rapport aux particules de petite taille (Figure MXV-2).

Principe général de la SdFFF

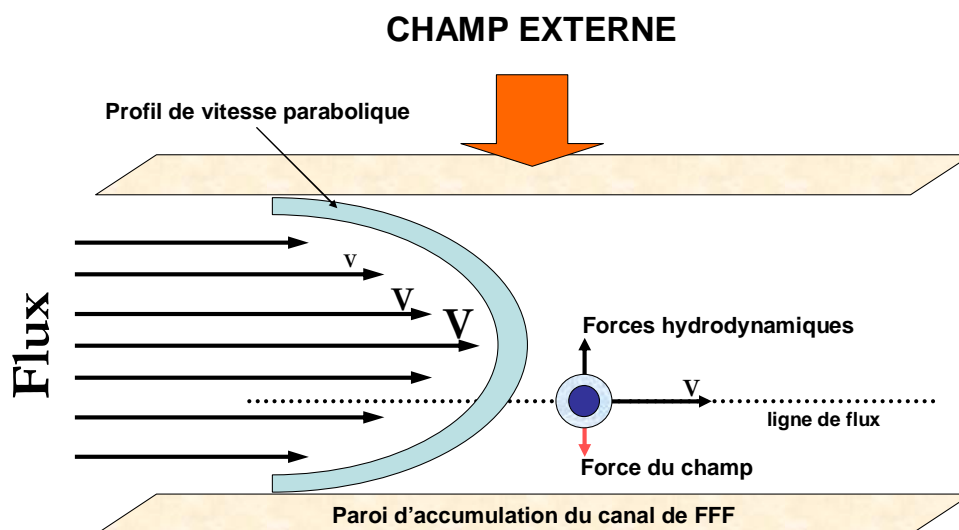


Figure MXV-2 : Principe d'éluion des cellules en SdFFF.

Le profil d'éluion 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 semblablement éluées.

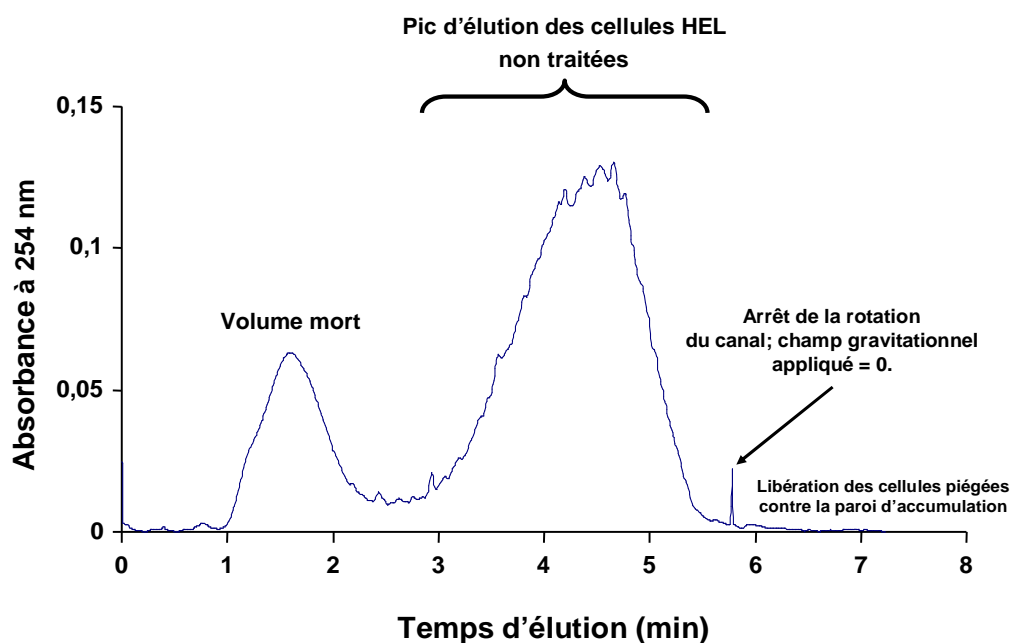


Figure MXV-3 : Fractogramme représentatif des caractéristiques d'éluion des cellules HEL.

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 cellules HEL/diosgénine afin de suivre par SdFFF des phénomènes biologiques tels que l'induction de l'apoptose ou de la différenciation mégacaryocytaire. De plus l'utilisation de différents canaux de SdFFF nous a également permis de modifier les conditions d'élution et notamment d'élargir le pic d'élution des cellules différenciées afin de pouvoir trier les cellules en fonction de leurs caractéristiques biologiques.

2. Etude de l'induction de l'apoptose par la diosgénine en SdFFF

Les cellules HEL sontensemencées à 10^5 cellules/ml puis après 24h de prolifération sont traitées ou non par la diosgénine 40 μ M pendant 6, 12, 24 et 48h.

Après traitement, les cellules sont centrifugées à 1300 rpm pendant 5 min et lavées en PBS 1X. Le culot est repris dans du PBS 1X et la concentration de la suspension cellulaire est ajustée à 2×10^6 cellules/ml.

Un volume de 100 μ l de cette suspension cellulaire est ensuite injecté dans l'appareil comportant un canal de 125 μ m d'épaisseur. Les cellules sont alors entraînées par la phase mobile constituée de PBS 1X dont le débit est régulé à 0,5 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 de 40g créé par la rotation du bol de centrifugation. L'élution des cellules est mesurée à 254 nm par un détecteur d'absorbance Water 484 (Water associate, Milford, MA, USA).

Pour chaque temps étudié, on réalise trois injections de cellules témoins et trois injections de cellules traitées afin de comparer leurs temps de rétention. Ce dernier est estimé par le temps nécessaire pour atteindre le sommet du pic d'élution.

3. Etude de l'induction de la différenciation mégacaryocytaire par la diosgénine en SdFFF

Les cellules HEL sont ensemencées à 10^5 cellules/ml puis après 24h de prolifération sont traitées ou non par la diosgénine 10 μ M pendant 12h, 24h, 48h et 96h. Un témoin positif de différenciation est également testé après traitement des cellules au PMA 50 nM pendant 48h, 72h, 96h et 120h.

Après traitement, les cellules sont centrifugées à 1300 rpm pendant 5 min et lavées en PBS 1X. Le culot est repris dans du PBS 1X et la concentration de la suspension cellulaire est ajustée à 2×10^6 cellules/ml.

La suite de l'expérimentation en SdFFF est réalisée comme ce qui est décrits précédemment dans le paragraphe 2.

4. Détermination du diamètre des cellules éluées par SdFFF

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.

5. Tri de population différenciées à la diosgénine par SdFFF

Les cellules HEL sont traitées de la même façon que précédemment puis injectées dans un appareil comportant le canal de 125 μ m d'épaisseur et dans un autre canal de 175 μ m d'épaisseur en fonction du tri a effectué.

En ce qui concerne les cellules différenciées pendant 96h à la diosgénine, elles sont injectées dans le canal de 125 μ m d'épaisseur. Le pic d'éluion des cellules est partagé en trois fractions qui sont collectées successivement.

Les caractéristiques des cellules dans les différentes fractions sont ensuite analysées par microscopie optique, mesure de la quantité en ADN des cellules et

immuno-marquage des marqueurs CD41 (différenciation mégacaryocytaire) et glycophorine A (marqueur érythrocytaire).

Les cellules HEL ont également été différenciées à la diosgénine pendant 24h seulement puis injectées dans le canal de 175 μm d'épaisseur. Le volume injecté de 100 μl de suspension cellulaire ($2,5 \times 10^6$ cellules/ml) est alors entraîné par la phase mobile dont le débit est réglé à 0,8 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 de 10g créé par la rotation du bol de centrifugation. L'élution des cellules est mesurée à 254 nm par un détecteur d'absorbance Water 484 (Water associate, Milford, MA, USA).

Dans le canal de 175 μm d'épaisseur, l'élargissement du pic d'élution des cellules par rapport au canal de 125 μm d'épaisseur permet la collection successive de quatre fractions.

Ces fractions sont remises en culture pendant 72h avant d'être à nouveau triées après passage dans le canal de 175 μm .

Les caractéristiques des cellules dans les différentes sous-fractions sont ensuite analysées par microscopie optique et mesure de la quantité en ADN des cellules.

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 P inférieure à 0,05 ($P < 0,05$) au test PLSD (Protected-least-significant-difference) de Fisher est considérée comme significative. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

RÉSULTATS

OBJECTIFS

La diosgénine est un stéroïde végétal qui a démontré de nombreuses propriétés biologiques sur des cellules cancéreuses en culture. Des travaux précédents réalisés au sein du laboratoire avaient permis de montrer que la diosgénine possédait un pouvoir anti-prolifératif et pro-apoptotique sur des lignées cancéreuses d'ostéosarcome, de laryngocarcinome et de mélanome. Par ailleurs, des travaux antérieurs avaient également suggéré que la diosgénine était capable d'induire la différenciation mégacaryocytaire des cellules érythroleucémiques humaines, les cellules HEL.

Les travaux présentés dans la partie suivante se sont attachés à étudier d'une part l'effet pro-apoptotique de la diosgénine et d'autre part à décrire les effets pro-différenciants de la diosgénine sur la lignée HEL.

Ces études des effets pro-apoptotiques et pro-différenciants de la diosgénine ont été étudiés au niveau des acteurs moléculaires de ces processus et au niveau de la transduction du signal activée par la diosgénine dans les deux phénomènes. Par ailleurs, l'induction de l'apoptose ou de la différenciation par la diosgénine a pour conséquence des perturbations morphologiques et physico-chimiques des cellules HEL. La modification de ces paramètres au cours de l'apoptose et de la différenciation a été suivie par une méthode innovante de chimie analytique, la SdFFF, qui nous a également permis de trier les cellules en fonctions de l'apparition de ces modifications et d'étudier les propriétés des populations isolées.

Le rôle de la cyclooxygénase-2 dans les phénomènes d'apoptose et de différenciation a également été évoqué au cours de ces travaux mais a principalement conduit à l'étude de propriétés nouvelles anti-apoptotiques, du léflunomide, molécule connue en tant qu'inhibiteur de l'activité de la cyclooxygénase-2.

I- EFFETS PRO-APOPTOTIQUES DE LA DIOSGÉNINE SUR LES CELLULES HEL

1. Prolifération cellulaire

1.1. Etude de la prolifération cellulaire par le test au MTT

Les cellules HEL sontensemencées à 10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération, les cellules sont traitées ou non (témoin) par une gamme de concentrations de diosgénine allant de 5 à 100 μ M. La prolifération des cellules traitées est alors suivie par le test au MTT pendant 72h et rapportée à la prolifération des cellules témoins qui est suivie de la même manière.

Après 24h de traitement, on observe une inhibition de la prolifération des cellules HEL en fonction de la dose utilisée (Figure RI-1). Pour des concentrations supérieures ou égales à 40 μ M, on observe une inhibition de la prolifération supérieure à 90% (Figure RI-1). La concentration de 20 μ M inhibe la prolifération des cellules d'environ 50 %, alors que les doses de 5 et 10 μ M ne semblent pas affecter la prolifération des cellules HEL à 24h (Figure RI-1). Nous verrons par la suite que l'effet de la dose de 10 μ M se manifeste après 48h de traitement.

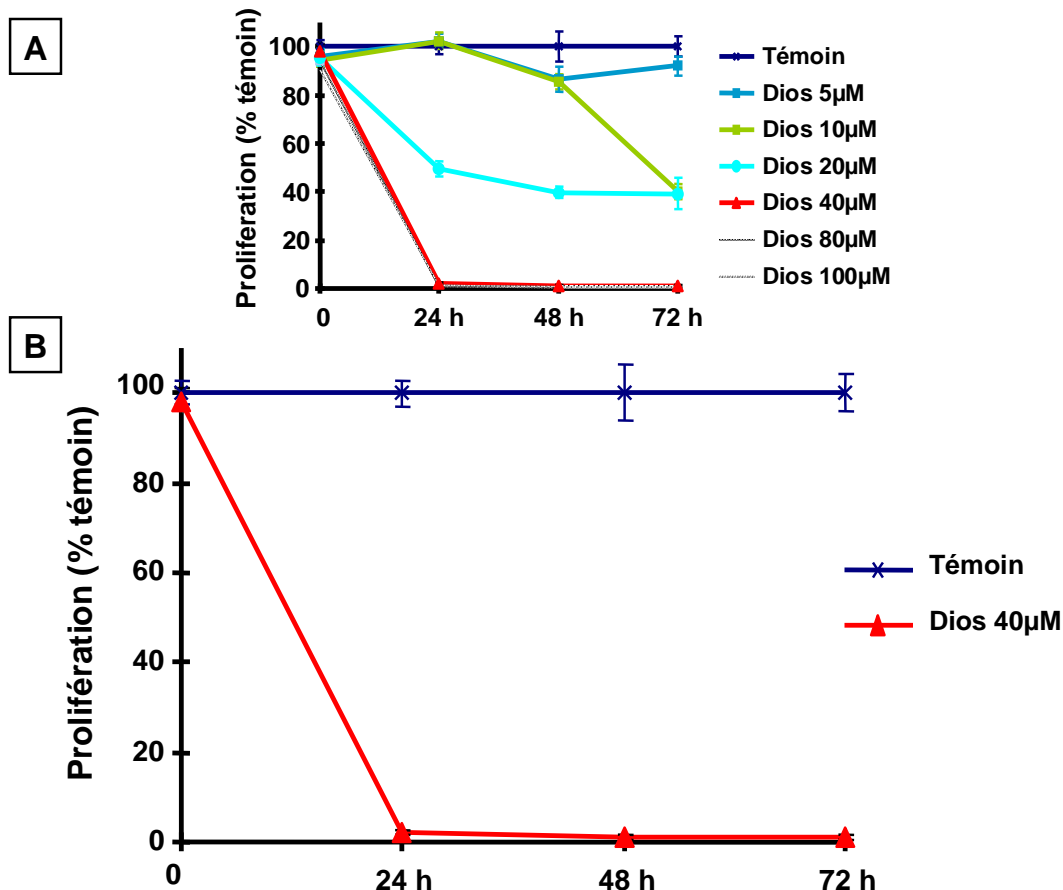


Figure RI-1 : Effets de la diosgénine sur la prolifération des cellules HEL.

Pour la suite des expérimentations concernant l'effet anti-prolifératif de la diosgénine sur les cellules HEL, nous avons choisi d'étudier la dose de 40 µM car elle présente un effet maximal dès 24h et que des doses supérieures ne présentent pas un effet plus important.

1.2. Observation microscopique des cellules traitées par 40 µM de diosgénine pendant 24h

Les cellules HEL ont étéensemencées à la densité de 10^5 cellules/ml et ont proliféré pendant 24h avant d'être traitées à la diosgénine 40 µM pendant 24h.

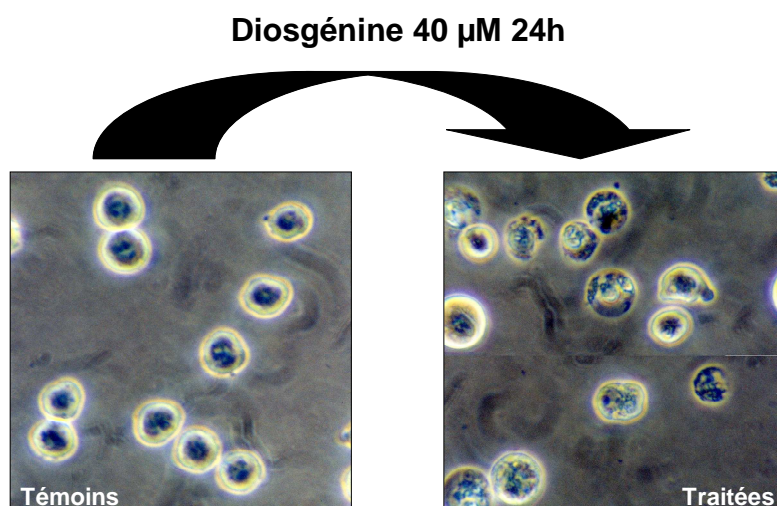


Figure RI-2 : Observation en microscopie optique des cellules HEL traitées à la diosgénine 40 μ M pendant 24h (grossissement x 400).

Le traitement par la diosgénine induit des modifications morphologiques des cellules se traduisant par une légère contraction cytoplasmique et l'apparition d'une fragmentation organisée de la cellule (Figure RI-2).

L'arrêt de la prolifération des cellules HEL après traitement à la diosgénine peut être due à un blocage du cycle cellulaire mais également à l'apparition de phénomènes de mort cellulaire. Ainsi, dans la suite de cette étude, nous nous sommes attachés à étudier les effets de la diosgénine sur le cycle cellulaire et l'apoptose des cellules HEL.

2. Etude du cycle cellulaire des cellules traitées à la diosgénine 40 μ M

2.1. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules HEL ont étéensemencées à une densité de 10^5 cellules/ml. Après 24h de prolifération, les cellules sont traitées par 40 μ M de diosgénine pendant 6h, 12h et 24h. Le traitement à la diosgénine 40 μ M induit une accumulation des cellules

en phase G₂/M du cycle cellulaire dès 6h après l'exposition à la diosgénine (Figure RI-3). En effet, à 6h de traitement, le pourcentage de cellules en phase G₂/M passe de 17,6% pour les témoins à 22,9% pour les cellules traitées à la diosgénine (Figure RI-3). Cette proportion de cellules en phase G₂/M passe ensuite à 41,5% à 12h de traitement (contre 16,6% pour le témoin 12h) et à 46,3% à 24h (contre 18% pour le témoin 24h) (Figure RI-3).

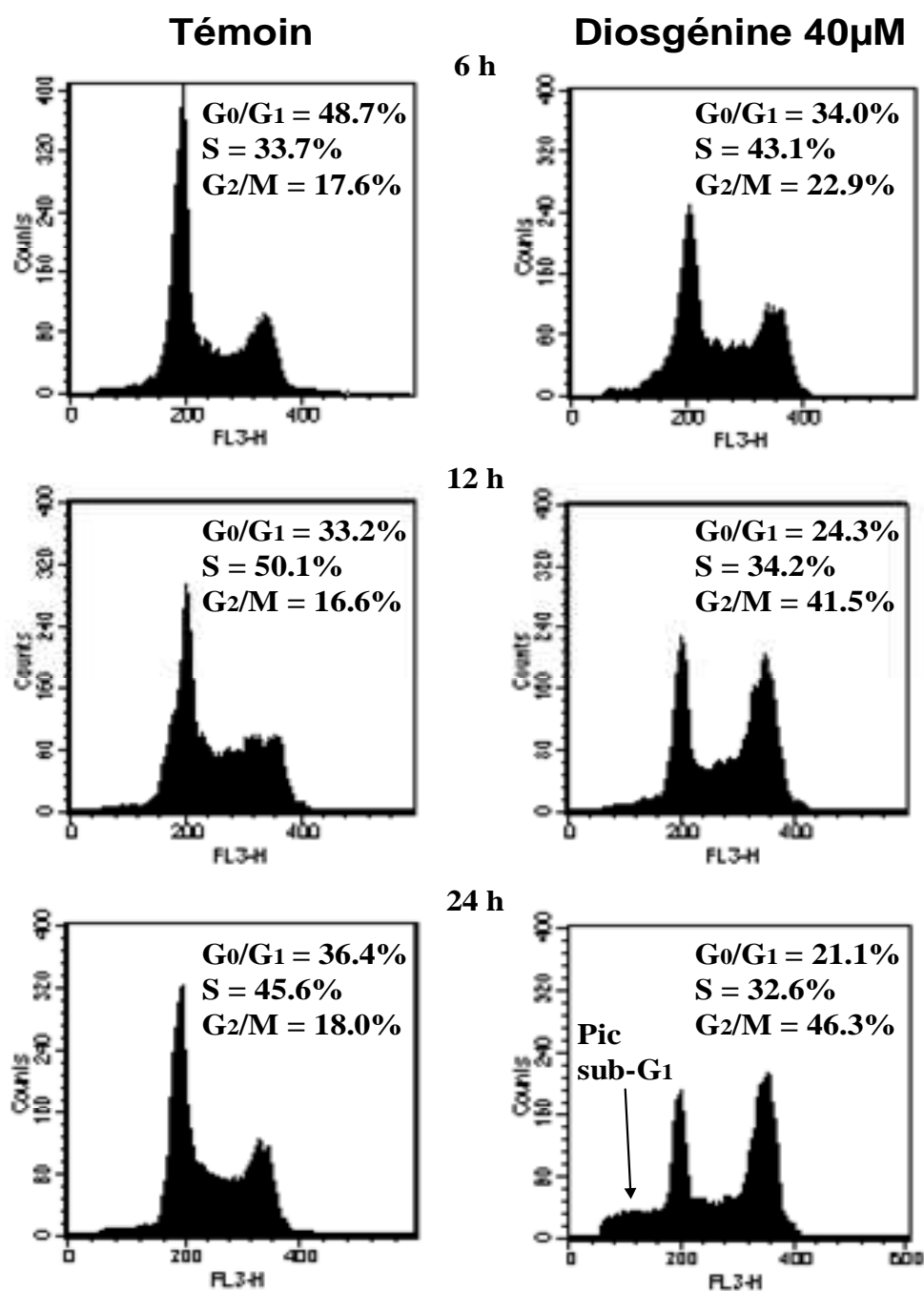


Figure RI-3 : Effets de 40 μM de diosgénine sur le cycle cellulaire des cellules HEL. Le contenu en ADN des cellules est analysé par cytométrie en flux après fixation et marquage à l'iodure de propidium.

Par ailleurs, l'analyse des cytogrammes obtenus par cytométrie en flux, révèle l'apparition d'une population dite sub-G₁ après 24h de traitement. Cette population présente donc un contenu en ADN altéré et est généralement associée à des cellules en cours d'apoptose (Figure RI-3).

2.2. Etude des effets de 40 μ M de diosgénine sur les régulateurs du cycle cellulaire p53 et p21

Un blocage des cellules dans une phase particulière du cycle cellulaire est généralement la conséquence de l'activation des principaux régulateurs du cycle cellulaire que sont p53 et p21. L'activation de p21 peut être dépendante ou non de l'activation de p53 et conduit à un arrêt du cycle dans différentes phases, principalement les phases G₁ et G₂/M.

La protéine p53 est une protéine dont l'activité est régulée par phosphorylation. La forme de p53 phosphorylée sur la sérine 15 est la forme la plus active de la protéine.

L'expression de la protéine p53 et de sa forme phosphorylée en sérine 15 ainsi que l'expression de la protéine p21 ont été suivies par western blot. Ces western blots ont été réalisés sur des extraits protéiques totaux de cellules HEL traitées pendant 6h, 12h et 24h à la diosgénine 40 μ M (Figure RI-4).

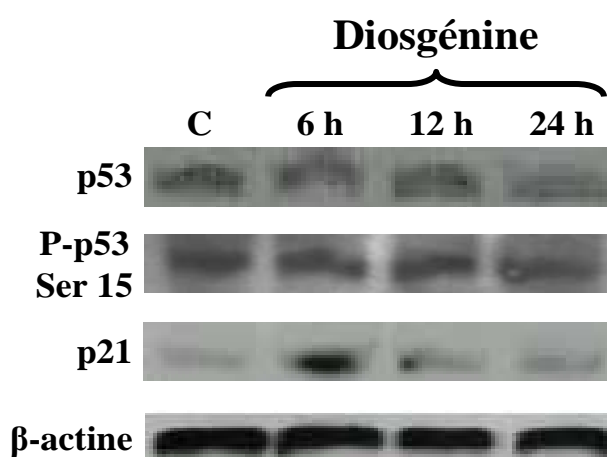


Figure RI-4 : Effets de la diosgénine 40 μ M sur l'expression des protéines p53, phospho-p53 et p21 régulant le cycle cellulaire. Western blots réalisés sur des cellules HEL traitées ou non (Contrôle, C) pendant 6h, 12h et 24h à la diosgénine 40 μ M.

Les résultats résumés dans la figure RI-4 démontrent que la diosgénine induit une forte augmentation de l'expression de la protéine p21 dès 6h de traitement. Cette augmentation reste visible à 12h, puis l'expression de p21 retourne à un niveau basal après 24h de traitement (Figure RI-4). Il semble également que cette induction de p21 soit indépendante de p53 puisque l'expression de p53 et sa phosphorylation ne varient pas au cours du traitement (Figure RI-4).

L'analyse du contenu en ADN des cellules HEL traitées par 40 μM de diosgénine ayant révélé l'apparition d'une population sub-G1 assimilée à des cellules en apoptose, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet pro-apoptotique de la diosgénine.

3. Etude de l'apoptose induite par la diosgénine dans les cellules HEL

L'apoptose est un phénomène physiologique et hautement régulé. L'induction de l'apoptose dans les cellules conduit à l'apparition de modifications précoces du fonctionnement cellulaire puis à l'activation du processus d'exécution de l'apoptose proprement dite. Les événements précoces de l'apoptose se déroulent généralement au niveau de la mitochondrie et en réponse à l'induction de l'apoptose, les caspases se chargent d'activer les processus qui conduiront à la fragmentation de l'ADN et de la cellule.

3.1. Chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) après traitement à la diosgénine 40 μM

La chute du $\Delta\Psi\text{m}$ est considérée comme un événement précoce au cours du déroulement de l'apoptose. Cette chute du $\Delta\Psi\text{m}$ a été analysée dans les cellules HEL traitées par 40 μM de diosgénine pendant 6h, 12h et 24h. L'étude du potentiel mitochondrial a été réalisée au moyen de la sonde JC-1. Cette sonde est un cation lipophile fluorescent qui existe sous forme de monomères lorsque la sonde est faiblement concentrée 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 alors que les mitochondries ayant un potentiel altéré ne peuvent concentrer JC-1.

Dès 6h de traitement à la diosgénine, on observe une chute du $\Delta\Psi_m$ dans les cellules HEL, alors que le potentiel reste intact dans les cellules témoins (Figure RI-5a et 5b). Cette chute du $\Delta\Psi_m$ est encore plus marquée à 12h et 24h dans les cellules traitées à la diosgénine 40 μM par rapport à leurs témoins respectifs (Figure RI-5c à 5f).

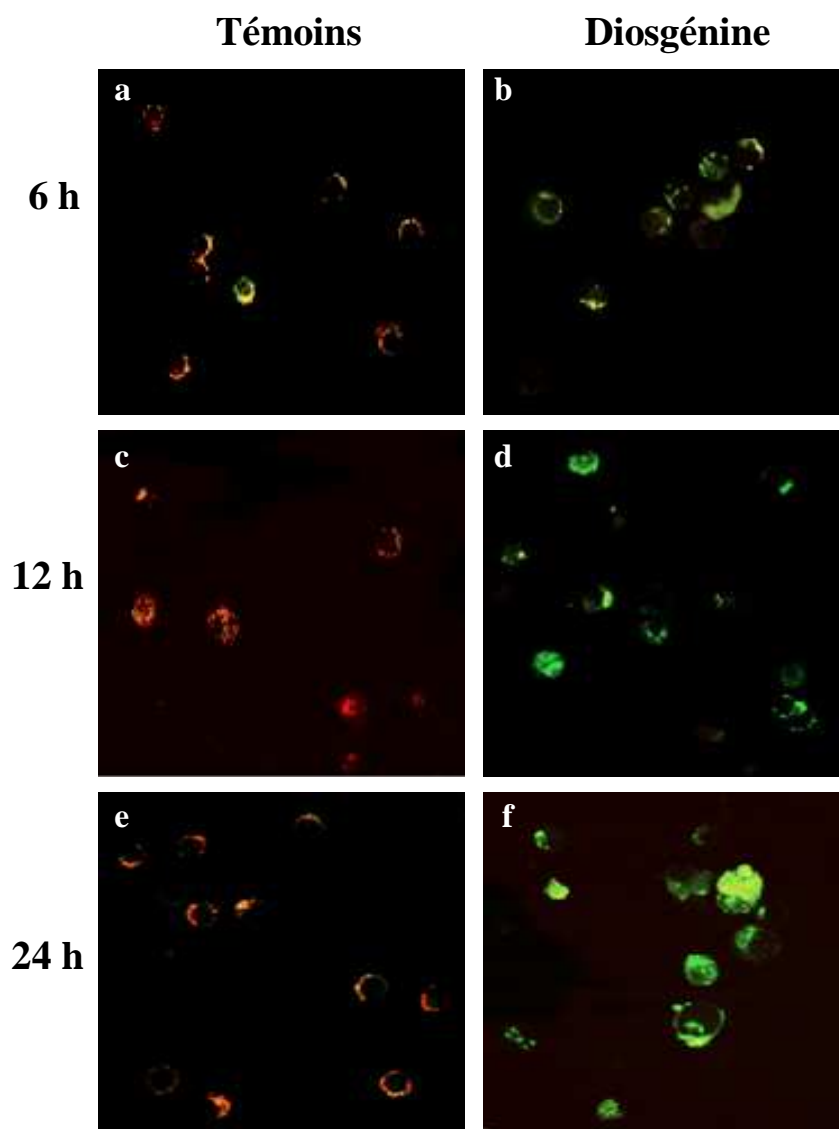


Figure RI-5 : Etude de la chute du potentiel mitochondrial après traitement des cellules HEL par 40 μM de diosgénine. L'étude du potentiel mitochondrial a été réalisée à l'aide de la sonde JC-1 qui fluoresce en rouge dans les mitochondries au potentiel membranaire intact et en vert dans les mitochondries au potentiel membranaire altéré.

3.2. Augmentation du taux de calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$

La chute du potentiel membranaire mitochondrial est généralement due à une ouverture de pores dans la membrane mitochondriale ou à une rupture de cette dernière. Ceci conduit à la libération des protéines mitochondriales d'une part mais également à la libération dans le cytosol du calcium séquestré dans la mitochondrie. Il en résulte une augmentation du taux de calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$. Les variations du $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules HEL traitées par 40 μ M de diosgénine ont été suivies à l'aide de la sonde Indo-1 qui présente une forte affinité pour le calcium.

Le traitement par 40 μ M de diosgénine induit une forte augmentation du $[Ca^{2+}]_i$. Ce dernier est augmenté d'un facteur 2,8 à 12h (210 nM pour le témoin 12h contre 578 nM pour les cellules traitées à la diosgénine) (Figure RI-6). De la même manière, le $[Ca^{2+}]_i$ atteint son maximum à 24h (1895 nM contre 194 nM pour le témoin 24h ; augmentation d'un facteur 9,8) (Figure RI-6). Ceci corrèle avec la chute du $\Delta\Psi_m$ qui est alors observé dans la majorité des cellules.

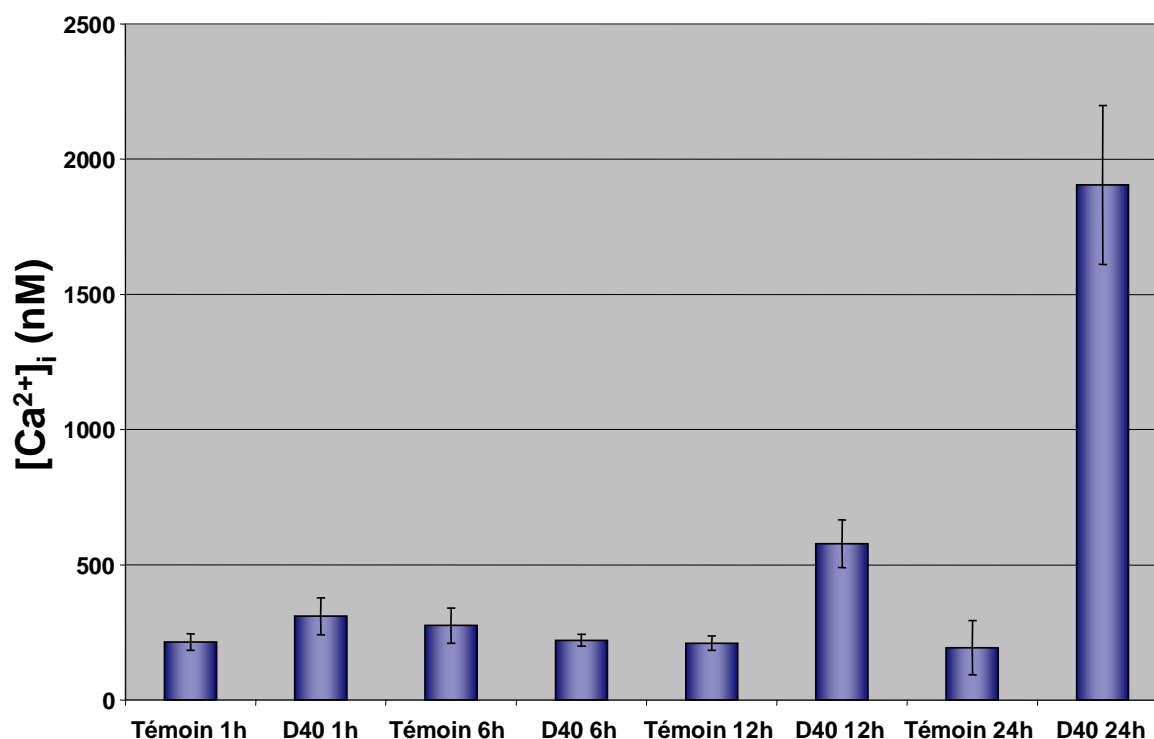


Figure RI-6 : Variations du taux de calcium intracellulaire après traitement par 40 μ M de diosgénine. Le taux de calcium intracellulaire est mesuré à l'aide de la sonde Indo-1.

3.3. Etude du ratio d'expression des protéines Bax et Bcl-2 après traitement des cellules HEL par la diosgénine 40 μ M

Les protéines de la famille Bcl-2 sont considérées comme les régulateurs principaux de l'induction de l'apoptose. Cette famille est composée de membres anti-apoptotiques dont le représentant principal est la protéine Bcl-2, et de membres pro-apoptotiques tels que la protéine Bax. Il a été démontré que le ratio d'expression des protéines Bax et Bcl-2 était un bon indicateur de la susceptibilité des cellules à entrer en apoptose. Une augmentation de ce ratio traduit généralement une plus grande sensibilité des cellules à l'induction de l'apoptose.

Le traitement des cellules HEL par 40 μ M de diosgénine induit une augmentation de ce ratio à 12h et 24h par rapport aux cellules témoins (Figure RI-7). Cette augmentation, d'un facteur 1,3 et 1,4 à 12h et 24h respectivement, est due à une diminution par le traitement de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, alors que l'expression de la protéine Bax reste stable tout au long du traitement (Figure RI-7).

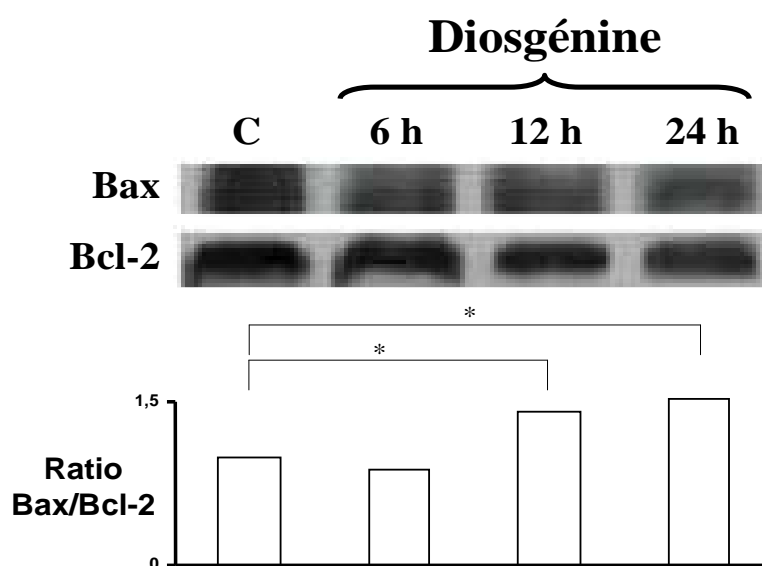


Figure RI-7 : Analyse de l'expression des protéines Bax et Bcl-2 dans les cellules HEL après traitement à la diosgénine 40 μ M. Western blot réalisé sur des cellules HEL traitées ou non (Contrôle, C) par 40 μ M de diosgénine.

Après avoir étudié l'induction de l'apoptose par la diosgénine dans les cellules HEL, nous nous sommes intéressés à l'exécution de l'apoptose proprement dite à travers l'étude de l'activation de la caspase-3 effectrice et des conséquences de

cette activation au niveau du clivage de substrats cellulaires tels que la PARP. Nous nous sommes également attachés à décrire dans les cellules HEL, la fragmentation de l'ADN qui est une étape finale de l'apoptose.

3.4. Activation de la caspase-3

L'activation de la caspase-3 au cours de l'induction de l'apoptose conduit à la phase d'exécution de l'apoptose qui se traduit par le clivage de nombreux substrats cellulaires essentiels à la survie des cellules. La caspase-3 reconnaît une séquence peptidique particulière (DEVD) sur ses substrats et clive les protéines après cette séquence. Nous avons étudié les variations de l'activité de la caspase-3 au moyen d'un peptide inhibiteur possédant la séquence DEVD mais ne pouvant être clivé. Ce peptide reste bloqué dans le site catalytique des caspases-3 actives et permet de quantifier l'activation de la caspase-3 en réponse aux traitements. Nous avons évalué de cette manière la quantité de caspase-3 active dans les cellules HEL après 12h, 24h et 48h de traitement à la diosgénine 40 μM .

Les résultats présentés figure RI-8 démontrent que la caspase-3 est activée après 12h de traitement. Cette activation atteint son maximum à 24h et reste stable à 48h. L'activation de la caspase-3 n'a pas été observée pour des temps plus courts.

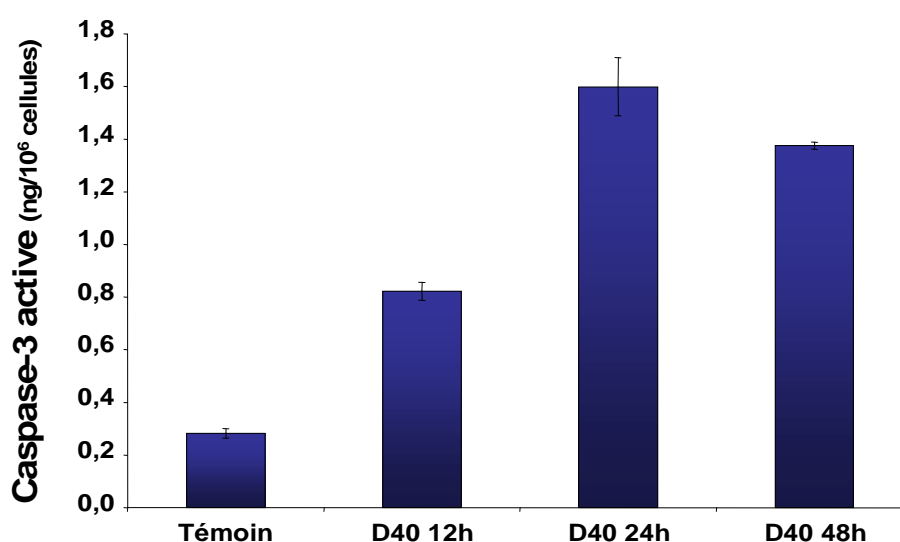


Figure RI-8 : Etude de l'activité de la caspase-3 après traitement des cellules à la diosgénine 40 μM . Les cellules HEL ont été traitées pendant 12h, 24h et 48h et mises en présence d'un inhibiteur protéique spécifique des caspases-3 actives permettant de quantifier la caspase-3 active dans les cellules.

3.5. Etude du clivage de la Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) dans les cellules HEL traitées à la diosgénine 40 μ M

La PARP est une enzyme de réparation de l'ADN qui est clivée par la caspase-3 au cours de l'exécution de l'apoptose. Le clivage de la PARP (112 kD) génère deux fragments dont un, de 85 kD, est observable en western blot. Le western blot présenté dans la figure RI-9 révèle l'apparition du fragment de 85 kD après 24h de traitement à la diosgénine 40 μ M. Ce clivage se poursuit après 48h de traitement (Figure RI-9). Le clivage de PARP observé ici corrèle avec l'activation de la caspase-3 décrite précédemment.



Figure RI-9 : Etude du clivage de la PARP après traitement des cellules HEL par 40 μ M de diosgénine. Le clivage de PARP se traduit par l'apparition d'un fragment de 85 kD après western blot.

3.6. Analyse de la fragmentation de l'ADN après traitement des cellules HEL à la diosgénine 40 μ M

La fragmentation de l'ADN est une des étapes finales de l'apoptose. Cette fragmentation de l'ADN est due à l'activation d'endonucléases par les caspases effectrices et notamment par la caspase-3. Ces endonucléases vont cliver l'ADN en fragments oligonucléosomiques d'environ 180-200 paires de bases. La génération de ces fragments oligonucléosomiques permet la quantification de l'apoptose par rapport au taux de ces fragments dans les cellules témoins.

Après traitement des cellules HEL à la diosgénine 40 μ M pendant 12h, 24h et 48h, la génération des fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA. Les résultats de ce test présenté figure RI-10 montrent une forte augmentation (de 2 à 3 fois plus) de la fragmentation de l'ADN des cellules traitées par rapport aux cellules témoins.

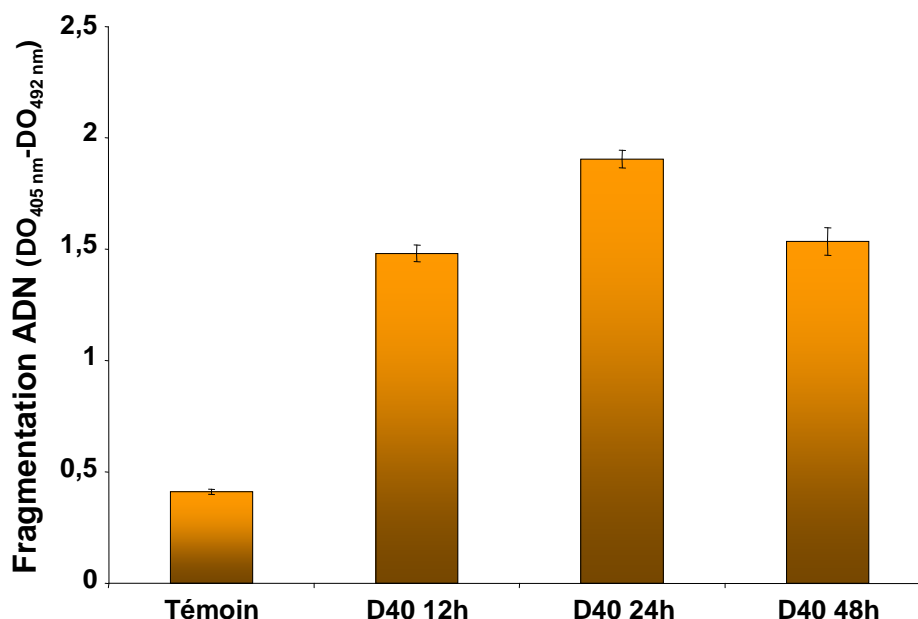


Figure RI-10 : Analyse de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HEL traitées par 40 μ M de diosgénine. La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA après traitement des cellules à la diosgénine.

La fragmentation de l'ADN débute après 12h de traitement et atteint son maximum à 24h (Figure RI-10). Cette cinétique est tout à fait semblable à celle de l'activation de la caspase-3 et proche de celle du clivage de la PARP. Nous n'avons pas détecté de fragmentation de l'ADN pour des temps de traitement plus courts.

Après avoir démontré que la diosgénine 40 μ M induisait l'apoptose dans les cellules HEL, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation cellulaire qui étaient activées ou inhibées après traitement.

4. Etude des voies de transduction du signal modulées après traitement par la dose apoptotique de diosgénine.

Les principales voies de transduction du signal au sein des cellules sont la voie des MAP kinases, la voie PI3 kinase/Akt, la voie JAK/STAT et la voie d'activation du facteur de transcription NFκB. De manière schématique, lors de la transduction du message induit par une substance chimique, on peut distinguer les voies JNK et p38 MAPK qui seraient plutôt impliquées dans la transduction du message apoptotique, et les voies de ERK, JAK/STAT, NFκB et PI3K/Akt qui sont généralement impliquées dans la survie cellulaire. Ainsi nous avons étudié l'implication de ces voies dans la transduction du message apoptotique induit par la diosgénine.

4.1. Activation des voies de JNK et p38

L'activation des voies JNK et p38 de transduction du signal est généralement observée dans les cellules leucémiques en réponse à des traitements chimiothérapeutiques. Nous avons donc cherché à étudier l'effet d'un traitement à la diosgénine 40 μM sur les voies JNK et p38 dans les cellules HEL.

Après traitement à la diosgénine 40 μM pendant 20 min, 6h, 12h, 24h et 48h, la quantité de formes phosphorylées, qui sont les formes actives, de JNK et p38 est évaluée par un test ELISA spécifique. Les résultats démontrent que la diosgénine induit une activation de JNK dès 6h de traitement et une forte activation de JNK à 12h de traitement (Figure RI-11A). Cette activation est transitoire et la quantité de phospho-JNK décroît après 12h (Figure RI-11A). De la même façon, la phosphorylation de p38 augmente à 6h puis de manière forte et transitoire à 12h de traitement avant de retourner à son niveau basal à 24h puis chute à 48h (Figure RI-11B). Le traitement au sorbitol pendant 30 min est un témoin positif d'activation des voies de JNK et p38 dans les cellules leucémiques.

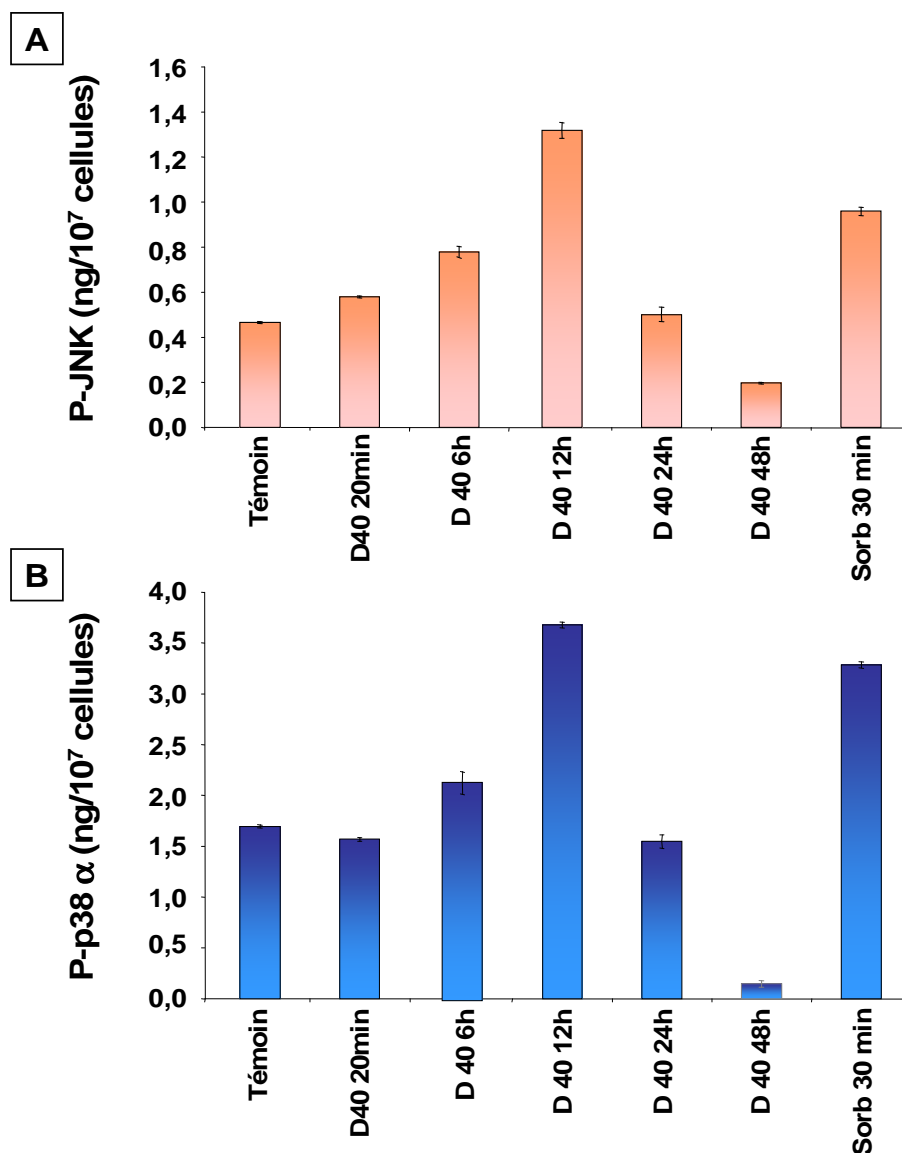


Figure RI-11 : Activation transitoire des voies de JNK et p38 après traitement à la diosgénine 40 µM. L'activation des voies de JNK et p38 est évaluée par quantification ELISA des formes phosphorylées actives de JNK (A) et p38 (B). Le sorbitol est un témoin positif d'activation de JNK et p38.

L'activation transitoire des voies de JNK et p38 est largement décrite au cours de la transduction du message apoptotique dans les cellules leucémiques. Le traitement à la diosgénine induit ce phénomène dans les lignées leucémiques suggérant l'activation d'un message apoptotique.

Nous nous sommes donc par la suite intéressés aux réponses des voies impliquées dans la survie cellulaire au traitement à la diosgénine 40 µM.

4.2. Inhibition des voies de Erk et PI3K/Akt

L'activation de la voie de ERK semble impliquée dans la leucémogénèse, dans la stimulation de la prolifération et dans la survie des cellules leucémiques. De plus, l'activation constitutive de la voie de ERK a été observée dans de nombreux cas de leucémies et l'inhibition de la voie de ERK est également impliquée dans l'induction de la mort des cellules leucémiques par différents agents chimiothérapeutiques.

D'autre part, la voie PI3K/Akt est quant à elle très largement décrite comme une voie impliquée dans la survie cellulaire, l'oncogénèse et la résistance aux agents chimiothérapeutiques. De nombreux inhibiteurs de la voie PI3K/Akt sont à l'étude dans le but de favoriser l'induction de l'apoptose dans les cellules leucémiques.

Après traitement à la diosgénine 40 μ M pendant 20 min, 6h, 12h, 24h et 48h, la phosphorylation de ERK est quantifiée par un test ELISA spécifique. Les résultats démontrent que la diosgénine induit une forte diminution de la phosphorylation de ERK dès 20 min de traitement (Figure RI-12A). Cette inhibition de la forme active de ERK se prolonge et s'accroît au cours du temps jusqu'à atteindre une inhibition complète de ERK après 48h de traitement (Figure RI-12A).

Le traitement au PMA pendant 30 min est un témoin positif d'activation de la voie de ERK dans les cellules leucémiques (Figure RI-12A).

De la même façon, par western blot, on observe une inhibition de la phosphorylation de Akt dès 12h de traitement et qui se poursuit jusqu'à 48h de traitement à la diosgénine 40 μ M (Figure RI-12B).

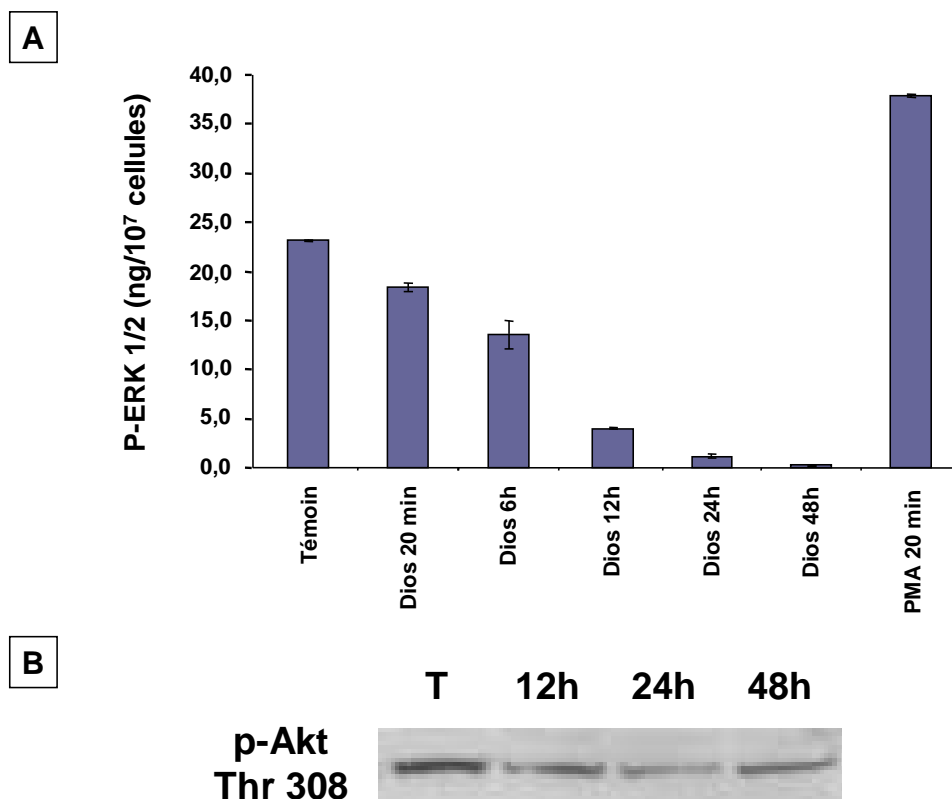


Figure RI-12 : Inhibition des voies de ERK et PI3K/Akt après traitement à la diosgénine 40 μ M. A : L'étude de la phosphorylation de ERK a été effectuée à l'aide d'un kit ELISA spécifique des formes phosphorylées de ERK. Le traitement au PMA est un témoin positif d'activation de la voie de ERK. B : Etude de la phosphorylation de Akt par western blot réalisé avec un anticorps dirigé contre la forme de Akt phosphorylée en thréonine 308.

Nous avons vu que la diosgénine à 40 μ M modulait l'activation des MAP kinases dans les cellules HEL en inhibant la voie de survie et de prolifération de ERK et en activant les voies pro-apoptotiques de JNK et p38. Le traitement à la diosgénine 40 μ M inhibe également l'activation de Akt. Nous nous sommes donc ensuite intéressés à l'activité du facteur de transcription NF κ B, qui est un autre facteur favorisant la survie cellulaire, en réponse au traitement par 40 μ M de diosgénine.

4.3. Inhibition de l'activation du facteur de transcription NF κ B

Le facteur de transcription NF κ B est activé de manière constitutive dans divers cancers et notamment dans les lymphomes et les leucémies. Il a été démontré que

NFκB intervient principalement dans l'oncogenèse en activant la transcription de facteurs impliqués dans la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. L'activation du facteur NFκB se fait par translocation dans le noyau et fixation à l'ADN. Cette activation intervient dans la régulation de la survie cellulaire.

L'activation du facteur NFκB est évaluée après traitement à la diosgénine 40 μM par des techniques de retard sur gel. Les cellules sont traitées à la diosgénine 40 μM pendant 12h, 24h et 48h, puis on réalise une extraction des protéines nucléaires. Ces protéines nucléaires sont incubées en présence d'une sonde marquée à la digoxigénine, et la fixation de NFκB sur cette sonde est évaluée par analyse de retard sur gel.

Les résultats présentés figure RI-13 démontrent que la diosgénine à 40 μM induit une inhibition de l'activation de NFκB dans les cellules HEL. Cette inhibition se produit en fin de traitement (légère inhibition à 24h et inhibition à 48h) suggérant que cette inhibition de NFκB se produit plutôt en tant que conséquence de l'induction de l'apoptose que comme cause de l'apoptose (Figure RI-13).

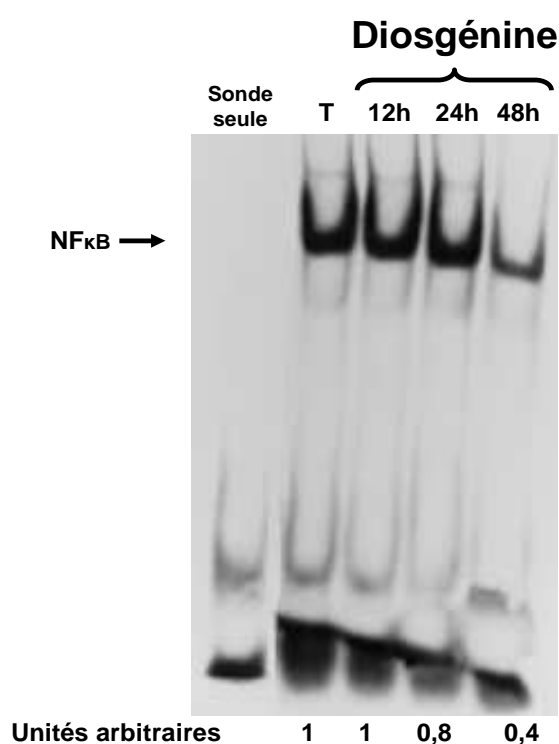


Figure RI-13 : Inhibition de l'activation de NFκB après traitement à la diosgénine 40 μM. Les cellules HEL sont incubées en présence de diosgénine 40 μM et après une extraction des protéines nucléaires, la présence de NFκB actif est évalué par retard sur gel après incubation en présence d'une sonde marquée à la digoxigénine.

5. Etude du métabolisme de l'acide arachidonique sous diosgénine 40 μM

L'étude du métabolisme de l'acide arachidonique a conduit au développement d'un nouveau secteur d'étude rattaché aux lipides bioactifs. L'acide arachidonique libéré des membranes cellulaires par la phospholipase A_2 cytosolique (cPLA₂) principalement, est à l'origine de la synthèse des prostanoïdes par la voie métabolique des cyclooxygénases. Ces médiateurs cellulaires ont été impliqués dans un nombre croissant de processus physiologiques mais aussi pathologiques tels que le cancer.

Des études précédentes concernant le traitement de cellules cancéreuses issues d'ostéosarcome humain avaient démontré que la diosgénine à 40 μM induisait une augmentation de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et de son activité métabolique. Nous nous sommes donc intéressés à la libération de l'acide arachidonique par la cPLA₂ et à son métabolisme par la cyclooxygénase-2 dans les cellules HEL traitées à la diosgénine 40 μM .

5.1. Activation de la cPLA₂ après traitement à la diosgénine 40 μM

L'activation de la cPLA₂ induit sa translocation du cytoplasme vers la membrane périnucléaire principalement où elle trouve son substrat. Nous avons donc étudié la localisation membranaire de la cPLA₂ après fractionnement sub-cellulaire des cellules traitées à la diosgénine 40 μM pendant 6h, 12h et 24h. La localisation de la cPLA₂ a été étudiée par western blot réalisé sur les extraits cytoplasmiques et membranaires obtenus à partir des cellules HEL traitées à la diosgénine. Les résultats présentés dans la figure RI-14 démontrent que le traitement à la diosgénine induit une augmentation de la présence de la cPLA₂ dans la fraction membranaire dès 6h et principalement après 12h de traitement.

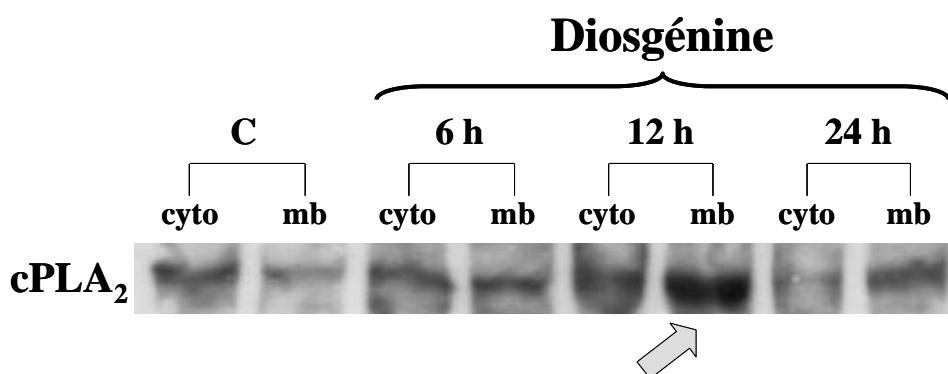


Figure RI-14 : Activation de la cPLA₂ après traitement à la diosgénine 40 μM. Après un fractionnement sub-cellulaire cytoplasme-membrane des cellules traitées, la présence de la cPLA₂ dans chacune des fractions est évaluée par western blot.

Cette augmentation de la cPLA₂ dans la fraction membranaire suggère une activation et une translocation de la cPLA₂ à la membrane. Nous nous sommes donc intéressés au métabolisme de l'acide arachidonique par la voie COX-2 après traitement à la diosgénine 40 μM.

5.2. Etude de l'expression et de l'activité de la cyclooxygénase-2 dans les cellules HEL traitées par 40 μM de diosgénine

COX-2 est une enzyme inductible de 72 kDa qui est rapidement mobilisée en réponse à des stimuli externes. Plusieurs facteurs incluant des cytokines et des agents proinflammatoires, des facteurs de croissance, le sérum, des oncogènes, des hormones et des promoteurs de tumeurs sont connus pour induire COX-2 et la synthèse de prostaglandines pro-inflammatoires dans différents types cellulaires. COX-2 catalyse la conversion de l'AA en prostanoïdes. Ces prostanoïdes incluent les prostaglandines PGD₂, PGE₂ et PGF₂α, les prostacyclines PGI₂, les thromboxanes TXA₂/TXB₂ et les cyclopentones PGA₂ et PGJ₂. Le principal métabolite résultant de l'activité de COX-2 est la PGE₂.

L'étude de l'expression de la COX-2 dans les cellules traitées par la diosgénine pendant 6h, 12h et 24h a été réalisée par western blot. La production de PGE₂ a été dosée aux mêmes temps par un test ELISA quantitatif à partir du surnageant de culture des cellules traitées à la diosgénine 40 μM.

Le traitement à la diosgénine 40 μM induit une augmentation de l'expression de COX-2 dès 6h de traitement (Figure RI-15A). Cette induction atteint son maximum après 24h de traitement (Figure RI-15A).

Le dosage de la PGE2 dans les cellules traitées à la diosgénine 40 μM pendant 24h révèle que la production de PGE2 est augmentée significativement (x1,8) après 24h de traitement (Figure RI-15B).

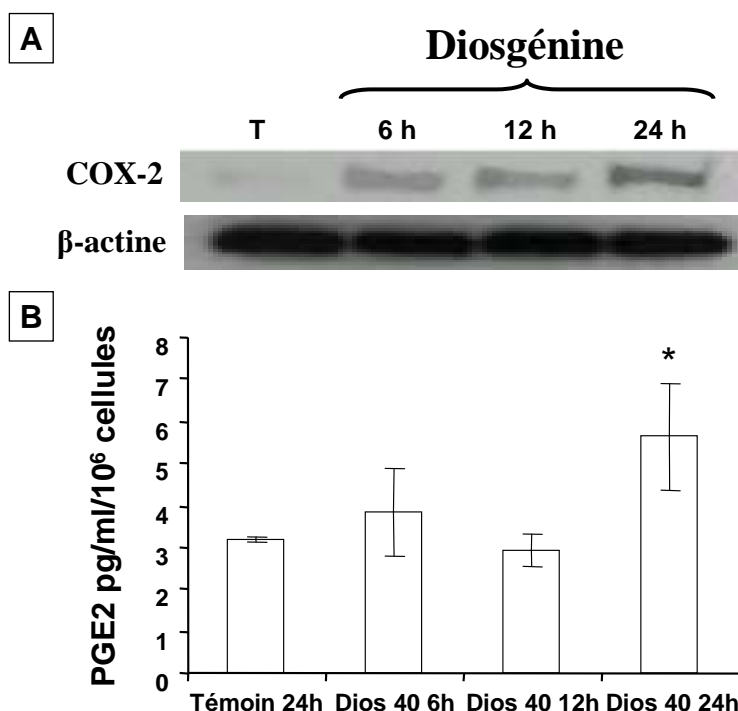


Figure RI-15 : Etude de l'expression et de l'activité de la COX-2 dans les cellules HEL traitées à la diosgénine 40 μM . Après traitement des cellules HEL à la diosgénine, les cellules sont récoltées et le surnageant est conservé. L'expression de COX-2 dans les cellules est analysée par western blot (A) et la PGE2 est dosée par un test ELISA dans le surnageant de culture.

Après avoir mis en évidence que la diosgénine 40 μM induisait l'apoptose des cellules HEL, nous avons suivi la cinétique du déroulement de l'apoptose au moyen d'une technique de séparation par couplage flux-force (Field Flow Fractionation, FFF). La technique de FFF par sédimentation (SdFFF) a récemment été adaptée à l'étude de population cellulaire et nous a permis de suivre l'évolution des cellules traitées à la diosgénine.

6. Suivi de l'induction de l'apoptose par SdFFF

L'utilisation du mode « hyperlayer » d'élution des cellules passées en SdFFF permet d'éviter les interactions entre les cellules éluées et la paroi du canal. Ceci permet de passer des cellules en SdFFF et de récolter des fractions composées de cellules viables, non contaminées par le milieu extérieur et pouvant être remises en culture. Ces conditions ont toujours été respectées dans les manipulations qui ont été effectuées bien que les cellules ne soient pas toujours destinées à être remises en culture.

Après traitement à la diosgénine 40 μM pendant 6h, 12h, 24h et 48h, les cellules HEL ont été injectées dans l'appareil de FFF, et le temps de rétention des cellules, c'est-à-dire schématiquement le temps mis pour atteindre le sommet du pic d'élution des cellules, est évalué.

Les fractogrammes obtenus montrent que le pic d'élution des cellules traitées par 40 μM de diosgénine est décalé vers la droite par rapport au pic témoin dès 6h de traitement, et que ce décalage s'accroît au cours du temps (Figure RI-16).

Le décalage du pic vers la droite indique une augmentation du temps de rétention des cellules. Cette augmentation du temps de rétention s'accroît donc au cours du temps, mais est visible dès 6h (Figure RI-16). A ce temps, aucune différence n'est visible microscopiquement ce qui souligne bien l'intérêt du suivi des processus apoptotiques par FFF.

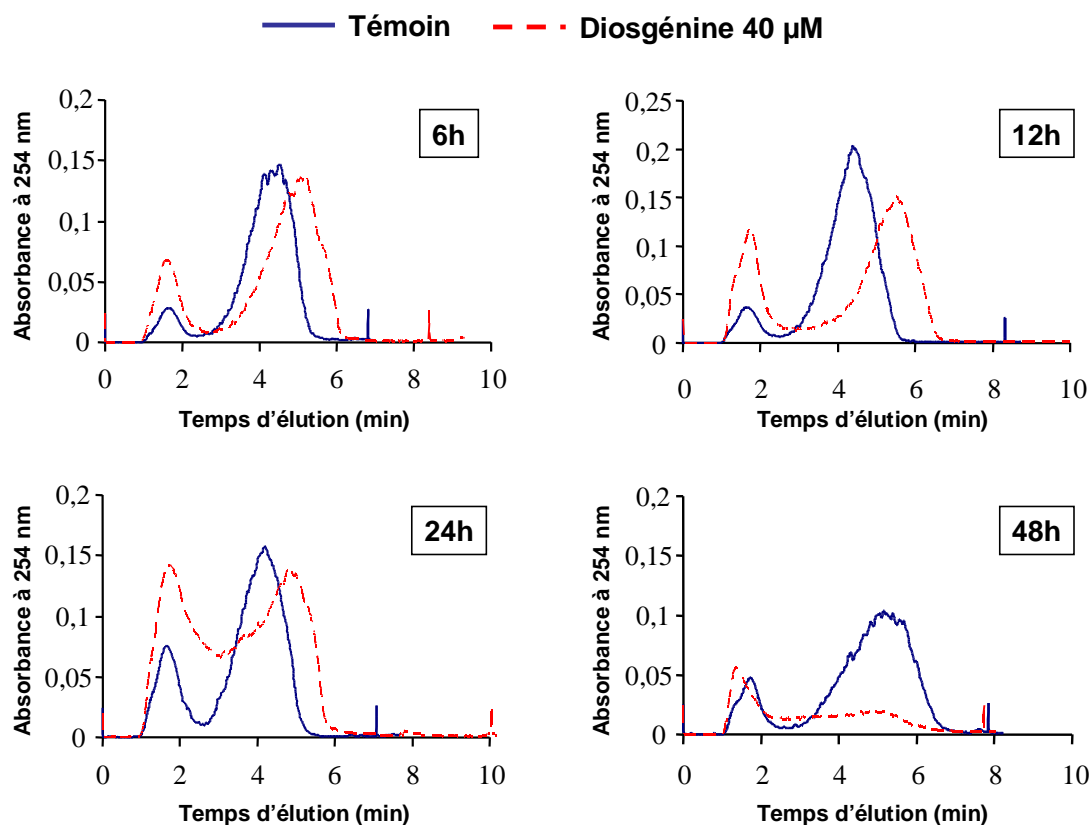


Figure RI-16 : Evolution des fractogrammes obtenus après passage en SdFFF des cellules traitées à la diosgénine 40 μ M. Les cellules traitées à la diosgénine 40 μ M sont injectées dans l'appareil de SdFFF selon les conditions suivantes : 100 μ l de suspension cellulaire (2×10^6 cellules/ml) ; débit de la phase mobile (PBS, pH=7,4) : 0,5 ml/min ; champ multigravitationnel de 40G et détection des cellules par spectrophotométrie à 254 nm.

Les conditions d'élutions des cellules en SdFFF étant dépendantes des propriétés physico-chimiques des cellules telles que la taille, la densité ou la forme, des variations du temps de rétention des cellules suggèrent une modification de ces paramètres.

Le suivi des modifications de ces paramètres par SdFFF pourrait ainsi permettre d'évaluer l'effet pro-apoptotique de certaines molécules avant de réaliser des tests biologiques plus spécifiques.

II- EFFETS PRO-DIFFÉRENCIANTS DE LA DIOSGÉNINE SUR LES CELLULES HEL

1. Prolifération cellulaire

1.1. Etude de la prolifération cellulaire par le test au MTT

Les cellules HEL sontensemencées à 10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération, les cellules sont traitées ou non (témoin) par 10 μ M de diosgénine. La prolifération des cellules traitées est alors suivie par le test au MTT pendant 72h et rapportée à la prolifération des cellules témoins qui est suivie de la même manière.

Les résultats montrent que la dose de 10 μ M induit une diminution de la prolifération des cellules HEL après 48h de traitement (Figure RII-1). Cette inhibition de la prolifération est encore plus marquée après 72h de traitement où l'on observe une inhibition d'environ 60% de la prolifération des cellules traitées à la diosgénine 10 μ M (Figure RII-1).

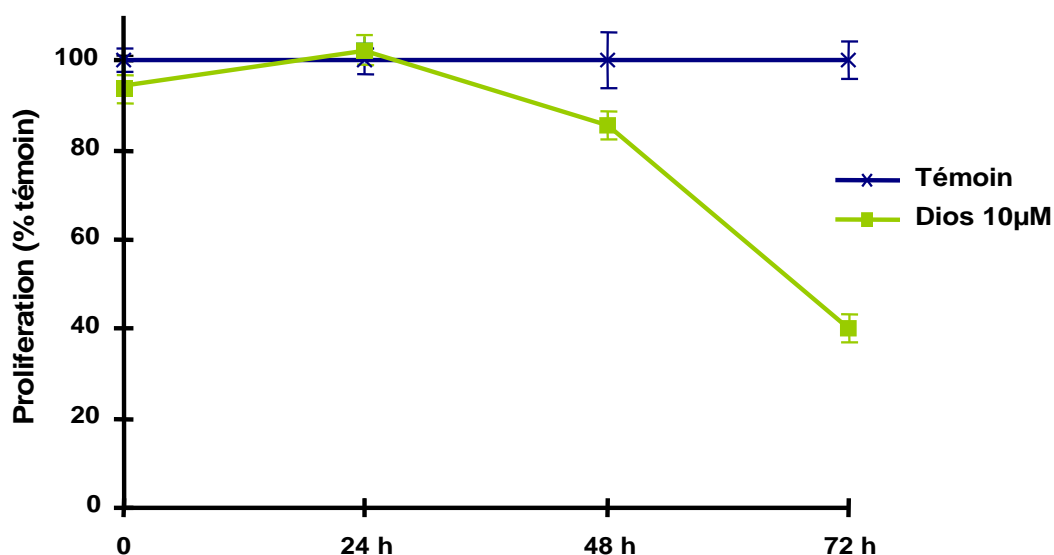


Figure RII-1 : Effets de la diosgénine 10 μ M sur la prolifération des cellules HEL.

1.2. Observation microscopique des cellules traitées par 10 μM de diosgénine pendant 48h

Les cellules HEL ont étéensemencées à la densité de 10^5 cellules/ml et ont proliféré pendant 24h avant d'être traitées à la diosgénine 10 μM pendant 48h.

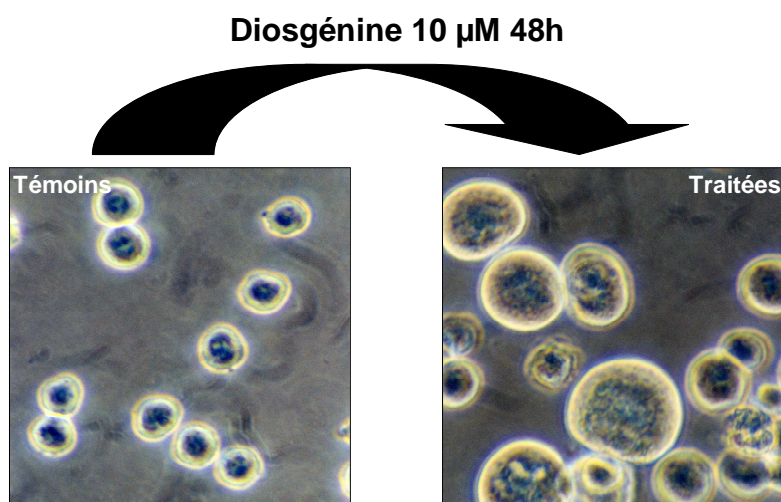


Figure RII-2 : Observation en microscopie optique des cellules HEL traitées à la diosgénine 10 μM pendant 48h (grossissement x 200).

Le traitement par la diosgénine 10 μM induit des modifications morphologiques des cellules se traduisant par une forte augmentation du volume de la cellule et par l'apparition d'un noyau de grande taille (Figure RII-2).

L'arrêt de la prolifération des cellules HEL après traitement à la diosgénine 10 μM pendant 48h à 72h semble être due à l'induction d'un phénomène de différenciation cellulaire. Cet effet ayant déjà été caractérisé comme une induction de différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL, nous avons étudié le phénomène de différenciation dans son ensemble au niveau de l'apparition de marqueurs de différenciation et au niveau de l'évolution des cellules différenciées en culture. Nous nous sommes ensuite attachés à décrire les voies de transduction du signal activées par la diosgénine à 10 μM au cours de la différenciation des cellules HEL.

2. Etude de la différenciation induite par la diosgénine à 10 μ M

2.1. Induction de la polyploïdisation des cellules HEL traitées par 10 μ M de diosgénine

Les cellules HEL ont étéensemencées à la densité de 10^5 cellules/ml de culture et après 24h de prolifération traitées à la diosgénine 10 μ M pendant 24h, 48h, 96h et 144h. Le contenu en ADN des cellules a été évalué par cytométrie en flux après fixation et marquage à l'iodure de propidium. Les résultats sont exprimés en pourcentages de cellules ayant un contenu en ADN de 2N, 4N, 8N, 16N, 32N ou 64N (Figure RII-3).

Les cellules témoins ont une ploïdie normale de 2N et 4N en fonction de leur position dans le cycle cellulaire. Les pourcentages de cellules à 2N chromosomes varient en fonction du temps entre 55% et 65% (Figure RII-3). Le pourcentage de cellules à 4N chromosomes varie quant à lui entre 30% et 45% (Figure RII-3). Il existe dans les cellules témoins une faible proportion de cellules polyploïdes, c'est-à-dire ayant un contenu en ADN supérieur à 4N chromosomes. Environ 2% des cellules sont à 8N chromosomes et un très faible pourcentage de cellules témoins présente une ploïdie encore supérieure (Figure RII-3).

Le traitement à la diosgénine 10 μ M induit une polyploïdisation des cellules HEL. En effet, dès 24h de traitement, on observe une légère augmentation de la proportion de cellules à 4N chromosomes (50% contre 45% dans les cellules témoins) mais on observe surtout une très forte augmentation de la proportion de cellules à 8N chromosomes (23% contre 2% dans les cellules témoins) (Figure RII-3). L'apparition de ces cellules polyploïdes se fait principalement au détriment des cellules diploïdes qui ne représentent alors que 25% de la population (contre 53% dans les témoins) (Figure RII-3). Après 24h de traitement, le pourcentage de cellules polyploïdes augmente progressivement au cours du temps. On voit alors augmenter la proportion de cellules ayant des contenus en ADN de 16N chromosomes à partir de 48h de traitement, de 32N chromosomes à partir de 96h de traitement et de 64N à 144h de traitement (Figure RII-3). La ploïdie observée dans les cellules HEL traitées à la diosgénine ne dépasse pas 64N chromosomes même au-delà de 144h de traitement. Il est à noter qu'à ce temps, plus de 55% des cellules sont polyploïdes (Figure RII-3).

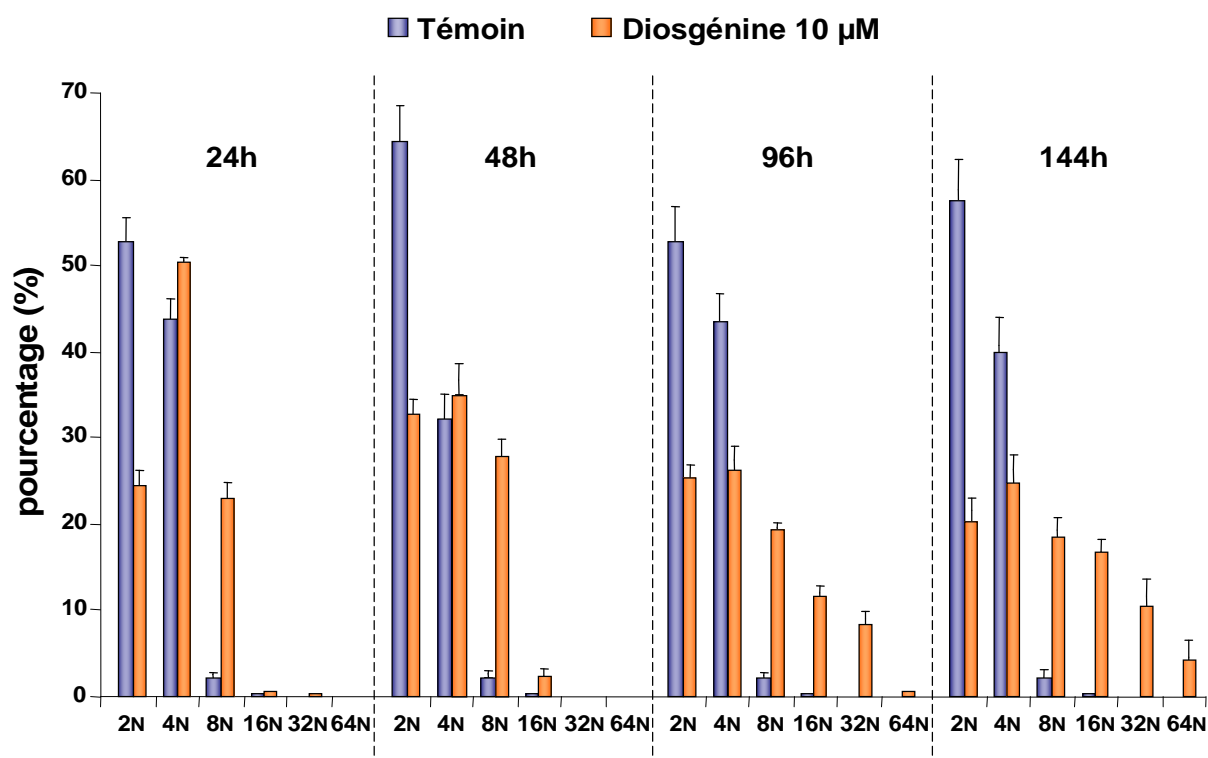


Figure RII-3 : Evolution de la ploïdie des cellules HEL traitées par 10 µM de diosgénine. Les cellules HEL sont traitées à la diosgénine puis fixées et marquées à l'iode de propidium. Le contenu en ADN des cellules est alors évalué par cytométrie en flux.

2.2. Etude de la réponse de régulateurs du cycle cellulaire au cours de la différenciation mégacaryocytaire induite par 10 µM de diosgénine

Nous avons vu que la diosgénine à 10 µM induisait une polyploïdisation des cellules HEL. La polyploïdisation des cellules est la conséquence d'un phénomène physiologique particulier appelé endomitose. La régulation exacte du processus d'endomitose n'est pas encore complètement élucidé toutefois il semble que l'intervention de régulateurs du cycle cellulaire tels que la protéine p21 et les cyclines de type D, D3 et D1, soit essentielle.

Nous avons donc étudié l'expression de p21 et des cyclines D3 et D1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire induite par 10 µM de diosgénine.

Les cellules HEL ont été traitées à la diosgénine 10 μ M pendant 24h, 48h, 96h et 144h et l'expression de p21 et des cyclines D3 et D1 a été évaluée par western blot.

Les résultats montrent que la diosgénine induit une augmentation de l'expression de la protéine p21 après 24h de traitement. Cette augmentation est maintenue à 48h puis l'expression de p21 diminue en fin de traitement (Figure RII-4A).

De la même manière, l'expression de la cycline D3, connue pour intervenir dans les processus endomitotiques, est augmentée à 24h et 48h de traitement puis retrouve un niveau basal d'expression à partir de 96h d'exposition à la diosgénine 10 μ M (Figure RII-4B).

L'expression de la cycline D1 augmente quant à elle plutôt en fin de traitement, à partir de 48h d'exposition à la diosgénine 10 μ M (Figure RII-4C).

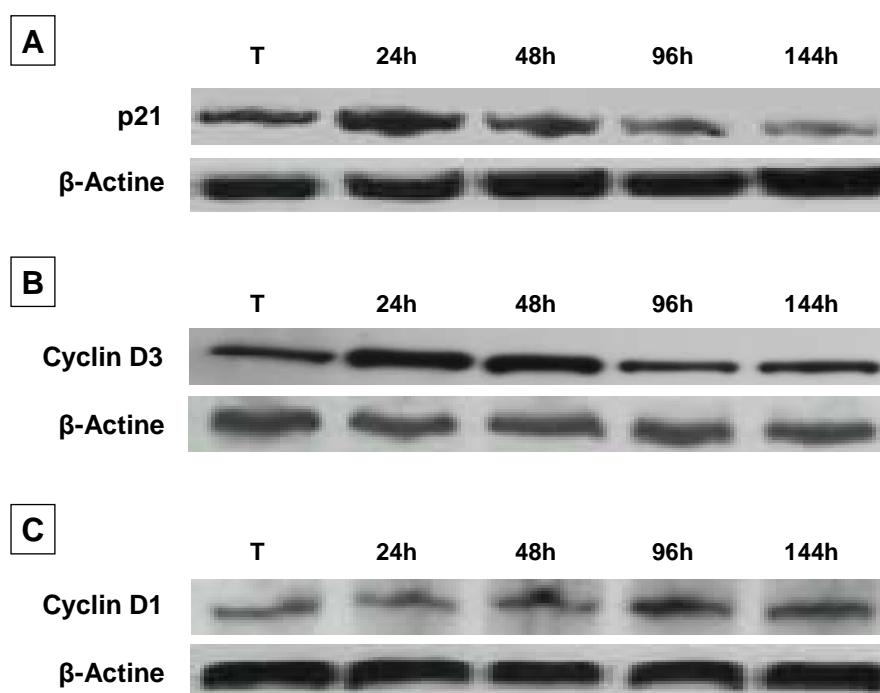


Figure RII-4 : Etude de l'expression de régulateurs du cycle cellulaire au cours de la polypléidisation induite par la diosgénine 10 μ M. Les cellules HEL sont traitées ou non (témoin : T) par 10 μ M de diosgénine pendant 24h, 48h, 96h et 144h. L'expression des protéines p21, cycline D3 et cycline D1, est suivie par western blot.

Nous avons vu que la diosgénine induisait la polypléidisation des cellules HEL. Nous avons ensuite voulu évaluer l'expression des marqueurs membranaires de différenciation mégacaryocytaire après traitement à la diosgénine 10 μ M.

2.3. Etude de l'expression de marqueurs de différenciation mégacaryocytaire à la surface des cellules HEL traitées à la diosgénine 10 μ M

Les cellules HEL présentent à leur surface des marqueurs de différenciation des lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire. Les cellules HEL expriment en effet la glycophorine A, un marqueur de la lignée rouge, et des marqueurs mégacaryocytaires tels que les marqueurs CD41 et CD61, CD62, et les glycoprotéines V (GpV) et IX (GpIX). Nous avons donc étudié les variations d'expression membranaire de la glycophorine A et du CD41 d'une part et les variations de la transcription des gènes des marqueurs mégacaryocytaires CD41, CD61, CD62, GpV et GpIX d'autre part.

Les cellules HEL ont été traitées à la diosgénine 10 μ M pendant 24h, 48h, 96h et 144h. L'expression membranaire de la glycophorine A et du CD41 a été étudiée après marquage des cellules avec des anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes et passage en cytométrie en flux.

Les résultats présentés figure RII-5 montrent que l'expression membranaire du CD41 augmente progressivement au cours du temps. D'autre part l'expression du marqueur érythroïde, la glycophorine A, diminue rapidement au début du traitement avant de se stabiliser à un niveau deux fois moins important que dans les cellules témoins (Figure RII-5).

Nous avons ensuite évalué la transcription de gènes codant des marqueurs de différenciation mégacaryocytaire tels que le CD41, le CD61, le CD62, la GpV et la GpIX. Les cellules HEL ont été traitées à la diosgénine 10 μ M pendant 24h, 48h, 96h, 144h et 192h. La quantité d'ARNm des différents marqueurs de différenciation a été évaluée par la technique de TLDA puis rapportée à l'expression de ces marqueurs dans les cellules témoins. Les résultats montrent que la diosgénine 10 μ M induit une augmentation globale et progressive de tous les marqueurs mégacaryocytaires par rapport aux cellules témoins (Tableau RII-1). Le marqueur GpV, qui est un marqueur tardif de différenciation mégacaryocytaire, est celui dont l'expression est la plus fortement augmentée (x4,95 à 96h, x6,33 à 144h et x8,57 à 192h ; Tableau RII-1).

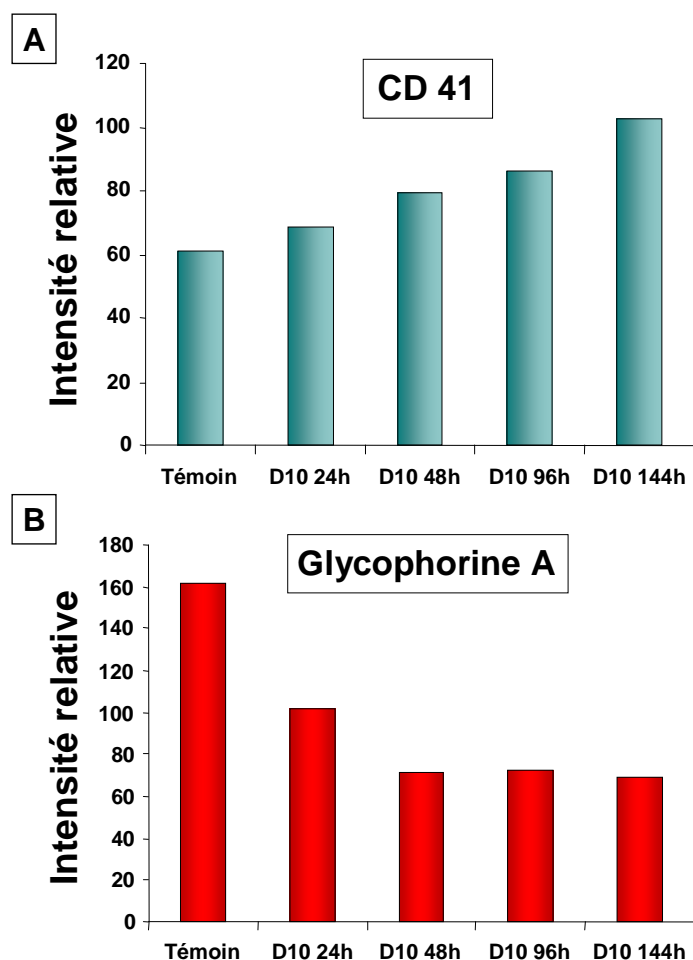


Figure RII-5 : Expression membranaire du CD41 et de la glycophorine A au cours de la différenciation induite par 10 µM de diosgénine.

Marqueurs de différenciation mégacaryocytaire	Ratio essai/témoin				
	D10 24h/ T48h	D10 48h/ T48h	D10 96h/ T48h	D10 144h/ T48h	D10 192h/ T48h
CD41	1,05	1,16	1,51	1,72	2,17
CD61	-1,25	1,18	2,09	3,02	3,48
CD62	1,35	1,47	1,73	2,1	3,2
GpV	2,73	2,11	4,95	6,33	8,57
GpIX	-2,21	1	2,18	3,42	2,03

Tableau RII-1 : Evaluation de l'expression de différents marqueurs mégacaryocytaires après traitement des cellules HEL à la diosgénine 10 µM.

L'expression de ces marqueurs a été évaluée par TLDA après extraction et rétrotranscription des ARN de cellules HEL traitées à la diosgénine 10 µM.

2.4. Evolution des cellules différenciées par la diosgénine

Nous avons vu que 10 μM de diosgénine induisait une différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL. Cette différenciation est caractérisée par une polyploïdisation importante et progressive. Le traitement à la diosgénine réduit l'expression du marqueur de la lignée érythrocytaire à la surface des cellules HEL et augmente l'expression de marqueurs de la lignée mégacaryocytaire.

Les cellules HEL traitées à la diosgénine subissent également une forte augmentation du volume cellulaire. En fin de traitement, les cellules HEL différenciées se fragmentent progressivement en libérant de petites particules.

Etant donnée que la diosgénine induit une différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL, nous avons voulu vérifier si les particules libérées en fin de traitement pouvaient être des plaquettes fonctionnelles.

Les cellules HEL traitées à la diosgénine 10 μM pendant 48h, 96h et 192h, ont été récoltées dans le milieu de culture et projetées sur une lame de verre par cytopspin. Les cellules sont ensuite colorées au May-Grunwald-Giemsa (Figure RII-6).

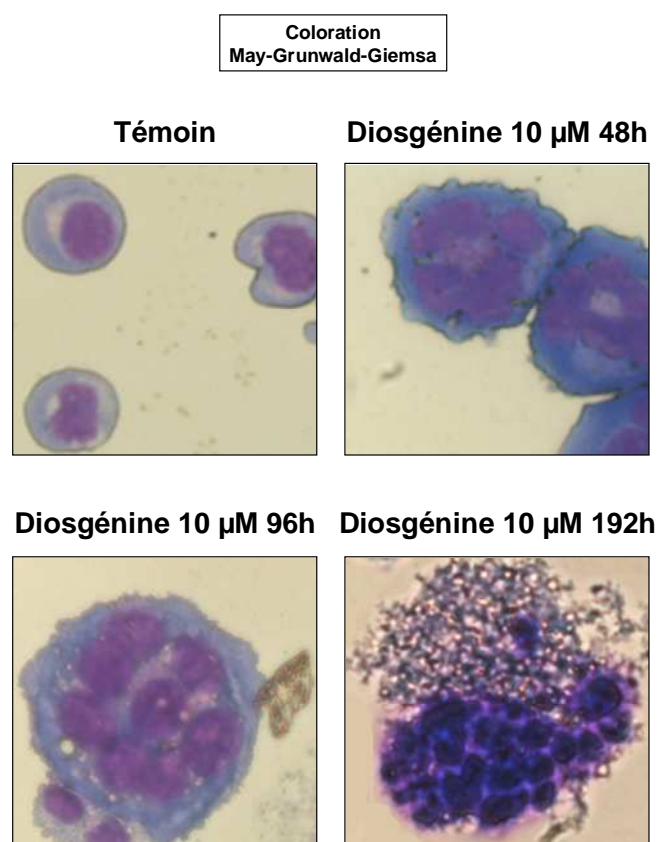


Figure RII-6 : Evolution morphologiques des cellules HEL induites par 10 μM de diosgénine. Les cellules HEL ont été colorées au May-Grunwald-Giemsa après avoir été projetées sur lame de verre par cytopspin (grossissement x200).

Les micrographies présentées figure RII-6 permettent d'observer d'une part la polyploïdisation des cellules et d'autre part la fragmentation des cellules après 192h de culture.

La polyploïdisation est visible après coloration au May-Grunwald-Giemsa qui colore le noyau en rose. Dès 48h on observe une forte augmentation du volume du noyau qui devient également polylobé. A 96h de traitement, le noyau est très fortement polylobé.

Après 192h de traitement, on observe une fragmentation de la cellule. La cellule ressemble alors beaucoup au mégacaryocyte mature libérant des plaquettes.

Afin de vérifier si la fragmentation des cellules HEL traitées à la diosgénine conduisait à la libération de plaquettes, nous avons recueilli ces fragments cellulaires dans le milieu de culture. Une partie de ces fragments a été testée vis-à-vis de leur capacité d'agrégation sous stimulation à l'ADP exogène, et une autre partie a été préparée en vue d'une analyse par microscopie électronique.

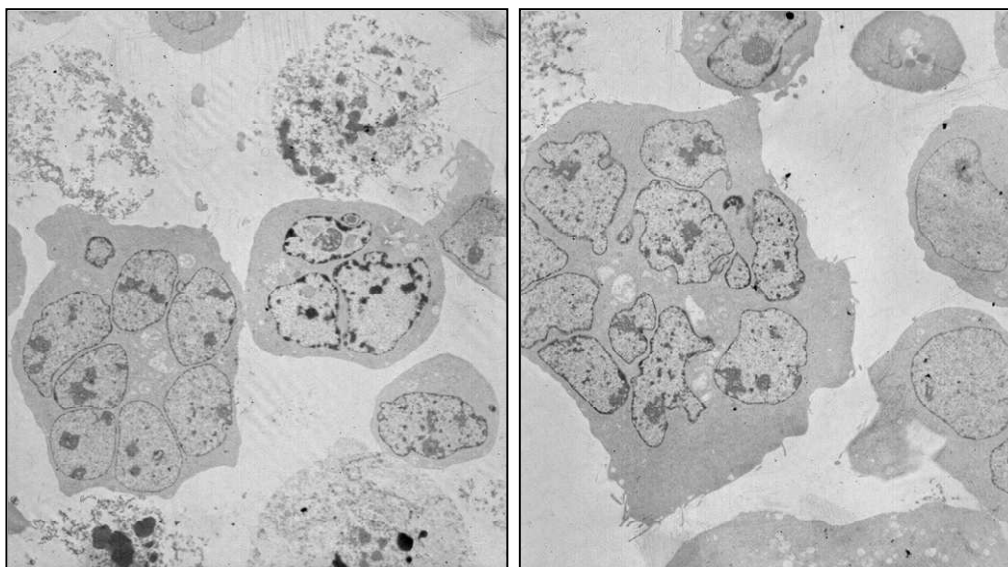
De ces tests, il est ressorti que ces fragments n'étaient pas capables de s'agréger sous ADP.

D'autre part, l'analyse en microscopie électronique a démontré que bien que ces fragments présentaient les caractéristiques morphologiques de plaquettes, ils ne possédaient pas de granules de sécrétion qui sont caractéristiques des plaquettes fonctionnelles (Figure RII-7).

Sur les vues générales prises en microscopie électronique, on distingue à nouveau un très gros noyau polylobé qui confirme l'induction d'une forte polyploïdisation dans les cellules HEL traitées à la diosgénine 10 μ M (Figure RII-7).

Les images prises des fragments libérés par les cellules différenciées à la diosgénine montrent que ces fragments sont de taille et de structure comparable à des plaquettes (Figure RII-7). Toutefois, le contenu de ces fragments se révèle assez pauvre, et même si l'on retrouve des vacuoles et des mitochondries présentes dans les plaquettes, on ne trouve pas de granules de sécrétion ou de grains de glycogènes dans ces fragments. Ce ne sont donc pas des plaquettes fonctionnelles mais plutôt des « pseudo-plaquettes » (Figure RII-7).

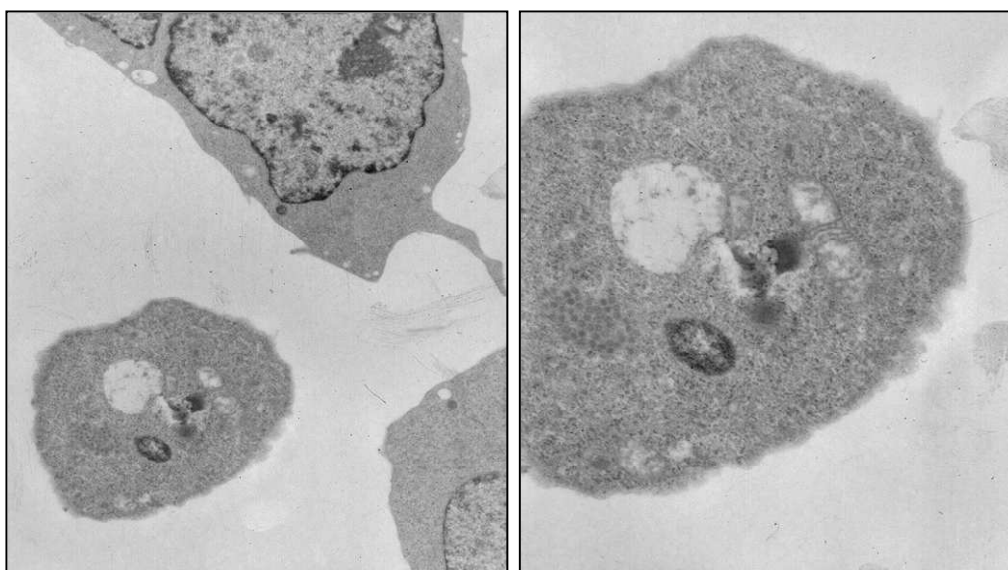
**Vues générales des cellules HEL différenciées
par la diosgénine 10 μ M**



grossissement x1500

grossissement x2000

**Vues d'une pseudo-plaquette issue de cellules
HEL différenciées à la diosgénine 10 μ M**



grossissement x10000

grossissement x22000

Figure RII-7 : Vues en microscopie électronique de cellules HEL différenciées à la diosgénine 10 μ M et des fragments libérés par ces cellules dans le milieu de culture. Les cellules HEL ont été traitées à la diosgénine 10 μ M pendant 192h puis les cellules et le milieu de culture ont été récupérés et préparés en vue d'une analyse en microscopie électronique.

2.5. Rôle des facteurs apoptotiques lors de la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine.

Il a récemment été démontré que la fragmentation des mégacaryocytes matures afin de libérer les plaquettes nécessitait l'activation de facteurs intervenant au cours de l'apoptose. Le facteur apoptotique principal nécessaire à la production des plaquettes a été identifié comme étant l'activation de la caspase-3. De plus, il a également été montré que les mégacaryocytes sénescents mourraient de manière physiologique par apoptose. De plus, dans les mégacaryocytes sénescents, le facteur anti-apoptotique Bcl-xL est absent, alors qu'il est exprimé dans les mégacaryocytes en cours de maturation.

Nous avons donc étudié l'apparition d'événements apoptotiques tels que l'activation de la caspase-3, le clivage de PARP et la diminution de l'expression de Bcl-xL au cours de la différenciation induite par la diosgénine.

Les cellules HEL ont été traitées à la diosgénine 10 μ M pendant 12h, 24h, 48h, 96h, 144h et 192h.

L'activité de la caspase-3 a été évaluée à l'aide d'un kit ELISA quantitatif spécifique de la caspase-3 active. Les résultats montrent une activation en deux temps de la caspase-3. Tout d'abord, une activation brusque et de forte amplitude de la caspase-3 après 48h de traitement (Figure RII-8A). Puis après un retour à des valeurs plus proches du taux basal d'activation à 96h, la quantité de caspase-3 active augmente progressivement jusqu'en fin de traitement où elle atteint à nouveau des valeurs fortes (Figure RII-8A).

Le clivage de la PARP suit quant à lui rigoureusement la même cinétique. En effet sur les résultats de western blot, on voit apparaître le fragment clivé de PARP (85 kD) dès 48h de traitement (Figure RII-8B). Par la suite, l'intensité de la bande correspondant au fragment clivé diminue à 96h avant d'augmenter à nouveau en fin de traitement (Figure RII-8B).

En ce qui concerne le facteur anti-apoptotique Bcl-xL, son expression décroît régulièrement tout au long du traitement à la diosgénine 10 μ M (Figure RII-8C).

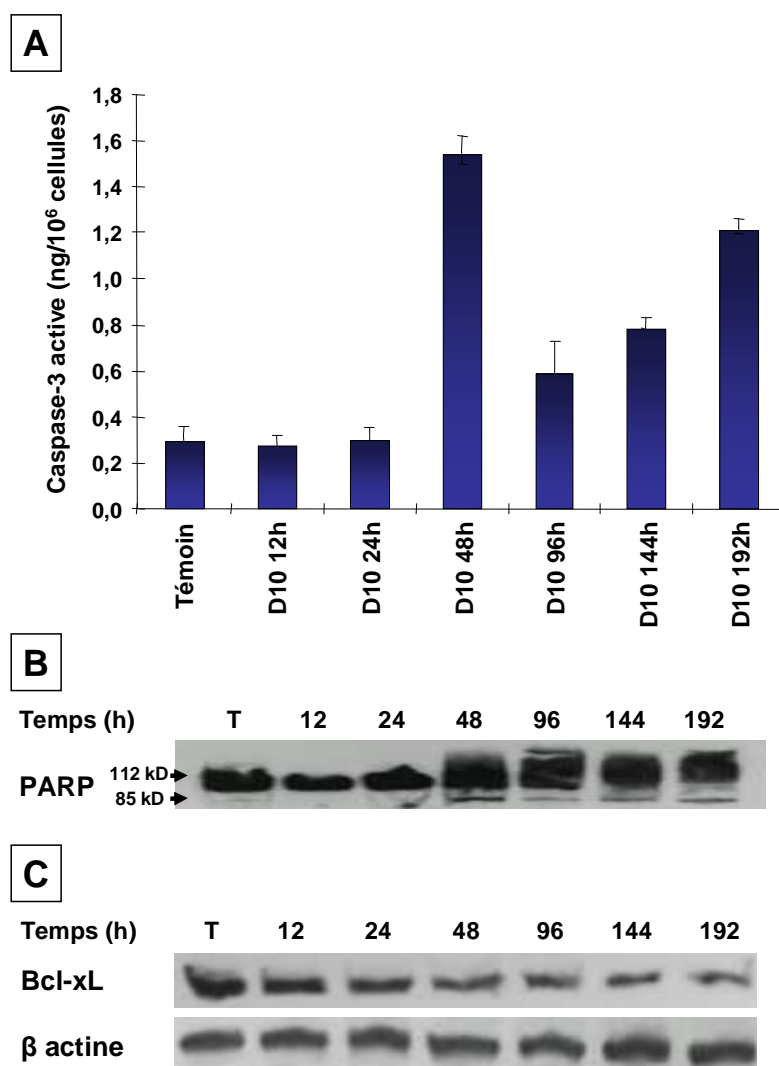


Figure RII-8 : Activation de la caspase-3, clivage de PARP et inhibition de Bcl-xL après traitement à la diosgénine 10 μ M. Les cellules HEL ont été traitées à la diosgénine 10 μ M et l'activité de la caspase-3 a été évaluée par un kit ELISA quantitatif. Le clivage de PARP et l'expression de Bcl-xL ont été évalués par western blot.

Nous avons donc démontré que la diosgénine à 10 μ M induisait la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL. Les cellules différenciées évoluent jusqu'à la fragmentation et à la libération de pseudo-plaquettes en fin de traitement. Cette fragmentation met en jeu l'activation de la caspase-3.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux voies de transduction du signal activées ou inhibées dans les cellules HEL après traitement avec la dose différenciante de 10 μ M de diosgénine.

3. Etude des voies de transduction du signal modulées après traitement par la dose différenciante de diosgénine.

Au cours de la différenciation en mégacaryocytes des progéniteurs médullaires, ou au cours de la différenciation mégacaryocytaire de cellules leucémiques, il a été démontré que la voie de ERK jouait un rôle crucial. L'activation des voies p38 et/ou JNK oriente quant à elle les progéniteurs médullaires ou les cellules leucémiques vers une différenciation érythrocytaire.

3.1. Activation de la voie de ERK et rôle dans la polypléidisation des cellules HEL traitées par 10 μ M de diosgénine

Après traitement à la diosgénine 10 μ M pendant 5 min, 20 min, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 96h, 144h et 192h, la phosphorylation de ERK est quantifiée par un test ELISA spécifique. Les résultats démontrent que la diosgénine induit une forte activation de la voie de ERK dès 5 min de traitement (Figure RII-9A). Cette activation se prolonge pendant 12h puis le taux de phosphorylation de ERK diminue progressivement jusqu'à 48h de traitement où l'on retrouve un taux basal de ERK phosphorylée (Figure RII-9A). En fin de traitement, après 144h et 192h d'exposition à la diosgénine 10 μ M, la phosphorylation de ERK augmente à nouveau (Figure RII-9A).

Lorsqu'il est utilisé en prétraitement 2h avant le traitement à la diosgénine, le U0126, un inhibiteur de MEK, inhibe la phosphorylation de ERK (Figure RII-9A).

Afin d'étudier le rôle de l'activation de ERK au cours de la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine 10 μ M, nous avons utilisé le U0126 en prétraitement avant le traitement à la diosgénine, et nous avons étudié l'effet de cette inhibition sur la polypléidisation des cellules HEL.

Les résultats démontrent que l'inhibition de l'activation de ERK réduit de manière très importante la polypléidisation des cellules HEL traitées à la diosgénine (Figure RII-9B). En effet, le prétraitement au U0126 empêche l'apparition de population ayant une ploïdie supérieure à 8N chromosomes à 48h et 96h de traitement, et réduit très fortement l'augmentation du nombre de cellules à 8N chromosomes (Figure RII-9B). Dans tous les cas, la ploïdie des populations prétraitées au U0126 reste proche de celle des populations témoins (Figure RII-9B).

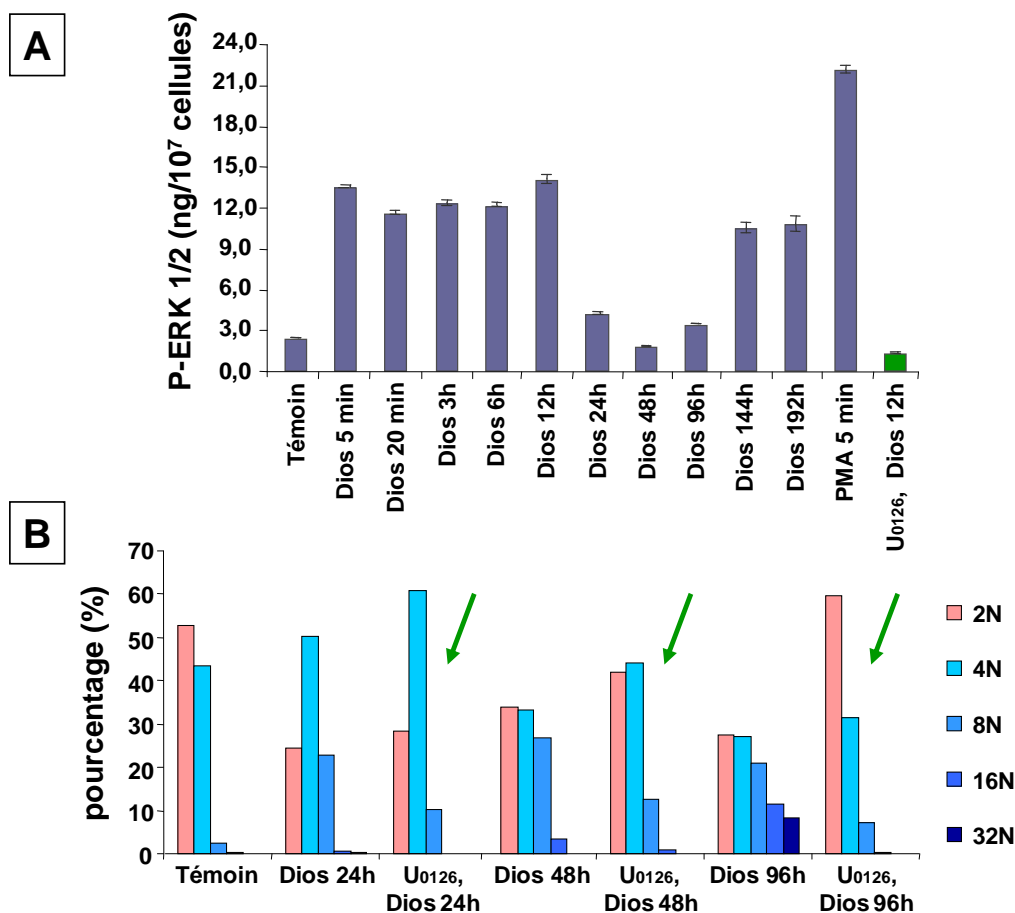


Figure RII-9 : Activation de ERK au cours de la différenciation induite par la diosgénine 10 µM. Rôle dans la polyploïdisation des cellules. A : Les cellules HEL sont traitées à la diosgénine 10 µM et l'activation de ERK est évaluée par un kit ELISA quantitatif. Le traitement au PMA est un témoin positif d'activation de la voie de ERK. B : Les cellules HEL sont prétraitées ou non au U0126 10 µM pendant 2h avant d'être traitées à la diosgénine. Le contenu en ADN des cellules est évalué par cytométrie en flux après marquage des cellules à l'iodure de propidium.

3.2. Inhibition des voies p38 et JNK

Après traitement à la diosgénine 10 µM pendant 5 min, 20 min, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 96h, 144h et 192h, le niveau de phosphorylation de p38 et JNK est quantifié par des tests ELISA spécifiques. Les résultats démontrent que la diosgénine inhibe fortement l'activation de la voie de p38 et réduit l'activation de JNK (Figure RII-10).

En ce qui concerne p38, la quantité de formes phosphorylées actives est fortement diminuée dès 5 min de traitement à la diosgénine 10 µM (Figure RII-10A). La quantité de phospho-p38 est alors environ trois fois moins importante dans les cellules traitées que dans les témoins (Figure RII-10A). Cette inhibition de p38 reste

ensuite de même amplitude pendant toute la durée du traitement à la diosgénine 10 μM (Figure RII-10A).

Le traitement à la diosgénine 10 μM réduit également de manière transitoire la phosphorylation de JNK (Figure RII-10B). L'exposition à la diosgénine réduit la quantité de formes phosphorylées de JNK dès 5 min. Cette réduction est significative mais de faible intensité (réduction d'un facteur 1,4) et dure pendant les six premières heures de traitement (Figure RII-10B). A 12h de traitement et jusqu'à 48h, le taux de phosphorylation de JNK retrouve sa valeur basale (Figure RII-10B). Enfin, à partir de 96h et jusqu'en fin de traitement, le taux de JNK est encore significativement réduit (Figure RII-10B).

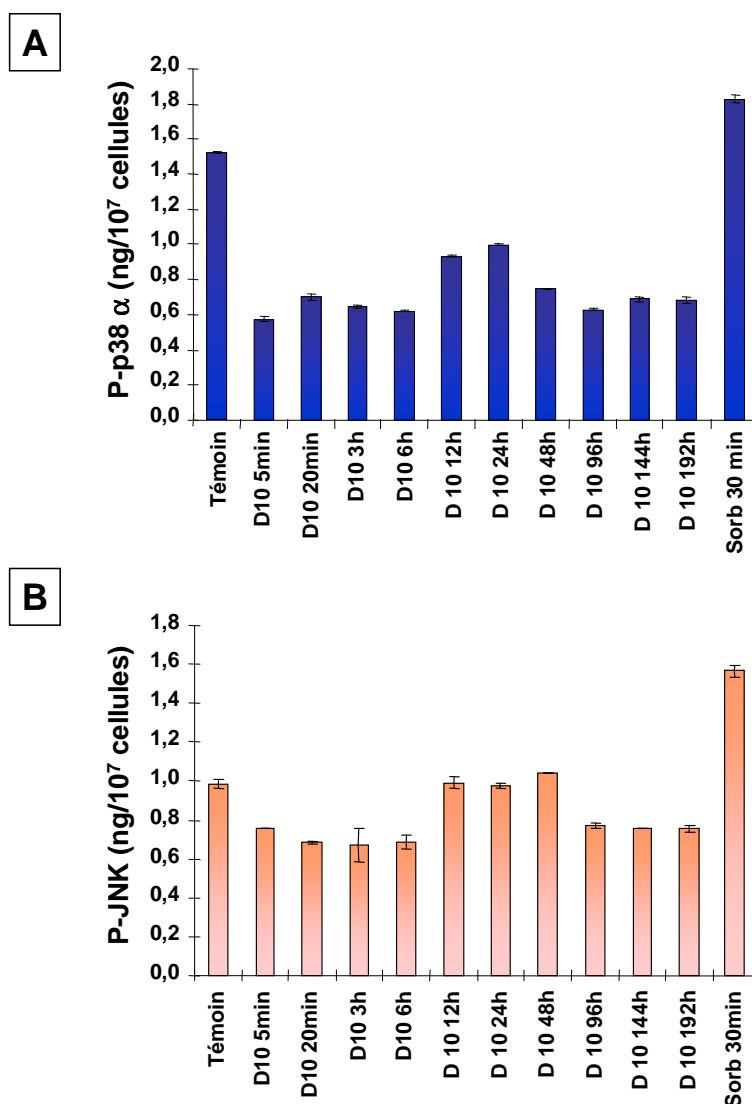


Figure RII-10 : Inhibition des voies de p38 et JNK après traitement à la diosgénine 10 μM . L'étude de la phosphorylation de p38 et de JNK a été effectuée à l'aide de kits ELISA spécifiques des formes phosphorylées de p38 et JNK. Le traitement au sorbitol est un témoin positif d'activation des voies p38 et JNK.

3.3. Inhibition de la voie PI3K/Akt et de l'activation du facteur de transcription NFκB

L'activation de la voie PI3K/Akt et celle du facteur NFκB a été impliquée dans les premières étapes de la différenciation mégacaryocytaire. Par ailleurs, l'inhibition de ces facteurs de survie contribue généralement à la mort cellulaire. Nous avons donc étudié la réponse de ces voies au cours de la différenciation mégacaryocytaire induite par 10 μM de diosgénine.

Les cellules HEL sont traitées à la diosgénine 10 μM pendant 6h, 12h, 24h, 48h, 96h, 144h et 192h, et l'activation de la voie PI3K/Akt a été évaluée par western blot de la forme phosphorylée, qui est la forme active de Akt (Figure RII-11A).

Les résultats montrent une augmentation de la phosphorylation de Akt à partir de 6h de traitement et jusqu'à 48h après exposition à la diosgénine 10 μM. Par la suite, la phosphorylation de Akt diminue en fin de traitement et l'intensité de la bande correspondant à la forme phosphorylée de Akt est même inférieure à celle du témoin à 192h (Figure RII-11A).

Concernant le facteur de transcription NFκB, son activation est évaluée après traitement à la diosgénine 10 μM par des techniques de retard sur gel. Les cellules sont traitées à la diosgénine 10 μM pendant 24h, 48h, 96h, 144h et 192h, puis on réalise une extraction des protéines nucléaires. Ces protéines nucléaires sont incubées en présence d'une sonde marquée à la digoxigénine, et la fixation de NFκB sur cette sonde est évaluée par analyse de retard sur gel.

Les résultats présentés figure RII-11B démontrent que la diosgénine à 10 μM induit une légère augmentation de l'activité de NFκB après 24h de traitement. A partir de 96h, le traitement à la diosgénine réduit progressivement l'activation de NFκB jusqu'à une complète inhibition à 192h de traitement (Figure RII-11B).

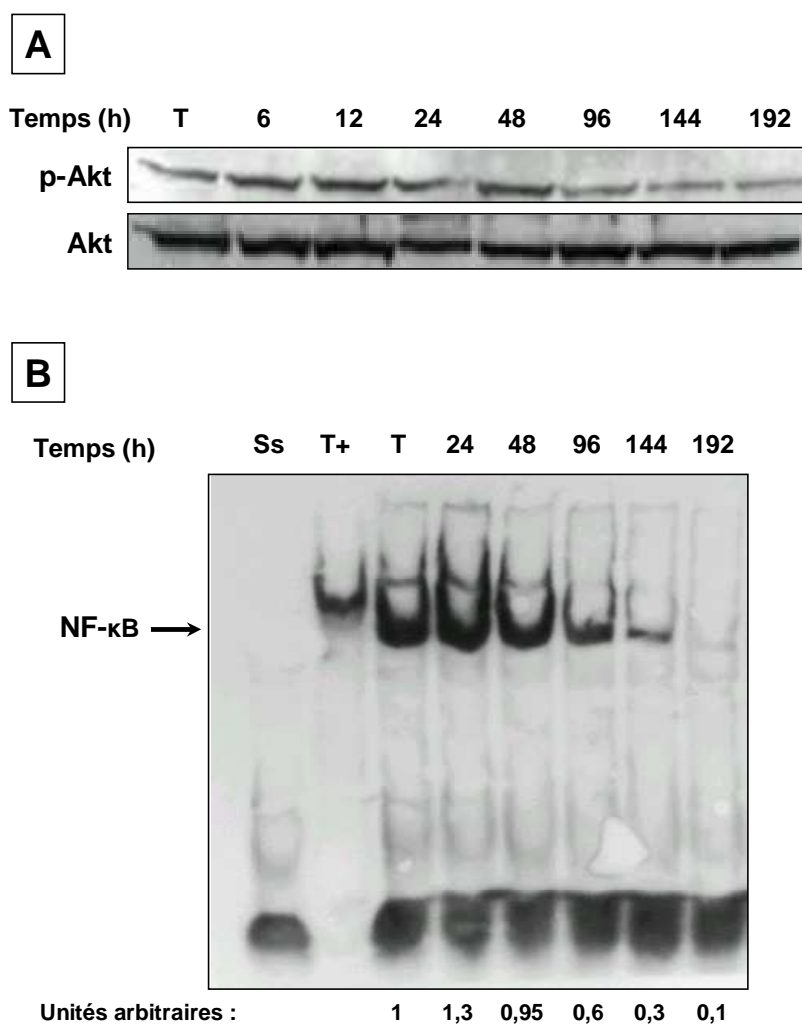


Figure RII-11 : Evolution des facteurs de survie Akt et NF κ B après traitement à la diosgénine 10 μ M. A : Etude de la phosphorylation de Akt par western blot réalisé avec un anticorps dirigé contre la forme de Akt phosphorylée en thréonine 308. B : Les cellules HEL sont incubées en présence de diosgénine 10 μ M et après une extraction des protéines nucléaires, la présence de NF κ B actif est évalué par retard sur gel après incubation en présence d'une sonde marquée à la digoxigénine.

4. Contribution de la SdFFF à l'étude de la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL

Nous avons vu que la SdFFF permettait de suivre les modifications morphologiques de cellules en réponse à un traitement chimique. Nous avons

également vu que la diosgénine à 10 μM induisait la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL. Cette différenciation s'accompagne d'une forte augmentation du volume des cellules. Il nous est alors apparu intéressant de suivre cette différenciation par SdFFF. De plus nous avons également étendu cette étude au tri des différentes populations de cellules plus ou moins différenciées qui sont en mélange après traitement à la diosgénine 10 μM . Enfin, au moyen de la SdFFF, nous avons étudié les effets d'un retrait de la diosgénine après 24h de traitement (« wash out » à 24h) sur la différenciation des cellules HEL.

4.1. Suivi de la différenciation des cellules HEL par SdFFF

Après traitement à la diosgénine 10 μM pendant 12h, 24h, 48h et 96h, les cellules sont injectées dans l'appareil de FFF, et leur temps de rétention est évalué.

Les fractogrammes obtenus montrent que le pic d'éluion des cellules traitées par 10 μM de diosgénine est décalé vers la gauche par rapport au pic témoin dès 24h de traitement (Figure RII-12). Ce décalage de pic est ensuite accentué après 96h de traitement (Figure RII-12).

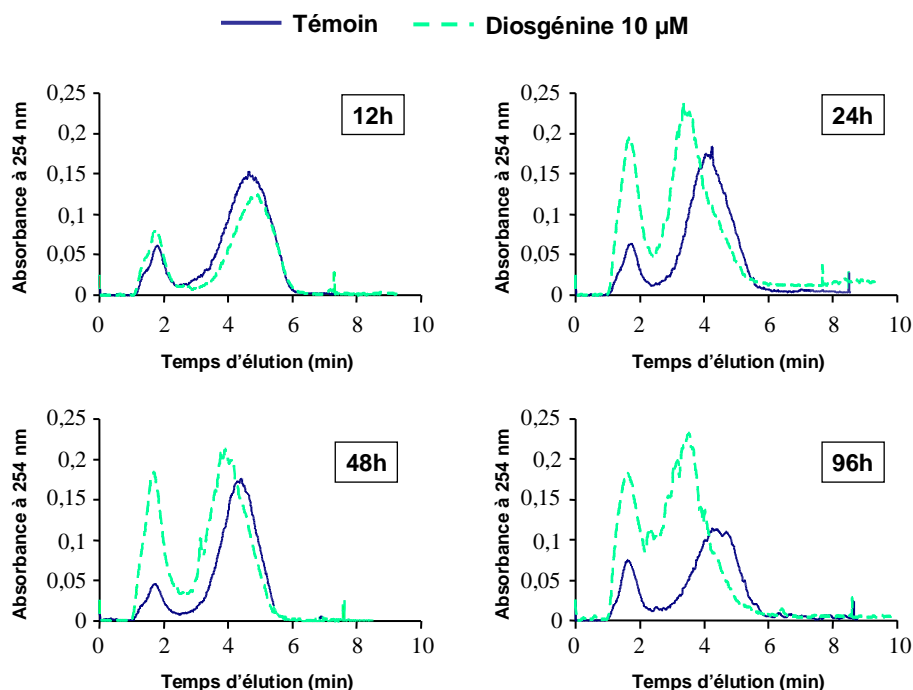


Figure RII-12 : Evolution des fractogrammes obtenus après passage en FFF des cellules différenciées à la diosgénine 10 μM . Les cellules traitées à la diosgénine 10 μM sont injectées dans l'appareil de FFF et les conditions d'éluion sont les mêmes que celles utilisées après induction de l'apoptose (voir Figure RI-16).

Le décalage du pic vers la gauche indique une diminution du temps de rétention des cellules. Selon les principes théoriques de la SdFFF, les particules les plus volumineuses se concentrent vers le milieu du canal où le flux est le plus rapide. Cette diminution du temps de rétention des cellules différenciées suggère donc une augmentation de la taille des cellules traitées par rapport aux cellules témoins.

Ceci est en accord avec nos observations précédentes, toutefois nous avons vérifié ces faits en mesurant le diamètre moyen des cellules à l'aide d'un Coulter Counter.

Les résultats démontrent que la diosgénine induit une augmentation du diamètre des cellules significative après 24h de traitement (Tableau RII-2). La différence de taille entre les cellules témoins et les cellules différenciées à la diosgénine augmente au cours du traitement jusqu'à obtenir un écart moyen d'environ 5 μm après 96h (Tableau RII-2).

Echantillon	Taille moyenne (μm)	Ecart-type (μm)
Témoin 12H	13,82	1,542
Dios 10 μM 12H	14,40	1,561
Témoin 24H	12,98	1,103
Dios 10 μM 24H	16,36	2,164
Témoin 48H	12,77	1,107
Dios 10 μM 48H	17,72	4,795
Témoin 96H	11,98	1,054
Dios 10 μM 96H	17,17	4,543

Tableau RII-2 : Evaluation de la taille moyenne des cellules HEL traitées à la diosgénine. Les cellules ont été traitées ou non à la diosgénine 10 μM pendant 12h, 24h, 48h et 96h et le diamètre moyen des cellules a été évalué au Coulter Counter.

D'autre part, toutes les cellules ne répondent pas de la même manière à la diosgénine. En effet, le fort écart-type dans les valeurs de diamètre moyen des cellules traitées à la diosgénine indique des différences de réponses entre les cellules. Certaines cellules se différencient et leur volume augmente fortement

jusqu'à 22-25 μM de diamètre, alors que d'autres se différencient peu et gardent un diamètre de 12-13 μM identique à celui des cellules témoins.

Afin de vérifier si les faits décrits précédemment étaient des caractéristiques de cellules en cours de différenciation mégacaryocytaire, ou des caractéristiques propres à l'action de la diosgénine, nous avons réalisé les mêmes expérimentations sur des cellules HEL traitées au PMA, un inducteur connu de la différenciation mégacaryocytaire des cellules leucémiques.

Les cellules HEL sont traitées par 50 nM de PMA pendant 48h, 72h, 96h et 120h, puis injectées dans l'appareil de FFF.

Les fractogrammes obtenus montrent que le pic d'éluion des cellules traitées par 50 nM de PMA est décalé vers la gauche par rapport au pic témoin après 96h de traitement (Figure RII-13). Ce décalage de pic est ensuite accentué après 120h de traitement (Figure RII-13).

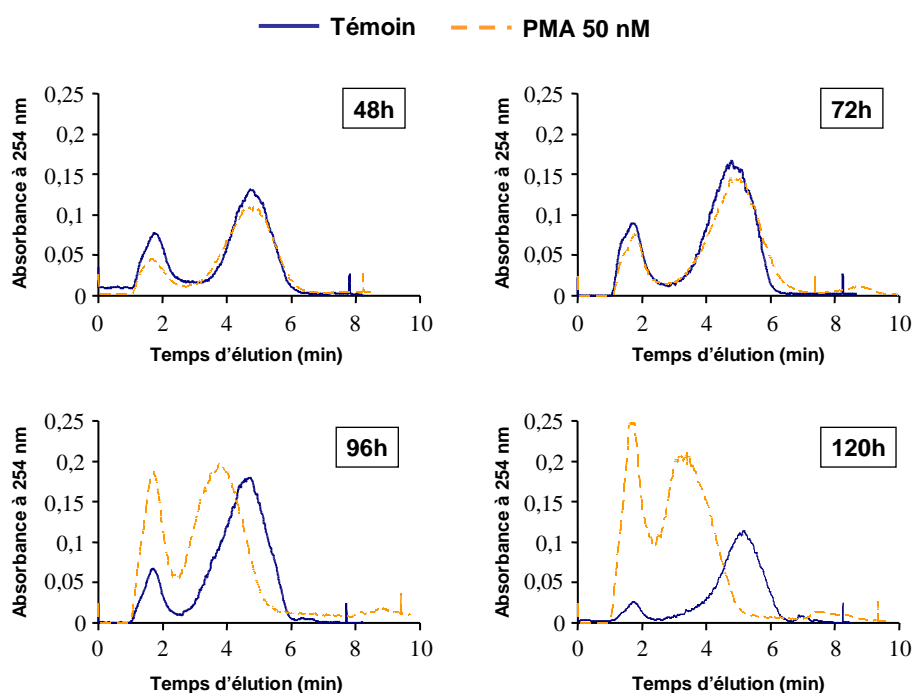


Figure RII-13 : Evolution des fractogrammes obtenus après passage en FFF des cellules différenciées au PMA 50 nM. Les cellules traitées au PMA 50 nM sont injectées dans l'appareil de FFF et les conditions d'éluion sont les mêmes que celles utilisées après induction de l'apoptose (voir Figure RI-16).

De la même manière, nous avons également évalué le diamètre moyen des cellules traitées au PMA 50 nM.

Les résultats démontrent que le PMA induit une augmentation du diamètre des cellules significative après 96h de traitement (Tableau RII-3). La différence de taille entre les cellules témoins et les cellules différenciées au PMA est caractérisée par un écart moyen d'environ 4 μm après 120h (Tableau RII-3).

Echantillon	Taille moyenne (μm)	Ecart-type (μm)
Témoin 72 h	12,85	1,130
PMA 10 nM 72h	12,67	2,341
Témoin 96 h	12,87	1,372
PMA 10 nM 96h	15,93	3,304
Témoin 120 h	11,58	1,060
PMA 10 nM 120h	16,09	4,036

Tableau RII-3 : Evaluation de la taille moyenne des cellules HEL traitées au PMA. Les cellules ont été traitées ou non au PMA 50 nM pendant 72h, 96h et 120h et le diamètre moyen des cellules a été évalué au Coulter Counter.

Après induction de la différenciation mégacaryocytaire par le PMA, on constate également que toutes les cellules ne répondent pas de la même façon au traitement. Là aussi, il existe des cellules qui se différencient rapidement et voient leur taille augmenter fortement alors que d'autres se différencient peu et ont une taille proche de celle des témoins. Ce que nous avons constaté pour la diosgénine se retrouve donc également pour le PMA.

Le processus de différenciation mégacaryocytaire n'étant pas induit simultanément et de manière équivalente dans toutes les cellules traitées à la diosgénine, nous avons cherché à isoler des populations de cellules plus ou moins différenciées en collectant les cellules dans différentes fractions en fonction de leur vitesse d'élution.

4.2. Tri de population cellulaires différenciées à la diosgénine par SdFFF

Pour cette étude, nous nous avons choisi de trier des sous-populations à partir de cellules traitées ou non à la diosgénine pendant 96h. Trois fractions ont été collectées : une première fraction (F1) correspondant à la montée du pic d'éluion des cellules, ce sont les cellules qui sont éluées en premier ; une seconde fraction (F2) correspondant au sommet du pic et dans laquelle on trouvera le plus grand nombre de cellules ; une dernière fraction (F3) correspondant à la descente du pic d'éluion, ce sont les cellules éluées en dernier.

Le tri de cellules témoins permet de vérifier que le passage en FFF n'altère pas la survie des cellules. On peut voir que la population totale (collection du pic dans sa totalité (pic total : PT) passée en FFF est tout à fait semblable aux cellules qui ne sont pas passées en FFF (sans FFF) (Figure RII-14). La population témoin étant une population homogène, on ne distingue pas de différence entre les fractions collectées entre elles et avec la population totale (Figure RII-14).

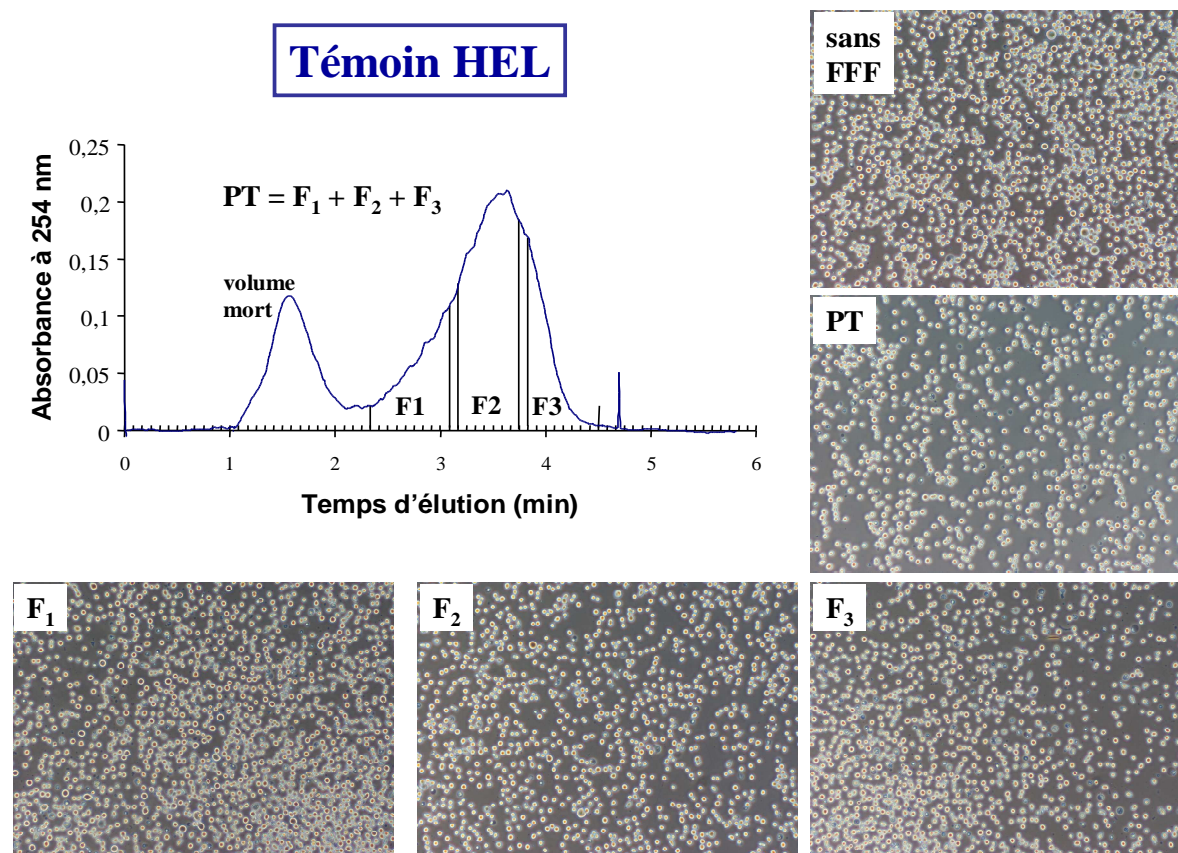


Figure RII-14 : Collection de fractions à partir de cellules HEL témoin en FFF. Les cellules HEL ont été cultivées pendant 96h puis passées ou non en FFF selon les conditions décrites Figure RI-16.

Nous avons vu que le traitement à la diosgénine induisait une différenciation mégacaryocytaire plus ou moins prononcée dans les cellules HEL. Nous avons donc voulu trier les sous-populations de cellules différenciées en FFF. Les cellules HEL ont été traitées à la diosgénine 10 μ M pendant 96h afin de recruter le maximum de cellules en différenciation tout en évitant les phénomènes de fragmentation cellulaire qui interviennent ultérieurement.

Le passage des cellules différenciées par la diosgénine en FFF ne semble pas altérer leur survie puisque la population issue de la collection du pic total est semblable à celle des cellules qui ne sont pas passées en FFF (Figure RII-15). On remarque également que des différences de morphologies sont visibles entre les cellules au sein de la population différenciée.

La collection séquentielle des cellules permet de séparer la population totale des cellules traitées à la diosgénine en trois fractions : F1, F2 et F3.

La fraction F1 est principalement constituée de cellules très volumineuses qui ont les caractéristiques morphologiques de cellules différenciées (Figure RII-15).

La fraction F2 est constituée d'un mélange entre des cellules assez volumineuses qui semblent se différencier et de petites cellules qui semblent indifférenciées (Figure RII-15).

La fraction F3 est pour sa part constituée de petites cellules dont la morphologie est tout à fait semblable à celle des témoins (Figure RII-15).

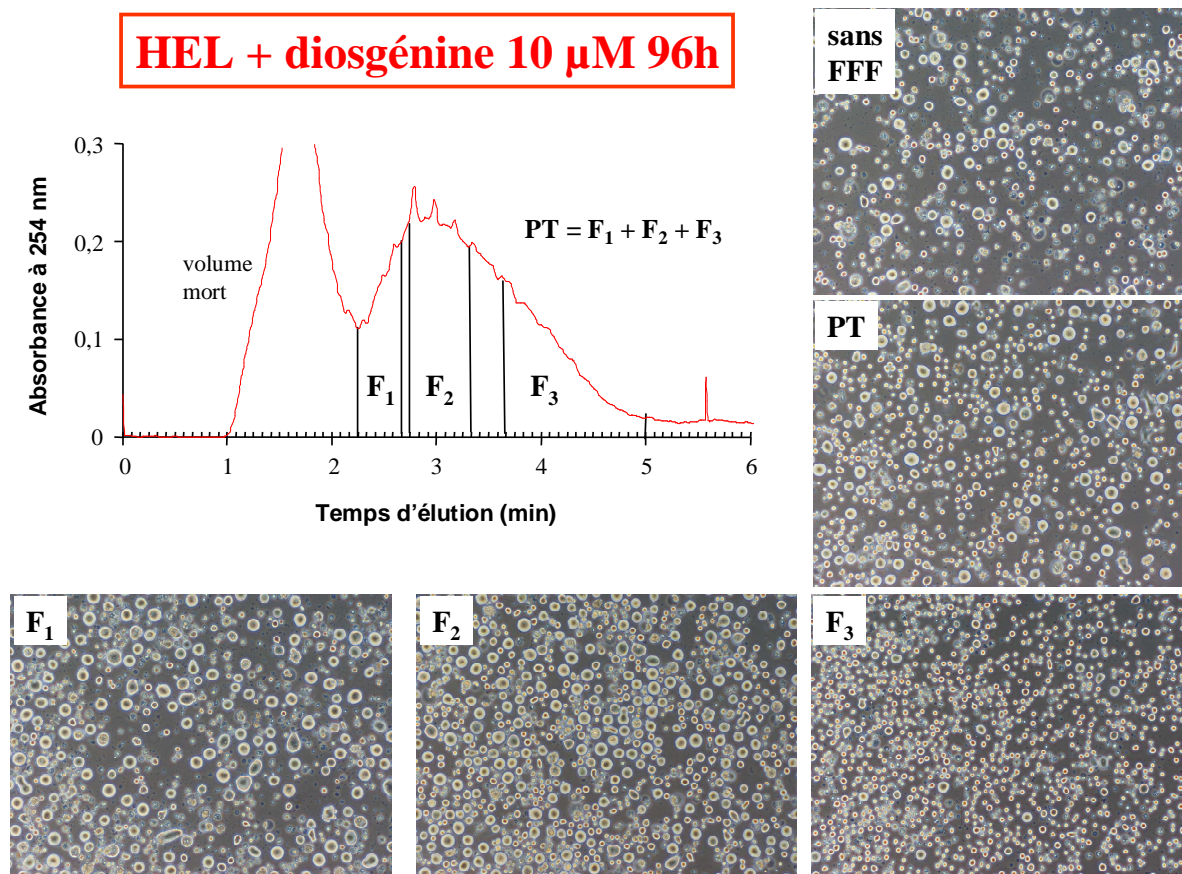


Figure RII-15 : Collection de fractions à partir de cellules HEL différenciées à la diosgénine pendant 96h et passées en FFF. Les cellules HEL ont été cultivées pendant 96h en présence de 10 μ M de diosgénine puis passées ou non en FFF selon les conditions décrites Figure RI-16.

Il semble donc que la séparation des cellules différenciées se fasse en fonction de la taille des cellules. Ceci est en accord avec le principe théorique de la SdFFF qui prévoit que, à densité équivalente, les particules les plus volumineuses se positionnent vers le centre du canal et sont éluées en premier. Les particules de taille réduite sont plus proches de la paroi d'accumulation et sont éluées en dernier.

Afin de vérifier ceci, nous avons mesuré le diamètre moyen des cellules des différentes fractions au Coulter Counter. Ainsi, les cellules de la fraction F₁ ont un diamètre de $17,15 \pm 1,04 \mu\text{m}$, celles de F₂ un diamètre moyen de $13,57 \pm 1,40 \mu\text{m}$ et celles de F₃ un diamètre de $11,82 \pm 0,57 \mu\text{m}$.

Par la suite, nous avons vérifié le degré de différenciation des cellules présentes dans les différentes fractions. La différenciation mégacaryocytaire a été évaluée par la mesure du contenu en ADN des cellules et de l'expression

membranaire du marqueur mégacaryocytaire CD41 et du marqueur érythrocytaire, la glycophorine A.

Les cellules HEL ont été traitées avec 10 μ M de diosgénine pendant 96h puis triées en FFF. Les cellules ont été collectées comme précédemment en trois fractions dont le contenu en ADN a été évalué par cytométrie en flux après fixation et marquage de l'ADN à l'iodure de propidium.

Dans la population témoin, on retrouve une très grande majorité de cellules à 2N et 4N chromosomes (Figure RII-16). Environ 2% des cellules sont à 8N chromosomes (Figure RII-16).

Comme nous l'avons vu précédemment, le traitement à la diosgénine 10 μ M pendant 24h induit la polyploïdisation des cellules HEL (Figure RII-16). Ainsi, après traitement, 22% des cellules sont à 8N chromosomes, 13% à 16N et 10% à 32N chromosomes (Figure RII-16). Environ 1% des cellules sont alors à 64N chromosomes (Figure RII-16).

Le passage en FFF et la collection du pic dans sa totalité (PT dios) ne modifie pas ces paramètres et la proportion entre les cellules plus ou moins polyploïdes reste la même (Figure RII-16).

Dans la fraction F1, récoltée en premier durant la montée du pic d'élution, on retrouve une majorité de cellules polyploïdes. En effet, dans la fraction F1, plus de 80% des cellules ont un contenu en ADN supérieur à 4N chromosomes (Figure RII-16). Dans F1, 15% environ des cellules sont à 8N chromosomes, environ 40% sont à 16N chromosomes, 25% à 32N et environ 2% sont à 64N chromosomes (Figure RII-16).

Dans la fraction F2, récoltée au sommet du pic d'élution, on retrouve un profil de ploïdie correspondant à celui de la population totale (Figure RII-16). Ceci confirme que la fraction F2 correspond à un mélange de cellules plus ou moins différenciées comme les observations microscopiques nous l'avaient fait supposer.

Dans la fraction F3, récoltée en dernier durant la descente du pic d'élution des cellules, on retrouve un profil de ploïdie très proche de celui de la population témoin avec 95% des cellules à 2N ou 4N chromosomes (Figure RII-16).

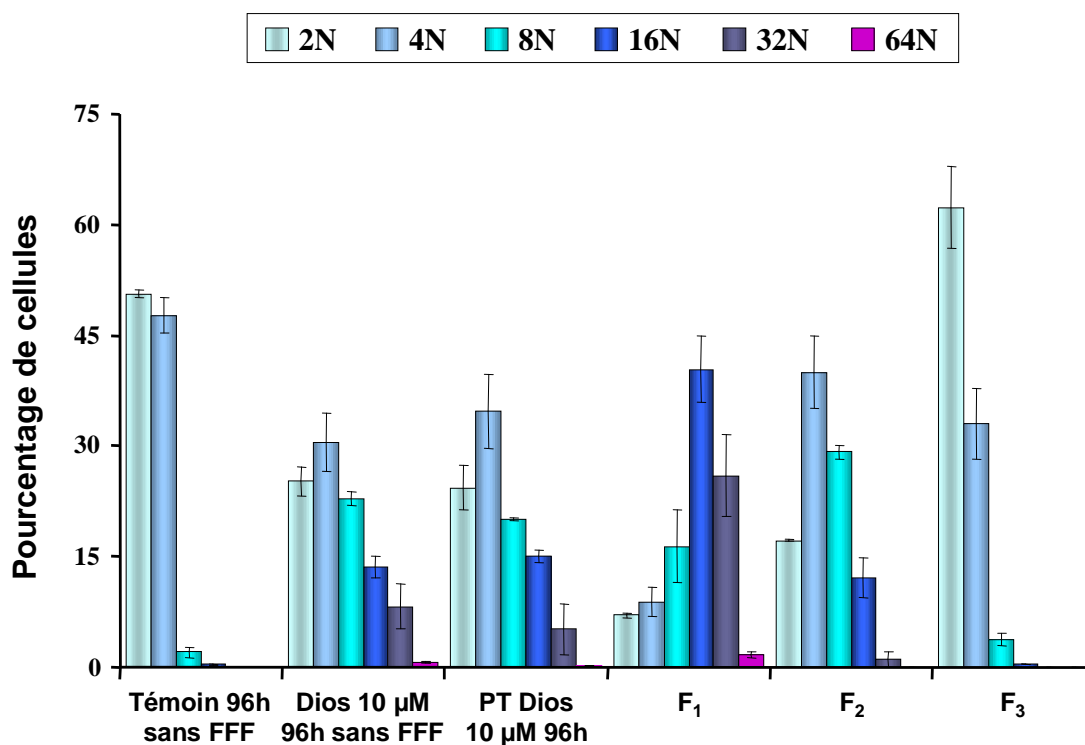


Figure RII-16 : Evaluation du contenu en ADN des cellules différenciées à la diosgénine 10 µM et triées en FFF. Les cellules HEL ont été cultivées pendant 96h en présence de 10 µM de diosgénine puis passées ou non en FFF selon les conditions décrites Figure RI-16. Le pic d'éluion des cellules a également été séparé ou non en trois fractions, et le contenu en ADN des cellules a été évalué par cytométrie en flux après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium.

Suite au tri des cellules HEL traitées à la diosgénine 10 µM pendant 96h, l'expression membranaire du marqueur mégacaryoctaire CD41, et celle du marqueur érythrocytaire, la glycophorine A, ont été évaluées dans les différentes fractions.

Ainsi que nous l'avons vu précédemment, le traitement à la diosgénine 10 µM induit une augmentation de l'expression du CD41 et une diminution de l'expression de la glycophorine A (comparaison cellules témoins sans FFF contre cellules traitées sans FFF, Figure RII-17).

Le passage en FFF n'affecte pas significativement le marquage du CD41, toutefois on peut constater que le marquage post-éluion de la glycophorine A est moins fort dans les populations totales passées en FFF (PT témoin et PT dios 10 µM) que dans les populations qui ne sont pas passées en FFF (Figure RII-17).

Pour la suite de l'étude, nous comparerons donc l'expression de ces deux marqueurs membranaires dans les fractions recueillies par rapport à leur expression dans la population totale (témoin ou dios) passée en FFF.

Dans la fraction F1, le marquage au CD41 est très légèrement augmenté par rapport à celui de la population différenciée totale passée en FFF (Figure RII-17). L'expression de la glycopherine A dans la fraction F1 est réduite d'un facteur 2 par rapport à celle de la population différenciée totale passée en FFF, et réduite d'un facteur 5 par rapport à celle de la population témoin passée en FFF (Figure RII-17).

A nouveau, dans la fraction F2, on retrouve un profil tout à fait semblable à celui de la population totale différenciée, que ce soit au niveau de l'expression du CD41 ou de celle de la glycopherine A (Figure RII-17).

Dans la fraction F3, le marquage du CD41 et de la glycopherine A est d'une intensité comparable à celle du marquage de la population témoin passée en FFF (Figure RII-17).

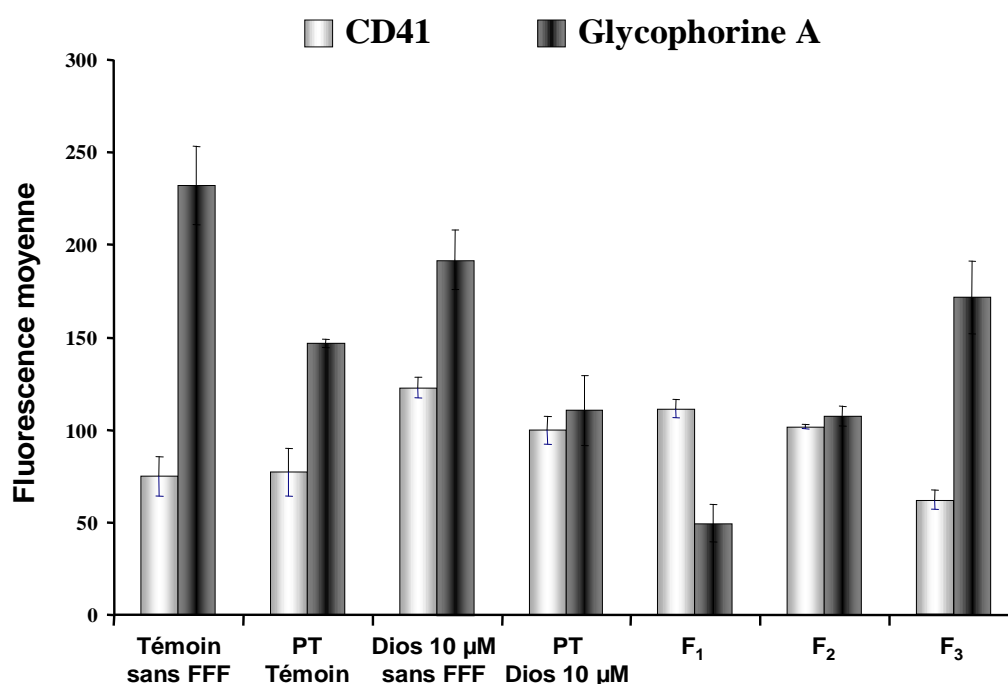


Figure RII-17 : Expression membranaire du CD41 et de la glycopherine A des cellules HEL différenciées et passées en FFF. Les cellules HEL ont été cultivées pendant 96h en présence de 10 µM de diosgénine puis passées ou non en FFF selon les conditions décrites Figure RI-16. Le pic d'éluion des cellules a également été séparé ou non en trois fractions, et l'expression membranaire du CD41 et de la glycopherine A a été évaluée après marquage des cellules avec des anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes et passage en cytométrie en flux.

Nous venons de voir que le passage des cellules en FFF et la collection de fractions permettaient de séparer des sous-populations de cellules plus ou moins différenciées après 96h de traitement.

L'étape suivante était celle de la remise en culture des populations triées afin d'observer leur évolution. Toutefois nous avons vu, qu'après 96h de traitement à la diosgénine 10 μM , les cellules différenciées en présence de diosgénine évoluaient rapidement vers la fragmentation (à 144h et 192h de traitement).

Or, nous avons également vu que cette différenciation pouvait être détectée de façon précoce, après 24h de traitement.

Nous avons donc cherché à trier en FFF des cellules traitées à la diosgénine 10 μM pendant 24h et après les avoir remises en culture en l'absence de diosgénine, nous avons étudié l'évolution de ces cellules.

4.3. Tri de populations cellulaires après 24h d'exposition à la diosgénine et évolution de ces cellules après remise en culture

Afin de pouvoir séparer de manière plus précise les différentes populations de cellules différenciées, les cellules ont été passées dans un nouveau canal de séparation (canal de 175 μm d'épaisseur) permettant l'utilisation d'un champ multigravitationnel plus faible (10G) et d'un débit de phase mobile plus rapide (0,8 ml/min).

Dans ce nouveau canal, on constate que le traitement à la diosgénine 10 μM pendant 24h conduit à un décalage du pic d'élution des cellules vers la gauche comme décrit précédemment dans le canal de 125 μm d'épaisseur (Figure RII-18).

Par ailleurs, les nouveaux paramètres d'élution conduisent à un étalement du pic de cellules qui autorise la collection de quatre fractions (Figure RII-18).

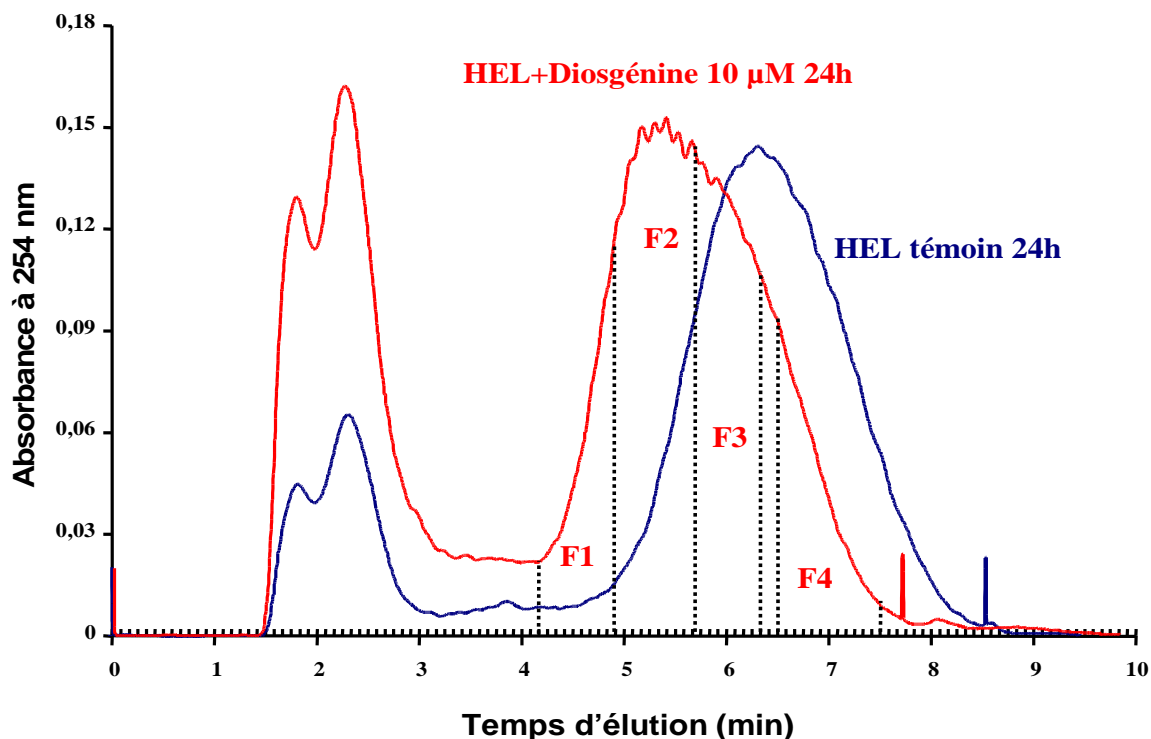


Figure RII-18 : Fractogrammes obtenus après passage en FFF de cellules traitées ou non à la diosgénine 10 µM pendant 24h. Les cellules traitées à la diosgénine 10 µM pendant 24h sont injectées dans l'appareil de FFF selon les conditions suivantes : 100 µl de suspension cellulaire ($2,5 \times 10^6$ cellules/ml) ; débit de la phase mobile (PBS, pH=7,4) : 0,8 ml/min ; champ multigravitationnel de 10G et détection des cellules par spectrophotométrie à 254 nm.

Dans un premier temps, nous avons remis en culture les cellules collectées dans la totalité du pic. Ces cellules ont été réensemencées dans du milieu ne contenant pas de diosgénine. Après 72h de culture, c'est-à-dire 96h après l'induction à la diosgénine 10 µM, les cellules sont récupérées et à nouveau passées en FFF.

Le pic d'élution des cellules traitées pendant 24h à la diosgénine puis cultivées pendant 72h dans du milieu sans diosgénine (« wash out ») est alors comparé au pic d'élution des cellules traitées à la diosgénine 10 µM pendant 96h et au pic d'élution des cellules témoins cultivées pendant 96h.

La montée du pic « wash out » démarre en même temps que celle du pic des cellules exposées à la diosgénine pendant 96h (Figure RII-19). Toutefois, cette montée du pic « wash out » est moins rapide que celle du pic des cellules traitées, le pic « wash out » est étalé et atteint son sommet en même temps que le pic témoin (Figure RII-19).

La descente du pic « wash out » est ensuite comparable à celle du pic témoin (Figure RII-19).

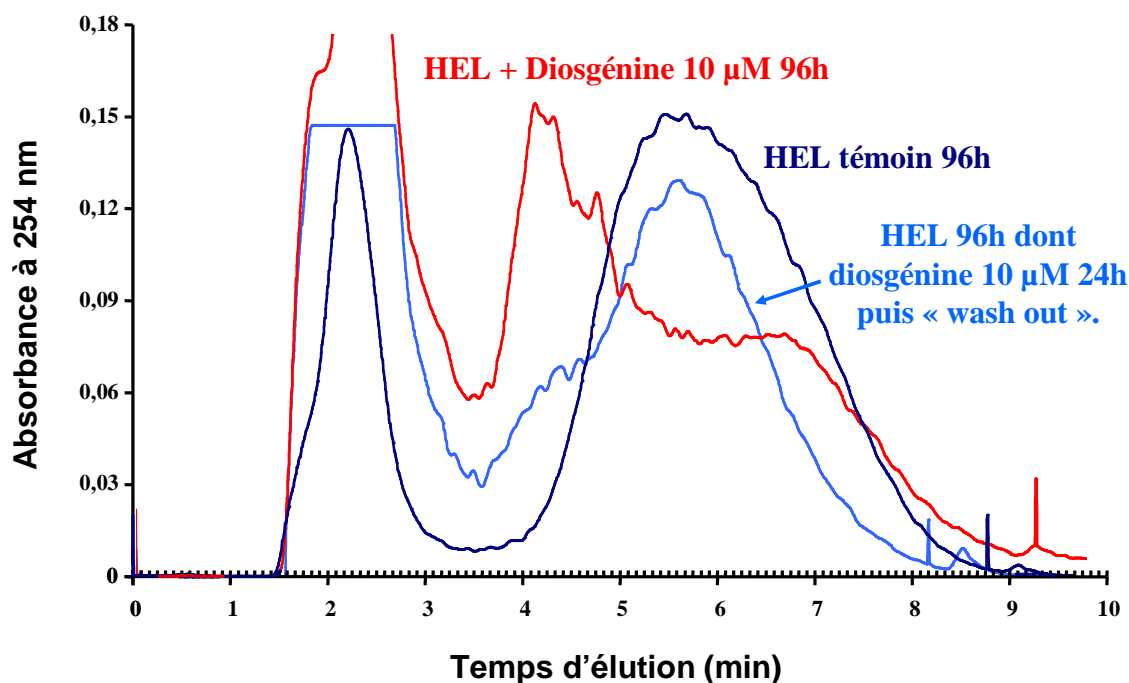


Figure RII-19 : Profil d'élution des cellules HEL exposées à la diosgénine 10 µM pendant 24h puis cultivées pendant 72h sans diosgénine. Comparaison avec les profils des cellules témoins et des cellules traitées à la diosgénine pendant 96h. Les cellules qui ont été collectées dans la fraction pic total de la figure RII-18 sont cultivées pendant 72h en l'absence de diosgénine puis à nouveau injectées dans l'appareil de FFF dans les conditions précisées à la figure RII-18. Les cellules témoins et les cellules traitées à la diosgénine 10 µM pendant 96h sont ensuite injectées dans les mêmes conditions.

Le profil d'élution des cellules issues du pic total à 24h et cultivées pendant 72h sans diosgénine indique que 24h d'exposition à la diosgénine peuvent suffire à induire la différenciation puisqu'il existe des cellules volumineuses qui sont éluées au même moment que les cellules traitées à la diosgénine pendant 96h.

Toutefois, le pic d'élution des cellules issues du pic total à 24h et cultivées pendant 72h sans diosgénine est élargi et décalé vers la droite par rapport au pic d'élution des cellules traitées à la diosgénine pendant 96h.

Ceci indique qu'une grande proportion de cellules ne s'est pas différenciée au bout de 24h d'exposition à la diosgénine, et que ces cellules non différenciées ont proliféré, augmentant ainsi leur proportion par rapport aux cellules différenciées qui ne prolifèrent pas.

Les hypothèses décrites précédemment ont été testées par mesure du contenu en ADN des cellules présentes dans les différentes fractions afin d'évaluer le degré de différenciation des cellules après « wash out ».

Il semble que le profil de ploïdie des cellules traitées à la diosgénine pendant 24h puis cultivées pendant 72h sans diosgénine soit intermédiaire entre le profil des cellules traitées à la diosgénine pendant 24h et celui des cellules traitées à la diosgénine pendant 96h (Figure RII-20). Ce profil des cellules « wash out » est le même que les cellules soient passées en FFF ou non.

Après 24h de traitement à la diosgénine, environ 20% des cellules ont un contenu en ADN supérieur à 4N chromosomes. Les cellules ayant une ploïdie supérieure à 4N chromosomes sont alors très majoritairement à 8N chromosomes (Figure RII-20).

Après 96h de traitement à la diosgénine, environ 45% des cellules ont un contenu en ADN supérieur à 4N chromosomes. Au bout de 96h de traitement, on observe des cellules à 8N, 16N, 32N et 64N chromosomes (Figure RII-20).

En ce qui concerne les cellules « wash out », environ 20% des cellules ont un contenu en ADN supérieur à 4N chromosomes comme dans les cellules traitées à la diosgénine pendant 24h, et l'on observe des cellules à 8N, 16N, 32N et 64N chromosomes comme dans les cellules traitées à la diosgénine pendant 96h (Figure RII-20).

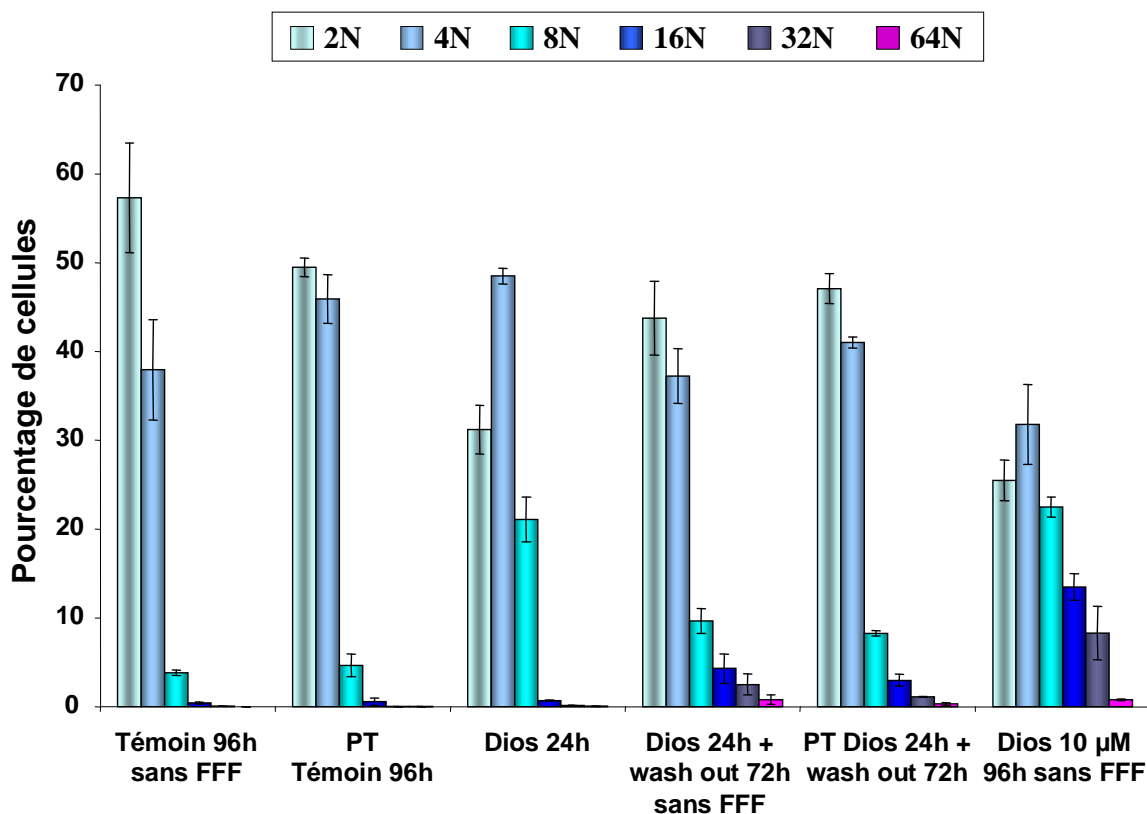


Figure RII-20 : Mesure de la ploïdie des cellules après « wash out ». Les cellules HEL ont été traitées ou non à la diosgénine pendant 24h puis passées ou non en FFF. Après passage en FFF selon les conditions décrites figure RII-18, le pic total est collecté et les cellules sont remises en culture dans du milieu sans diosgénine pendant 72h. L'évaluation du contenu en ADN est effectuée après marquage des cellules à l'iodure de propidium et passage en cytométrie en flux.

Il semble donc que les cellules recrutées après 24h de traitement aient évolué vers un plus haut degré de différenciation tandis que les cellules non recrutées continuaient de proliférer.

Par la suite, ce sont les quatre fractions collectées après 24h de traitement qui ont été remises en culture pendant 72h sans diosgénine et à nouveau passées en FFF.

Le pic d'éluion de la fraction F1 est celui qui démarre le plus tôt, le sommet du pic est atteint très tôt, puis le pic s'étale avec une descente très longue (Figure RII-21). La fraction F1 ayant évolué pendant 72h sans diosgénine semble constituée de cellules volumineuses probablement bien différenciées et de toute une gamme de cellules de tailles intermédiaires.

La fin du pic d'élution de F1 semble quant à elle constituée d'un assez grand nombre de cellules ayant un temps de rétention proche de celui des cellules témoins. Ces cellules sont vraisemblablement issues de cellules non différenciées après 24h et qui ont proliféré durant les 72h de culture.

Le pic d'élution de la fraction F2 présente un profil tout à fait particulier avec deux sommets distincts (Figure RII-21). Le premier sommet est assez précoce, il est de forte amplitude et se situe peu de temps après le pic de la fraction F1 (Figure RII-21). Le second pic est plus tardif et se situe à peu près dans les mêmes temps que le pic d'élution des cellules témoins (Figure RII-21).

Le pic d'élution de la fraction F3 démarre assez tôt avec un tout premier pic de faible amplitude, puis le pic proprement dit est de forte amplitude et se situe à peu près dans les mêmes temps que le pic d'élution des cellules témoins (Figure RII-20).

Le pic d'élution de la fraction F4 est homogène et se situe à peu près dans les mêmes temps que le pic d'élution des cellules témoins (Figure RII-21).

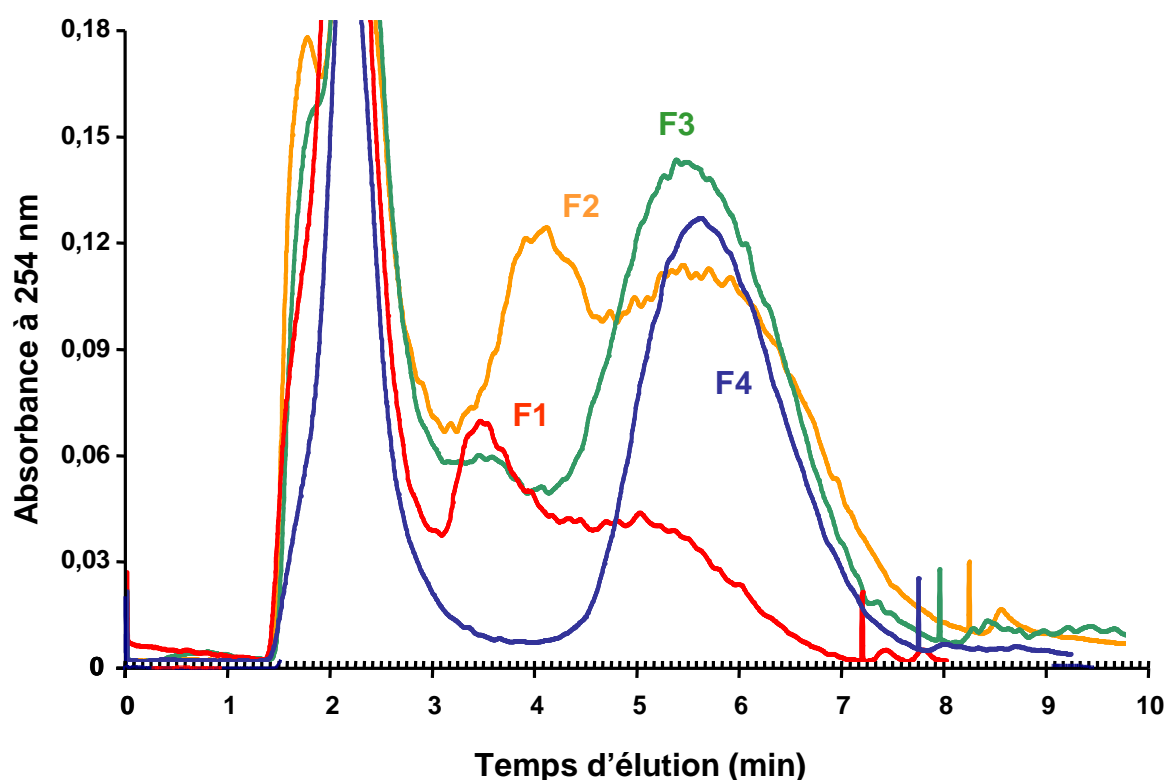


Figure RII-21 : Profils d'élution des fractions collectées au bout de 24h de traitement à la diosgénine 10 µM puis cultivées sans diosgénine pendant 24h.

Les fractions collectées ont été réensemencées dans du milieu de culture sans diosgénine pendant 72h puis injectées en FFF selon les conditions décrites Figure RII-18.

Au cours de ce passage en FFF, les fractions F2 et F3 ont été resubdivisées en trois fractions afin de voir si l'on pouvait encore enrichir les différentes fractions en cellules différenciées. Toutefois, la fraction F1 n'a pas pu être fractionnée à nouveau du fait de la fragilité des cellules très différenciées et de la faible proportion de ces cellules dans cette fraction. La fraction F4 étant homogène, elle n'a pas été fractionnée à nouveau.

Le contenu en ADN des cellules a donc été évalué dans les fractions F1, F1/F2, F2/F2 et F3/F2 (qui sont les trois fractions issues de F2), F1/F3, F2/F3 et F3/F3 (qui sont les trois fractions issues de F3) et F4.

Concernant la fraction F1, on retrouve dans cette fraction des cellules à la ploïdie très élevée. Toutefois, du fait de la prolifération des cellules qui ne se sont pas engagées dans la différenciation après 24h de traitement à la diosgénine et du fait de l'impossibilité de sous-fractionner la fraction F1, les cellules très différenciées représentent un faible pourcentage dans F1 (Figure RII-22).

Le sous fractionnement de la fraction F2 a permis de séparer les cellules en fonction de leur différenciation. Les cellules les plus différenciées de F2 se retrouvent dans F1/F2 (cellules à 8N, 16N, 32N et 64N chromosomes) et les cellules les moins différenciées se retrouvent dans F3/F2 et ont une ploïdie semblable à celle des cellules témoins (Figure RII-22). La fraction F2/F2 constitue un mélange de cellules représentatif de ce qu'était la fraction F2 avant d'être sous-fractionnée.

De même, la fraction F1/F3 comporte les cellules les plus différenciées de F3, la fraction F3/F3 comporte les cellules les moins différenciées de F3 avec un profil de ploïdie proche de celui des cellules témoins et la fraction F2/F3 est un mélange de cellules représentatif de ce qu'était la fraction F2 avant d'être sous-fractionnée (Figure RII-4).

La fraction F4 est constituée de cellules qui ont un profil de ploïdie proche de celui des cellules témoins. Ces cellules ne se sont vraisemblablement pas différenciées. Toutefois, elles ne sont pas résistantes à la diosgénine car un traitement à la diosgénine 10 μ M est capable d'induire la différenciation des cellules de F4.

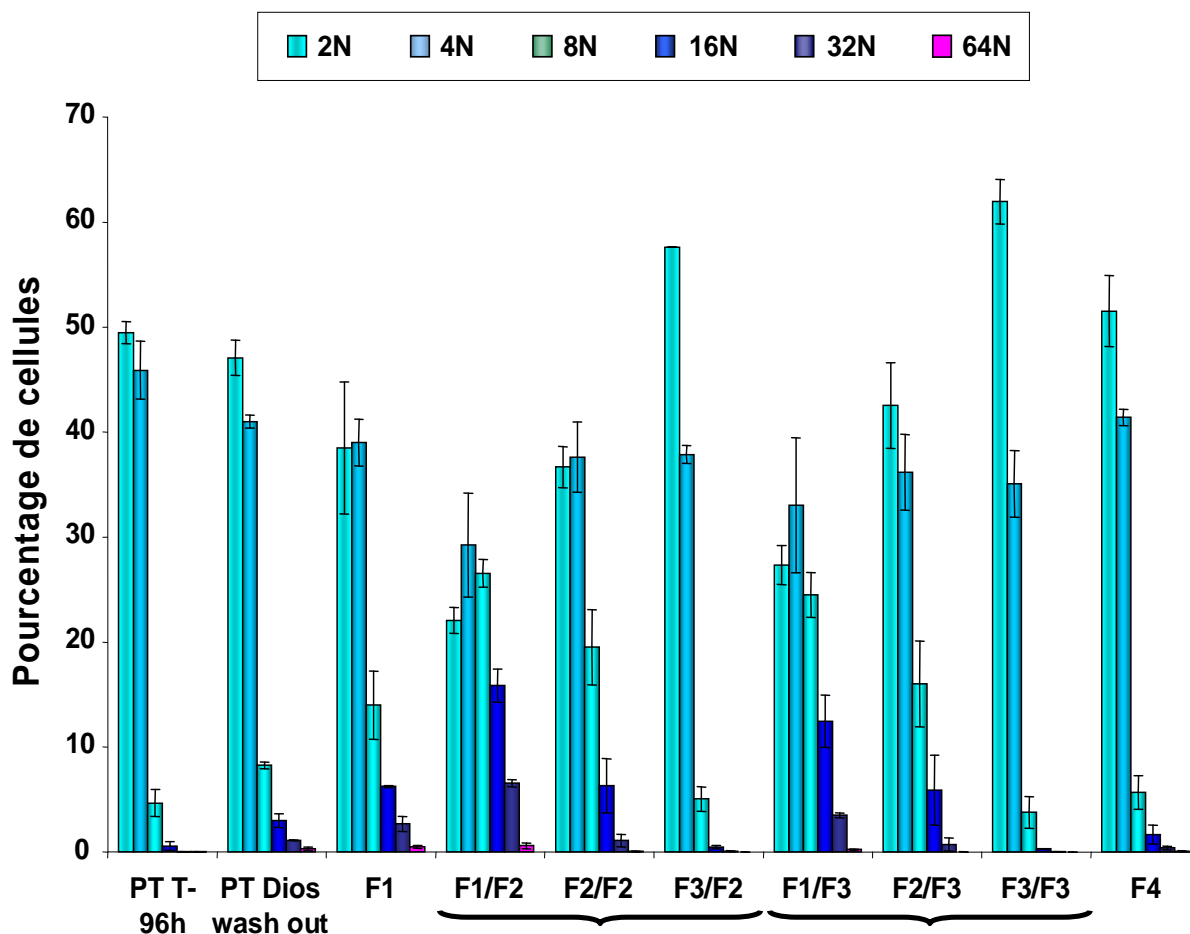


Figure RII-22 : Evaluation du contenu en ADN des fractions collectées et soumises au « wash out ». Les cellules HEL ont été traitées ou non à la diosgénine 10 μ M pendant 24h puis passées ou non en FFF. Après passage en FFF selon les conditions décrites figure RII-18, les cellules des différentes fractions collectées sont remises en culture dans du milieu sans diosgénine pendant 72h. Après un second passage en FFF dans les conditions décrites précédemment, les fractions F2 et F3 sont à nouveau fractionnées en 3 sous fractions. L'évaluation du contenu en ADN est effectuée après marquage des cellules à l'iodure de propidium et passage en cytométrie en flux.

III- MODULATION PAR LE LÉFLUNOMIDE DE L'APOPTOSE INDUITE DANS LES CELLULES ÉRYTHROLEUCÉMIQUES HEL ET K562

Nous avons vu que la diosgénine à 40 μM induisait l'apoptose des cellules HEL tout en augmentant l'expression et l'activité de la cyclooxygénase-2 (COX-2).

Nous avons alors cherché à étudier le rôle des métabolites de COX-2 dans l'induction de l'apoptose des cellules HEL. Pour ce faire, nous avons sélectionné un inhibiteur de l'activité de COX-2, le léflunomide, connu pour réduire la synthèse de PGE_2 dans différents types cellulaires.

De plus, le léflunomide avait également démontré un effet pro-apoptotique à forte dose sur des lignées de cancer du sein ou de gliome.

Dans un premier temps nous avons donc évalué l'effet de différentes concentrations de léflunomide sur la prolifération et la viabilité des cellules HEL puis nous avons étendu nos investigations aux cellules K562 de leucémie myéloïde chronique et aux cellules Meg-01 de leucémie mégacaryocytaire.

1. Prolifération cellulaire et viabilité

1.1. Prolifération et viabilité des cellules HEL

Les cellules HEL sont ensemencées à 10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération (J1), les cellules sont traitées ou non (témoin) par une gamme de concentrations de léflunomide allant de 1 à 100 μM . La prolifération des cellules est alors suivie par le test au MTT pendant 5 jours post traitement, et comparée à la prolifération des cellules témoins.

Après 24h de traitement (J2), on observe une légère inhibition de la prolifération des cellules HEL à des doses de 50 et 100 μM (Figure RIII-1A).

A partir de 48h (J3), deux effets du léflunomide se distinguent en fonction de la dose utilisée. Les doses les plus représentatives de ces deux effets sont les doses de 10 μM et 100 μM .

A une concentration de 100 μM , on observe une inhibition de la prolifération, le nombre de cellules décroît en fonction du temps de traitement (Figure RIII-1A). Cet effet a été décrit sur d'autres lignées et confirme l'effet anti-prolifératif des fortes doses de léflunomide.

Par contre la concentration de 10 μM induit une légère augmentation de la prolifération des cellules à partir de 48h (J3) de traitement, mais l'effet principal de cette dose se manifeste surtout en fin de traitement où à partir de 72h (J4), le nombre de cellules traitées au léflunomide reste stable alors que le nombre de cellules témoins décroît du fait de l'épuisement du milieu de culture (Figure RIII-1A).

Afin de vérifier cet effet tout à fait nouveau et jamais décrit jusqu'alors, nous avons évalué l'évolution de la viabilité des cellules cultivées en présence ou non de 10 μM de léflunomide.

Les cellules HEL sontensemencées à 10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération (J1), les cellules sont traitées ou non (témoin) par 10 μM de léflunomide. La viabilité et le nombre des cellules traitées ou non au léflunomide 10 μM sont alors suivis par coloration au bleu trypan et numération pendant 5 jours post traitement.

La détermination de la viabilité cellulaire et la numération des cellules permettent d'observer que le nombre maximal de cellules vivantes est atteint à J4 pour les cellules témoins et les cellules traitées au léflunomide 10 μM (Figure RIII-1B). Dans la population témoin, le nombre de cellules vivantes diminue à partir de J5 du fait de l'épuisement du milieu de culture (Figure RIII-1B). Le traitement au léflunomide 10 μM maintient un nombre élevé de cellules vivantes alors que le milieu s'épuise de la même manière que dans les témoins (Figure RIII-1B).

Le léflunomide semble donc favoriser la survie des cellules HEL.

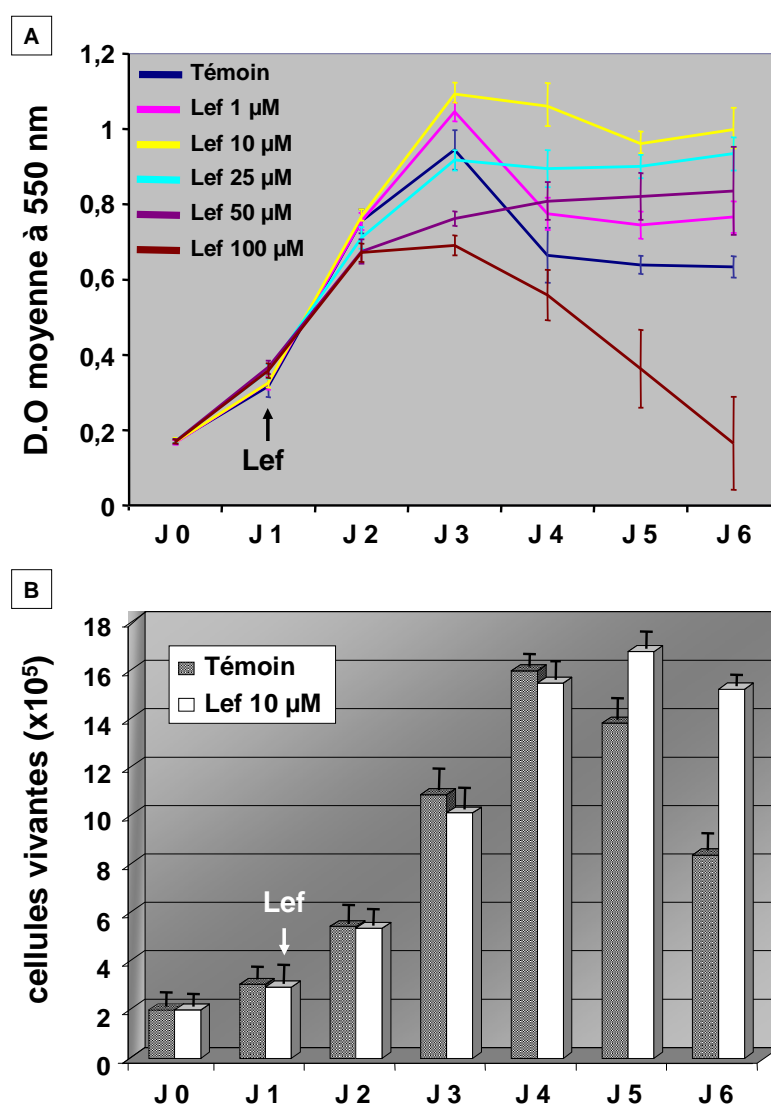


Figure RIII-1 : Effets du léflunomide sur la prolifération et la viabilité des cellules HEL. Les cellules HEL sontensemencées à 10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération (J1), les cellules sont traitées ou non (témoin) au léflunomide (1-100 μ M) et cultivées pendant 5 jours sans changement de milieu. La prolifération des cellules est évaluée par le test au MTT (A). La viabilité et le nombre de cellules sont évalués après coloration au bleu trypan et numération sur lame de Mallassez des cellules traitées au léflunomide 10 μ M (B).

Nous avons également vérifié si les cellules dont la survie est augmentée par le léflunomide étaient capables de proliférer dans des conditions normales ou si elles finissaient par mourir. Les cellules HEL sontensemencées à 10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération, les cellules ont été traitées ou non (témoin) par 10 μ M de léflunomide et laissées en culture pendant 5 jours supplémentaires. Les cellules sont alors récupérées et réensemencées à une

densité de 10^5 cellules vivantes/ml de milieu de culture frais. La prolifération des cellules est ensuite suivie par le test au MTT pendant 4 jours.

La remise en culture des cellules témoins indique qu'un faible nombre de ces cellules sont capables de proliférer à nouveau. En effet, dans des conditions normales, le temps de doublement des cellules HEL est de 24h. On peut voir figure RIII-2 que les cellules témoins remises en culture mettent trois jours avant de doubler leur nombre.

A l'inverse, les cellules traitées au léflunomide ont conservé intacte leur capacité de prolifération puisque lorsqu'elles sont remises en culture dans du milieu frais, leur nombre double en 24h (Figure RIII-2).

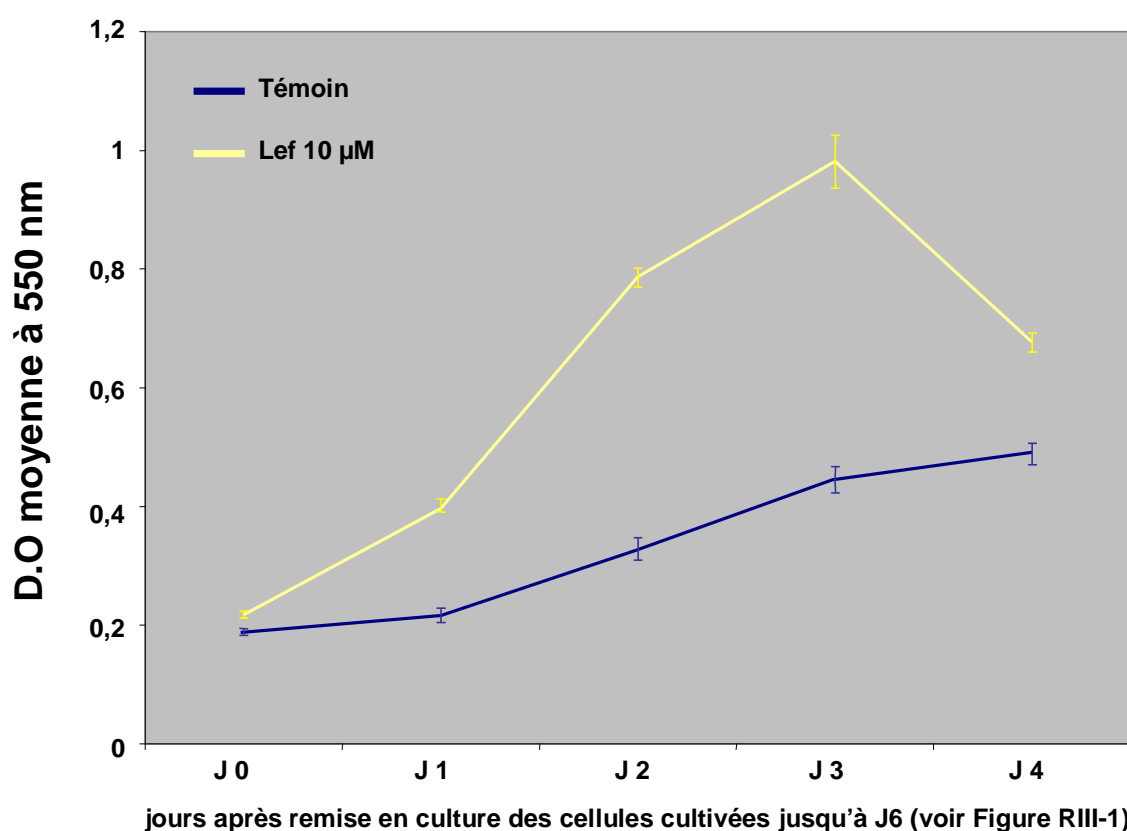


Figure RIII-2 : Prolifération après remise en culture des cellules HEL traitées ou non au léflunomide 10 µM. Les cellules HEL ayant été traitées ou non (témoin) au léflunomide 10 µM ont été cultivées dans les conditions décrites figure RIII-1 puis réensemencées dans du milieu frais. La prolifération des cellules est évaluée par le test au MTT.

Les principaux effets biologiques du léflunomide décrits jusqu'alors étaient basés sur le pouvoir inhibiteur du léflunomide vis-à-vis de l'activité de la dihydroorotate déshydrogénase, une enzyme clé de la biosynthèse des pyrimidines.

Ainsi l'effet anti-prolifératif du léflunomide à forte dose est dû à l'inhibition de la synthèse des pyrimidines nécessaires à la prolifération des cellules. L'addition d'uridine dans le milieu de culture avait pour effet de réverser l'inhibition de la prolifération.

Même si l'effet que nous avons observé avec 10 μM de léflunomide est l'inverse de celui décrit dans les études précédentes, nous avons testé l'effet d'une complémentation du milieu par de l'uridine à 200 μM sur la prolifération des cellules HEL en présence ou non de léflunomide.

Les résultats présentés figure RIII-3 montrent que le prétraitement avec de l'uridine 200 μM 2h avant le traitement au léflunomide 10 μM n'inverse pas l'effet de prolongement de la survie des cellules du léflunomide. On constate même un léger effet synergique entre le léflunomide et l'uridine mais cet effet est dû au fait que la complémentation à l'uridine accroît également la survie des cellules comme on peut le voir dans la condition uridine seule par rapport au témoin (Figure RIII-3).

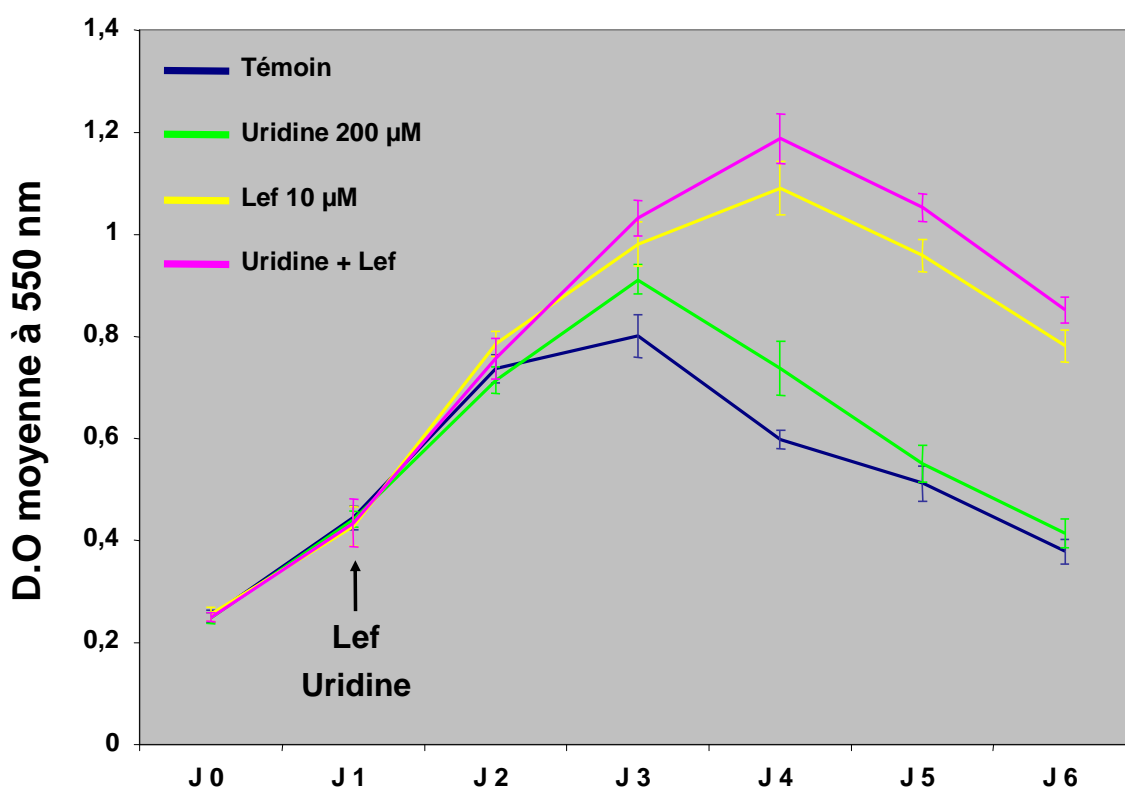


Figure RIII-3 : Effet de l'uridine sur la prolifération des cellules HEL traitées au léflunomide 10 μM . Les cellules HEL ont été prétraitées ou non avec de l'uridine 200 μM puis traitées ou non au léflunomide 10 μM et cultivées dans les conditions décrites figure RIII-1 puis réensemencées dans du milieu frais. La prolifération des cellules est évaluée par le test au MTT.

Nous avons ensuite vérifié si l'effet du léflunomide 10 μM en faveur de la survie des cellules HEL était propre aux cellules HEL elles-mêmes ou pouvait être étendu à d'autres cellules leucémiques.

1.2. Prolifération et viabilité des cellules K562

Les cellules K562 sontensemencées à 10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération (J1), les cellules sont traitées ou non (témoin) par une gamme de concentrations de léflunomide allant de 1 à 100 μM . La prolifération des cellules est alors suivie par le test au MTT.

Les effets du léflunomide sur la prolifération des cellules K562 semblent les mêmes que ceux modifiant la prolifération des cellules HEL.

A une concentration de 100 μM , on observe une inhibition de la prolifération des cellules K562 (Figure RIII-4A). Cet effet a également été décrit sur d'autres lignées.

Par contre la concentration de 10 μM a pour effet de maintenir la survie des cellules K562 alors que le nombre de cellules témoins décroît du fait de l'épuisement du milieu de culture (Figure RIII-4A).

Nous avons également évalué pour les cellules K562 l'évolution de la viabilité des cellules cultivées en présence ou non de 10 μM de léflunomide. La viabilité et le nombre des cellules traitées ou non au léflunomide 10 μM sont alors suivis par coloration au bleu trypan et numération.

La détermination de la viabilité cellulaire et la numération des cellules permettent de voir que le nombre maximal de cellules vivantes est atteint à J4 pour les cellules témoins et les cellules traitées au léflunomide 10 μM (Figure RIII-4B). Dans la population témoin, le nombre de cellules vivantes diminue à partir de J5 du fait de l'épuisement du milieu de culture (Figure RIII-4B). Le traitement au léflunomide 10 μM maintient un nombre élevé de cellules vivantes alors que le milieu s'épuise de la même manière que dans les témoins (Figure RIII-1B).

Le léflunomide semble donc également favoriser la survie des cellules K562.

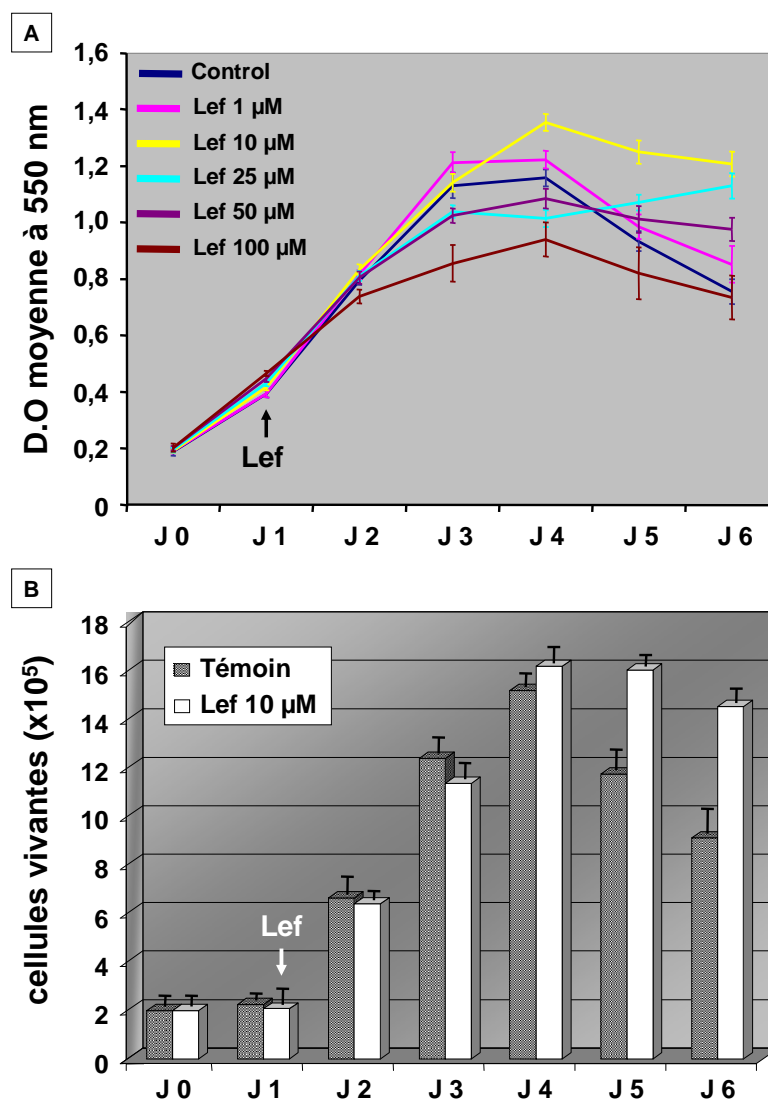


Figure RIII-4 : Effets du léflunomide sur la prolifération et la viabilité des cellules K562. Les cellules K562 sontensemencées à 10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération (J1), les cellules sont traitées ou non (témoin) au léflunomide (1-100 μ M) et cultivées pendant 5 jours sans changement de milieu. La prolifération des cellules est évaluée par le test au MTT (A). La viabilité et le nombre de cellules sont évalués après coloration au bleu trypan et numération sur lame de Mallassez des cellules traitées au léflunomide 10 μ M (B).

1.3. Prolifération et viabilité des cellules Meg-01

Les cellules Meg-01 sontensemencées à 2×10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération (J1), les cellules sont traitées ou non (témoin) par

une gamme de concentrations de léflunomide allant de 1 à 100 μM . La prolifération des cellules est alors suivie par le test au MTT.

Les effets du léflunomide sur la prolifération des cellules Meg-01 ne semblent pas être les mêmes que ceux affectant la prolifération des cellules érythroleucémiques HEL et K562.

En effet, sur les cellules Meg-01, seul l'effet anti-prolifératif des fortes doses de léflunomide est retrouvé. Les doses de 25, 50 et 100 μM induisent une inhibition de la prolifération des cellules Meg-01 après 48h (J3) et 72h (J4) de traitement (Figure RIII-5A). Toutefois en fin de traitement, le nombre de cellules semble le même quelque soit le traitement.

La concentration de 10 μM ne semble affecter ni la prolifération ni la survie des cellules Meg-01 (Figure RIII-5A). Toutefois, en fin de traitement (J6), il existe une différence significative entre les cellules témoins et les cellules traitées au léflunomide 10 μM . La chute du nombre de cellules est alors atténuée chez les cellules traitées (Figure RIII-5A).

Nous avons également évalué pour les cellules Meg-01 l'évolution de la viabilité des cellules cultivées en présence ou non de 10 μM de léflunomide. La viabilité et le nombre des cellules traitées ou non au léflunomide 10 μM sont alors suivis par coloration au bleu trypan et numération.

La détermination de la viabilité cellulaire et la numération des cellules permettent de voir que le nombre maximal de cellules vivantes est atteint à J4 pour les cellules témoins et les cellules traitées au léflunomide 10 μM (Figure RIII-5B). Par la suite, le nombre de cellules vivantes diminue du fait de l'épuisement du milieu de culture et ceci sans qu'il y ait de différence entre les cellules traitées au léflunomide et les cellules témoin. Toutefois, à J6, le nombre de cellules vivantes est significativement plus grand dans la population traitée au léflunomide 10 μM que dans la population témoin.

Le léflunomide semble donc favoriser la survie des cellules Meg-01 de manière très faible mais significative.

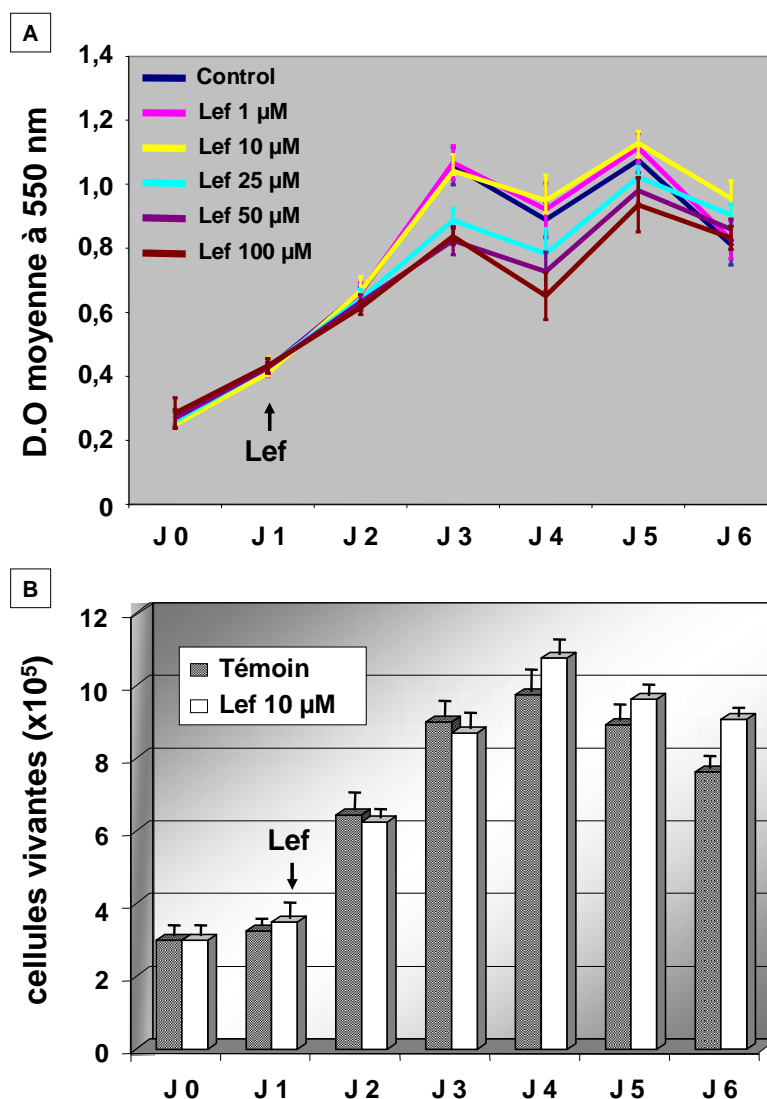


Figure RIII-5 : Effets du léflunomide sur la prolifération et la viabilité des cellules Meg-01. Les cellules Meg-01 sontensemencées à 2×10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération (J1), les cellules sont traitées ou non (témoin au léflunomide (1-100 μM) et cultivées pendant 5 jours sans changement de milieu. La prolifération des cellules est évaluée par le test au MTT (A). La viabilité et le nombre de cellules sont évalués après coloration au bleu trypan et numération sur lame de Mallassez des cellules traitées au léflunomide 10 μM (B).

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation cellulaire qui étaient activées ou inhibées après traitement au léflunomide 10 μM et qui pourraient être responsables de l'effet en faveur de la survie des cellules leucémiques.

2. Modulation de l'activation des MAPKs dans les cellules leucémiques traitées au léflunomide 10 μ M

2.1. Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules HEL

Après traitement des cellules HEL au léflunomide 10 μ M pendant 5 min, 20 min, 3h, 6h, 12h, 24h 48h et 96h, les quantités des formes phosphorylées de ERK, p38 et JNK sont quantifiées par des tests ELISA spécifiques.

Les résultats démontrent que le léflunomide induit une activation de la voie de ERK dès 5 min de traitement (Figure RIII-6A). L'activation de ERK induite par le léflunomide 10 μ M est transitoire puisqu'après 20 min de traitement, la quantité de ERK phosphorylée diminue à 3h et 6h (Figure RIII-6A). Par la suite, la phosphorylation de ERK augmente à nouveau à 12h et 24h de traitement avant de revenir à son niveau basal à 48h et de chuter fortement à 96h (Figure RIII-6A). Le traitement au PMA 10 nM pendant 20 min sert de témoin positif de l'activation de ERK (Figure RIII-6A).

Le traitement au léflunomide réduit significativement le taux de phosphorylation de p38 dans les cellules HEL. La phosphorylation de p38 diminue en effet dès 5 min après l'exposition au léflunomide 10 μ M et la phosphorylation de p38 reste ensuite en dessous de son niveau basal tout au long du traitement (Figure RIII-6B). Après 96h de traitement au léflunomide 10 μ M, on observe une chute de la phosphorylation de p38. Le traitement au sorbitol 300 mM pendant 30 min sert de témoin positif de l'activation de p38 (Figure RIII-6B).

Le traitement des cellules HEL par le léflunomide 10 μ M semble également réduire légèrement l'activation de JNK. La phosphorylation de JNK diminue significativement à partir de 3h d'exposition au léflunomide 10 μ M et la phosphorylation de JNK reste ensuite en dessous de son niveau basal tout au long du traitement (Figure RIII-6C). Le traitement au sorbitol 300 mM pendant 30 min sert de témoin positif de l'activation de JNK (Figure RIII-6C).

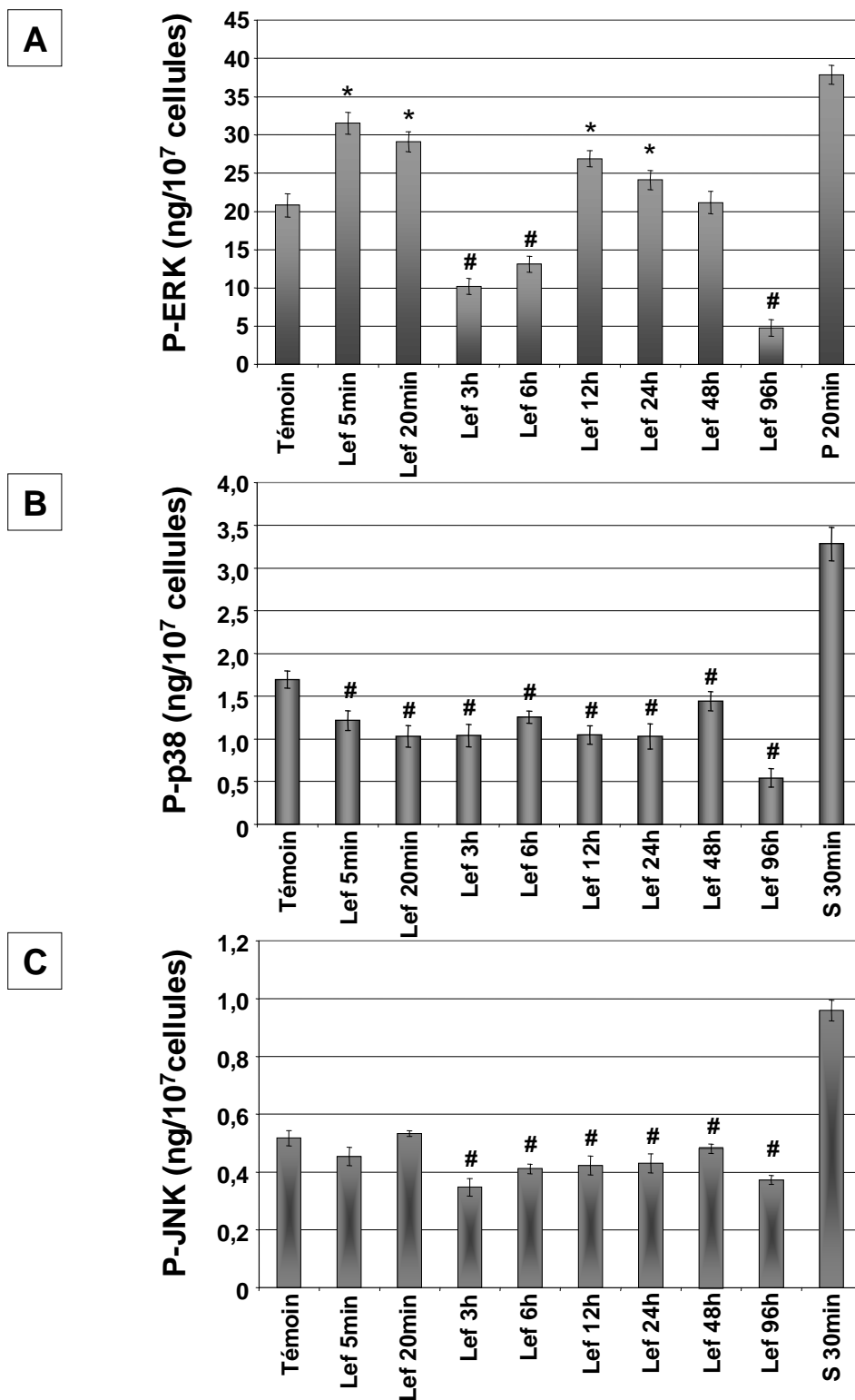


Figure RIII-6 : Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules HEL traitées au léflunomide 10 μ M. Après traitement des cellules HEL au léflunomide 10 μ M pendant 5 min, 20 min, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h et 96h, les quantités des formes phosphorylées de ERK, p38 et JNK sont quantifiées par des tests ELISA spécifiques. Le traitement au PMA 10 nM (P) pendant 20 min sert de témoin positif de l'activation de ERK et le traitement au sorbitol 300 mM (S) pendant 30 min sert de témoin positif de l'activation de p38 et JNK. (* augmentation significative par rapport au témoin, $p < 0,05$; # diminution significative par rapport au témoin, $p < 0,05$).

Nous avons ensuite vérifié si l'augmentation de la phosphorylation de ERK se produisait de manière homogène dans la population traitée ou bien si cette augmentation se produisait seulement dans certaines cellules. Nous avons évalué la phosphorylation de ERK dans les cellules HEL après fixation, perméabilisation des cellules et marquage de la forme phosphorylée de ERK par un anticorps spécifique couplé à un fluorochrome. Les cellules marquées sont passées en cytométrie en flux.

Les résultats démontrent que l'augmentation du niveau de phosphorylation de ERK se produit dans toutes les cellules traitées. On peut voir sur les cytogrammes de cytométrie en flux que le traitement au léflunomide 10 μM induit un glissement du pic des cellules vers la droite après 20 min et 24h de traitement mais pas à 6h. Ce glissement signifie une augmentation de l'intensité du marquage de phospho-ERK (Figure RIII-7). Ces résultats sont en accord avec ceux des dosages ELISA. De plus, comme le pic ne s'élargit pas et que le glissement est net, on peut en déduire que le léflunomide induit une augmentation de la phosphorylation de ERK qui se produit de manière homogène dans la population traitée (Figure RIII-7).

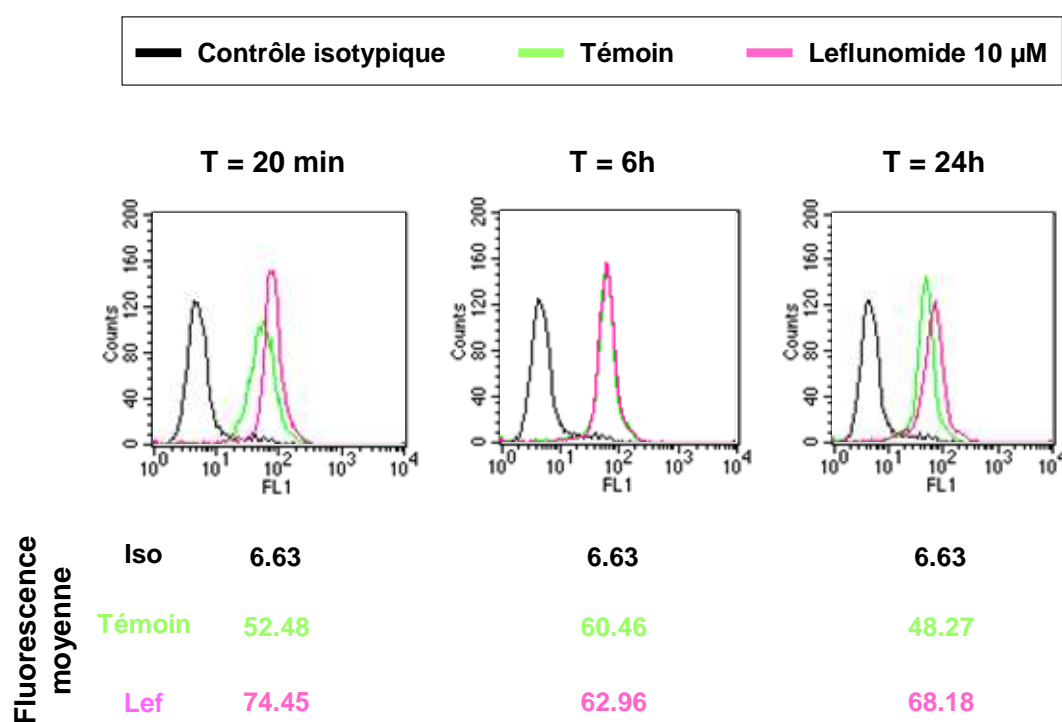


Figure RIII-7 : Modulation de l'intensité du marquage de phospho-ERK dans les cellules HEL traitées au léflunomide. Les cellules sont traitées au léflunomide 10 μM pendant 20 min, 6h, et 24h. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées au moyen d'un kit de fixation/perméabilisation facilitant les marquages intracellulaires. La phosphorylation de ERK est évaluée après marquage par un anticorps anti-phospho-ERK couplé à un fluorochrome et passage des cellules en cytométrie en flux.

2.2. Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules K562

Après traitement des cellules K562 au léflunomide 10 μ M pendant 5 min, 20 min, 3h, 6h, 12h, 24h 48h et 96h, les quantités des formes phosphorylées de ERK, p38 et JNK sont quantifiées par des tests ELISA spécifiques.

Les résultats démontrent que le léflunomide induit une activation de la voie de ERK dès 5 min de traitement (Figure RIII-8A). L'activation de ERK induite par le léflunomide 10 μ M est transitoire puisqu'après 20 min de traitement, la quantité de ERK phosphorylée diminue à 3h et 6h (Figure RIII-8A). Par la suite, la phosphorylation de ERK augmente à nouveau à 12h et 24h de traitement avant de revenir à son niveau basal à 48h et chute à 96h (Figure RIII-8A). Le traitement au PMA 10 nM pendant 20 min sert de témoin positif de l'activation de ERK (Figure RIII-8A).

Le traitement au léflunomide réduit significativement le taux de phosphorylation de p38 dans les cellules K562. La phosphorylation de p38 diminue en effet dès 5 min après l'exposition au léflunomide 10 μ M et la phosphorylation de p38 reste ensuite en dessous de son niveau basal tout au long du traitement (Figure RIII-8B). Après 96h de traitement au léflunomide 10 μ M, on observe une forte augmentation de la phosphorylation de p38. Le traitement au sorbitol 300 mM pendant 30 min sert de témoin positif de l'activation de p38 (Figure RIII-8B).

Le traitement des cellules K562 par le léflunomide 10 μ M semble également réduire légèrement l'activation de JNK. La phosphorylation de JNK diminue significativement à partir de 3h d'exposition au léflunomide 10 μ M et la phosphorylation de JNK reste ensuite en dessous de son niveau basal jusqu'à 96h de traitement où comme dans le cas de p38, on observe une forte augmentation de la phosphorylation de JNK (Figure RIII-8C). Le traitement au sorbitol 300 mM pendant 30 min sert de témoin positif de l'activation de JNK (Figure RIII-8C).

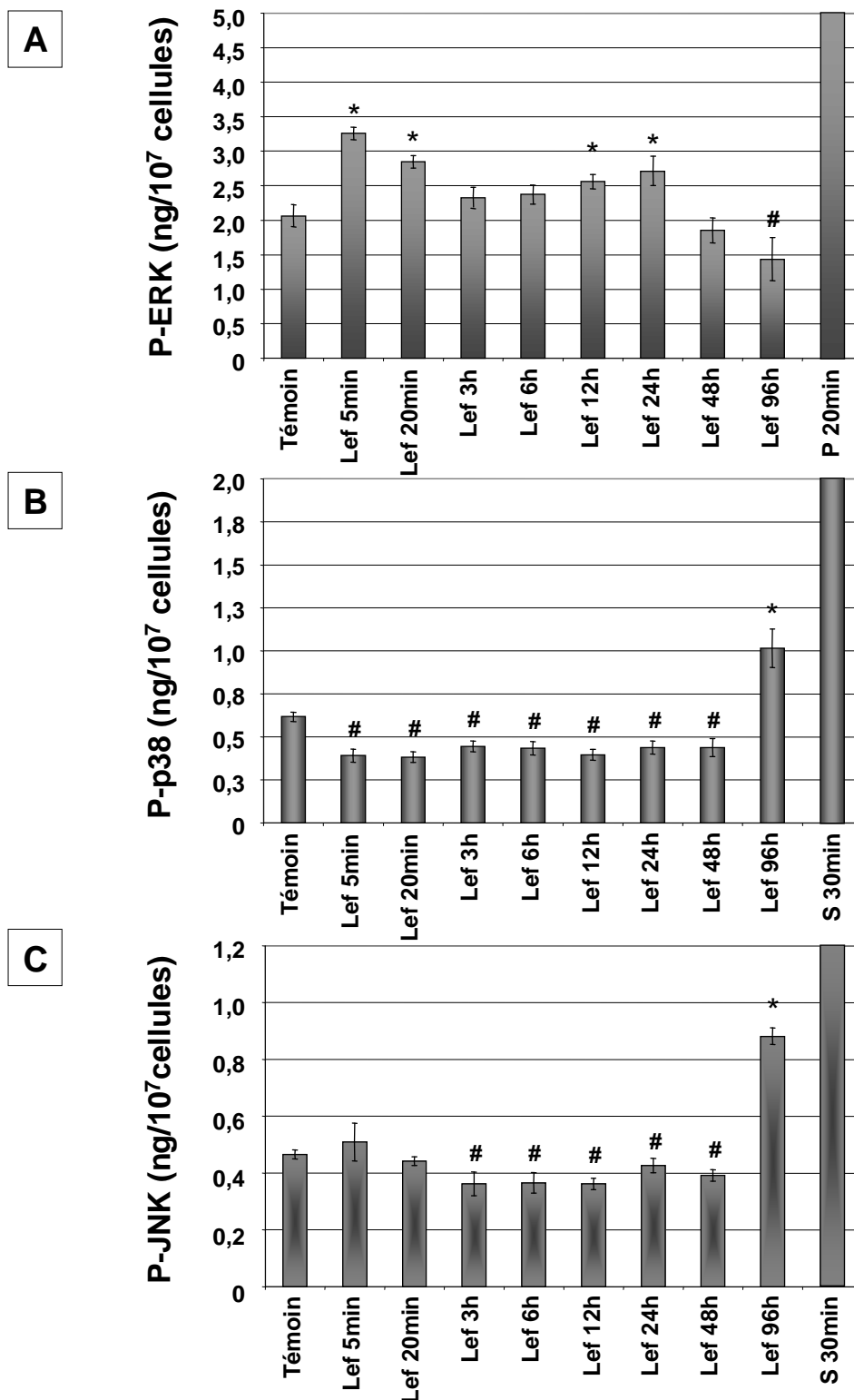


Figure RIII-8 : Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules K562 traitées au léflunomide 10 μ M. Après traitement des cellules K562 au léflunomide 10 μ M pendant 5 min, 20 min, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h et 96h, les quantités des formes phosphorylées de ERK, p38 et JNK sont quantifiées par des tests ELISA spécifiques. Le traitement au PMA 10 nM (P) pendant 20 min sert de témoin positif de l'activation de ERK et le traitement au sorbitol 300 mM (S) pendant 30 min sert de témoin positif de l'activation de p38 et JNK. (* augmentation significative par rapport au témoin, $p < 0,05$; # diminution significative par rapport au témoin, $p < 0,05$).

2.3. Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules Meg-01

Après traitement des cellules Meg-01 au léflunomide 10 μ M pendant 5 min, 20 min, 3h, 6h, 12h, 24h 48h et 96h, les quantités des formes phosphorylées de ERK, p38 et JNK sont quantifiées par des tests ELISA spécifiques.

Les résultats démontrent que le léflunomide ne modifie pas le niveau d'activation de la voie de ERK. Le taux de phosphorylation reste stable tout au long du traitement des cellules Meg-01, on observe seulement en toute fin de traitement (96h) une légère augmentation de la phosphorylation de ERK (Figure RIII-9A). Le traitement au PMA 10 nM pendant 20 min sert de témoin positif de l'activation de ERK (Figure RIII-9A).

Le traitement au léflunomide réduit de façon transitoire le taux de phosphorylation de p38 dans les cellules Meg-01. La phosphorylation de p38 diminue en effet dès 5 min après l'exposition au léflunomide 10 μ M et la phosphorylation de p38 reste ensuite en dessous de son niveau basal jusqu'à 6h de traitement (Figure RIII-9B). A partir de 12h de traitement au léflunomide 10 μ M, la phosphorylation de p38 diminue à nouveau et ceci jusqu'à la fin du traitement. Le traitement au sorbitol 300 mM pendant 30 min sert de témoin positif de l'activation de p38 (Figure RIII-9B).

Le traitement des cellules HEL par le léflunomide 10 μ M ne modifie pas le niveau d'activation de JNK. La phosphorylation de JNK reste stable et égale à son niveau basal tout au long du traitement (Figure RIII-9C). Le traitement au sorbitol 300 mM pendant 30 min sert de témoin positif de l'activation de JNK (Figure RIII-9C).

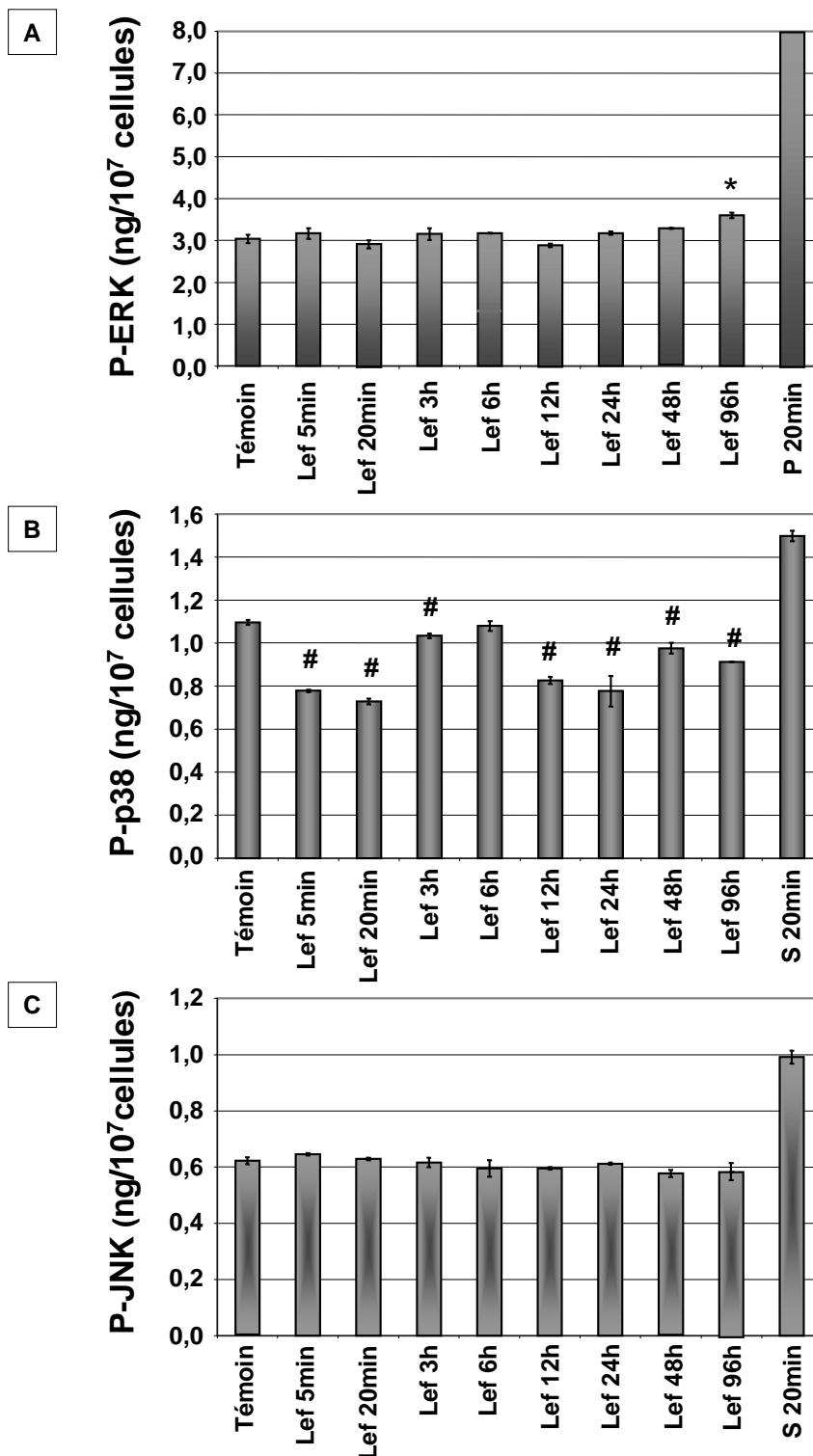


Figure RIII-9 : Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules Meg-01 traitées au léflunomide 10 μ M. Après traitement des cellules Meg-01 au léflunomide 10 μ M pendant 5 min, 20 min, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h et 96h, les quantités des formes phosphorylées de ERK, p38 et JNK sont quantifiées par des tests ELISA spécifiques. Le traitement au PMA 10 nM (P) pendant 20 min sert de témoin positif de l'activation de ERK et le traitement au sorbitol 300 mM (S) pendant 30 min sert de témoin positif de l'activation de p38 et JNK. (* augmentation significative par rapport au témoin, $p < 0,05$; # diminution significative par rapport au témoin, $p < 0,05$).

3. Effet du léflunomide sur l'activation du facteur de transcription NFκB

Le léflunomide à forte dose (100 μM) a été décrit comme un inhibiteur de l'activation de NFκB. Nous avons vérifié l'effet de la dose de 10 μM sur l'activation de NFκB dans les cellules érythroleucémiques HEL et K562. Les résultats concernant les cellules Meg-01 étant peu convaincants jusque là, les études menées par la suite ont été réalisées sur les lignées HEL et K562.

L'activation du facteur NFκB est évaluée après traitement au léflunomide 10 μM par des techniques de retard sur gel. Les cellules sont traitées au léflunomide 10 μM pendant 3h, 6h, 12h, 24h et 48h, puis on réalise une extraction des protéines nucléaires. Ces protéines nucléaires sont incubées en présence d'une sonde marquée à la digoxigénine, et la fixation de NFκB sur cette sonde est évaluée par analyse de retard sur gel.

Les résultats présentés figure RIII-10 démontrent que le léflunomide à 10 μM ne modifie pas le niveau d'activation de NFκB dans les cellules HEL (Figure RIII-10A) et K562 (Figure RIII-10B). Le Tumor Necrosis Factor α (TNFα) est un activateur connu de NFκB dans différents types cellulaires. Le TNFα nous a servi de témoin positif et l'on voit qu'il induit une légère augmentation de NFκB dans les cellules HEL (Figure RIII-10A) et K562 (Figure RIII-10B). Toutefois, cette augmentation est faible et ceci est probablement dû au fait que, dans les cellules leucémiques, il existe une forte activation constitutive de NFκB. Nous avons également vérifié la spécificité de notre expérimentation en incubant le mélange (protéines nucléaires – sonde marquée à la digoxigénine) avec une sonde non marquée en excès (compétition).

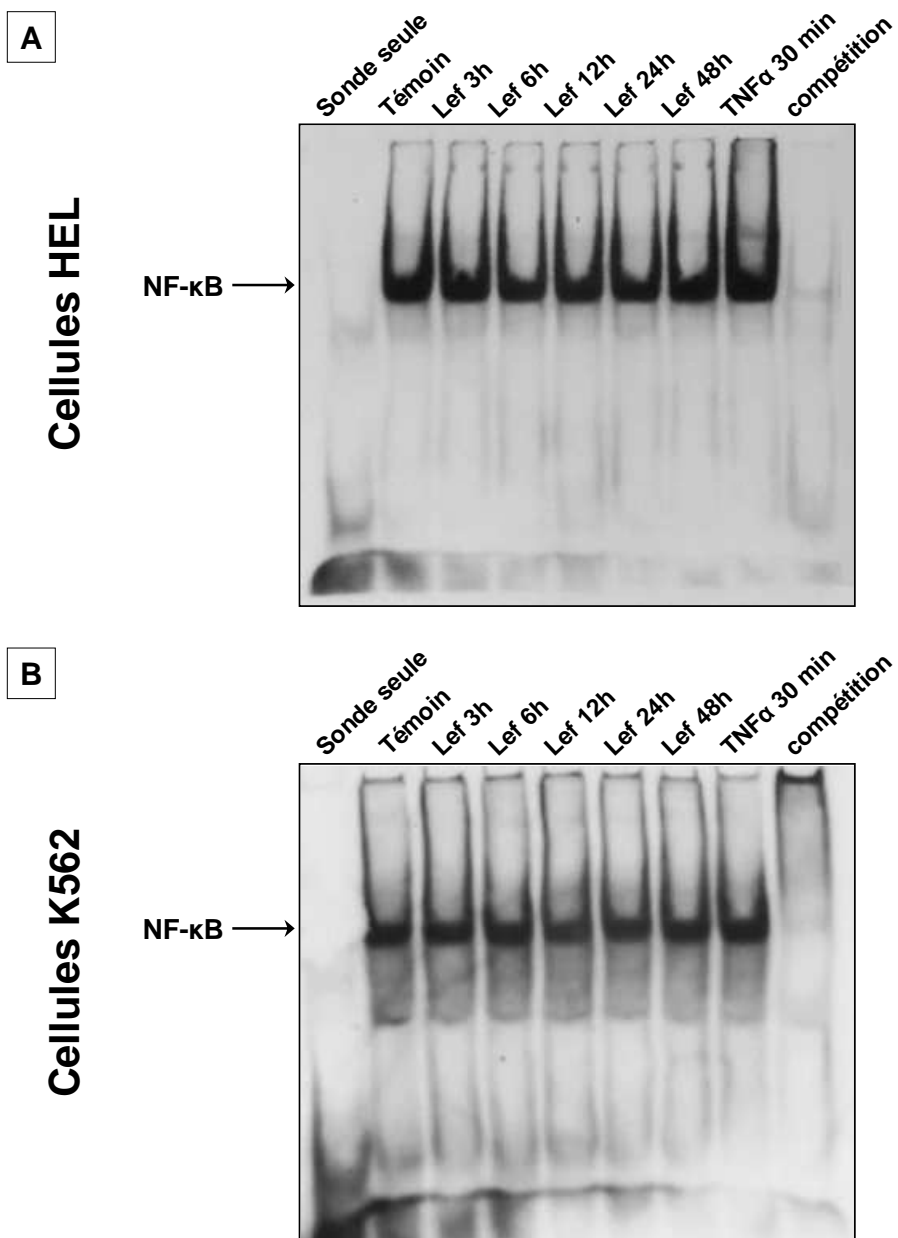


Figure RIII-10 : Effet du léflunomide sur l'activation du facteur NF κ B dans les cellules HEL et K562. Les cellules HEL et K562 ont été incubées avec du léflunomide 10 μ M pendant 3h, 6h, 12h, 24h et 48h. Après extraction des protéines nucléaires, on réalise une expérience de retard sur gel en incubant ces protéines avec une sonde spécifique de NF κ B marquée à la digoxigénine. Le traitement au TNF α 25 ng/ml pendant 30 min sert de témoin positif et l'incubation avec une sonde non marquée en excès permet de vérifier la spécificité de l'expérience.

4. Effet du léflunomide 10 μ M sur l'activation de la voie PI3K/Akt

Nous avons également évalué le niveau d'activation de la voie PI3K/Akt à la suite du traitement des cellules HEL et K562 par 10 μ M de léflunomide.

L'activation des isoformes Akt1, Akt2 et Akt3 résulte de leur phosphorylation par la protéine kinase PDK1 en réponse à la production de PIP₃ par la PI3K active. Il existe deux sites de phosphorylation, sur la sérine 473 et la thréonine 308.

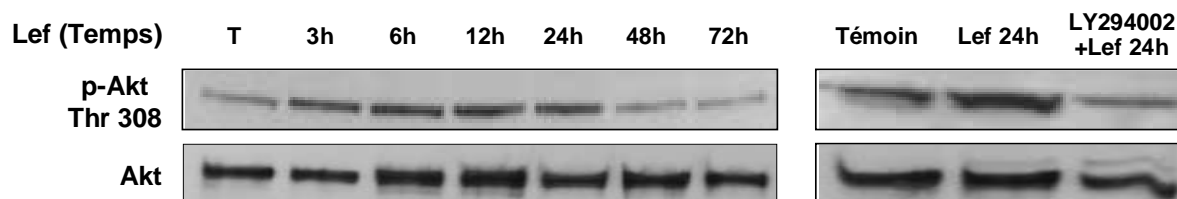
Nous avons étudié l'activation de Akt par western blot après traitement des cellules HEL et K562 au léflunomide 10 μ M pendant 3h, 6h, 12h, 24h, 48h et 72h. L'anticorps utilisé est spécifique des trois isoformes phosphorylées sur la Thr 308.

Dans les cellules HEL, le léflunomide induit une forte augmentation de la phosphorylation de Akt dès 3h de traitement (Figure RIII-11A). Cette activation de Akt se prolonge jusqu'à 24h de traitement (Figure RIII-11A). A partir de 48h de traitement au léflunomide, le taux de phosphorylation de ERK retrouve son niveau basal (Figure RIII-11A). L'inhibiteur de PI3K, le LY294002, utilisé à 10 μ M en prétraitement 2h avant le traitement au léflunomide, inhibe la phosphorylation de Akt induite par 24h d'exposition au léflunomide 10 μ M dans les cellules HEL (Figure RIII-11A).

De la même façon, le léflunomide 10 μ M induit dans les cellules K562 une forte augmentation de la phosphorylation de Akt dès 3h de traitement (Figure RIII-11B). Cette activation de Akt se prolonge jusqu'à 48h de traitement (Figure RIII-11B). Le taux de phosphorylation de ERK retrouve son niveau basal après 72h de traitement au léflunomide (Figure RIII-11B). L'inhibiteur de PI3K, le LY294002, utilisé à 10 μ M en prétraitement 2h avant le traitement au léflunomide, inhibe la phosphorylation de Akt induite par 24h d'exposition au léflunomide 10 μ M dans les cellules K562 (Figure RIII-11B).

A

Cellules HEL



B

Cellules K562

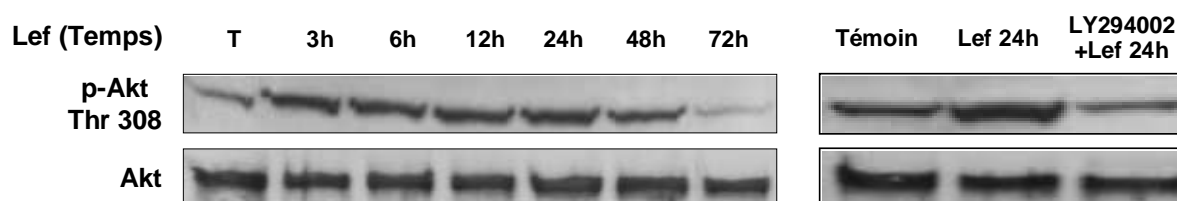


Figure RIII-11 : Activation de Akt dans les cellules HEL et K562 traitées au léflunomide 10 μ M. Les cellules HEL (A) et K562 (B) ont été traitées ou non au léflunomide 10 μ M pendant 3h, 6h, 12h, 24h, 48h et 72h. Les cellules HEL ont également été prétraitées ou non avec l'inhibiteur de PI3K, le LY294002 à 10 μ M, pendant 2h avant d'être traitées ou non au léflunomide 10 μ M pendant 24h. Le taux de phosphorylation de Akt est estimé par western blot réalisé avec un anticorps dirigé contre la forme de Akt phosphorylée en thréonine 308 et rapporté au taux d'expression de la forme totale de Akt.

Nous avons vu que le léflunomide 10 μ M favorisait la survie des cellules HEL et K562 cultivées dans des conditions d'épuisement du milieu de culture. Nous avons également vu que le léflunomide à 10 μ M induisait l'activation des voies de ERK et PI3K/Akt qui sont impliquées dans la survie cellulaire. Le léflunomide à 10 μ M réduit également le taux basal d'activation des voies de p38 et JNK qui sont plutôt orientées vers la transduction du message apoptotique.

Cet ensemble de faits semble indiquer que le léflunomide favorise la survie des cellules érythroleucémiques de manière générale. Nous avons donc étudié l'effet d'un prétraitement au léflunomide sur l'induction de l'apoptose par des agents anti-cancéreux connus dans les cellules HEL et K562.

5. Diminution par 10 μM de léflunomide de l'apoptose induite par divers agents pro-apoptotiques

Cette étude a été réalisée sur des cellules K562 et HEL prétraitées au léflunomide 10 μM pendant 24h puis soumises à divers agents pro-apoptotiques tels que l'étoposide, la staurosporine, la déprivation en sérum, l'arsenic trioxyde et l'hydroxyurée.

5.1. Etude des effets du léflunomide sur l'apoptose induite dans les cellules K562

Les cellules K562 ont étéensemencées à une densité de 10^5 cellules/ml de milieu de culture et prétraitées ou non au léflunomide 10 μM pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées à l'étoposide 10 μM pendant 24h, ou à la staurosporine 1 μM pendant 24h, ou déprivées en sérum par remplacement du milieu par du milieu sans sérum de veau foetal pendant 96h, ou encore traitées à l'arsenic trioxyde 5 μM pendant 24h ou à l'hydroxyurée 5 mM pendant 24h. La génération de fragments oligonucléosomiques est alors évaluée par un test ELISA.

Le traitement à l'étoposide pendant 24h induit un fort taux de fragmentation de l'ADN dans les cellules K562 (Figure RIII-12). Le prétraitement au léflunomide 10 μM réduit l'apoptose induite par l'étoposide 10 μM d'un facteur 1,5 (Figure RIII-12).

Le prétraitement au léflunomide permet également de réduire le taux de fragmentation de l'ADN dans les cellules déprivées en sérum pendant 96h ou traitées à l'arsenic trioxyde 5 μM pendant 24h (1,3 et 1,4 fois moins respectivement de fragmentation de l'ADN ; Figure RIII-12).

Paradoxalement, on constate que le prétraitement au léflunomide 10 μM augmente la fragmentation de l'ADN des cellules K562 traitées à la staurosporine 1 μM pendant 24h (+1,6 fois ; Figure RIII-12).

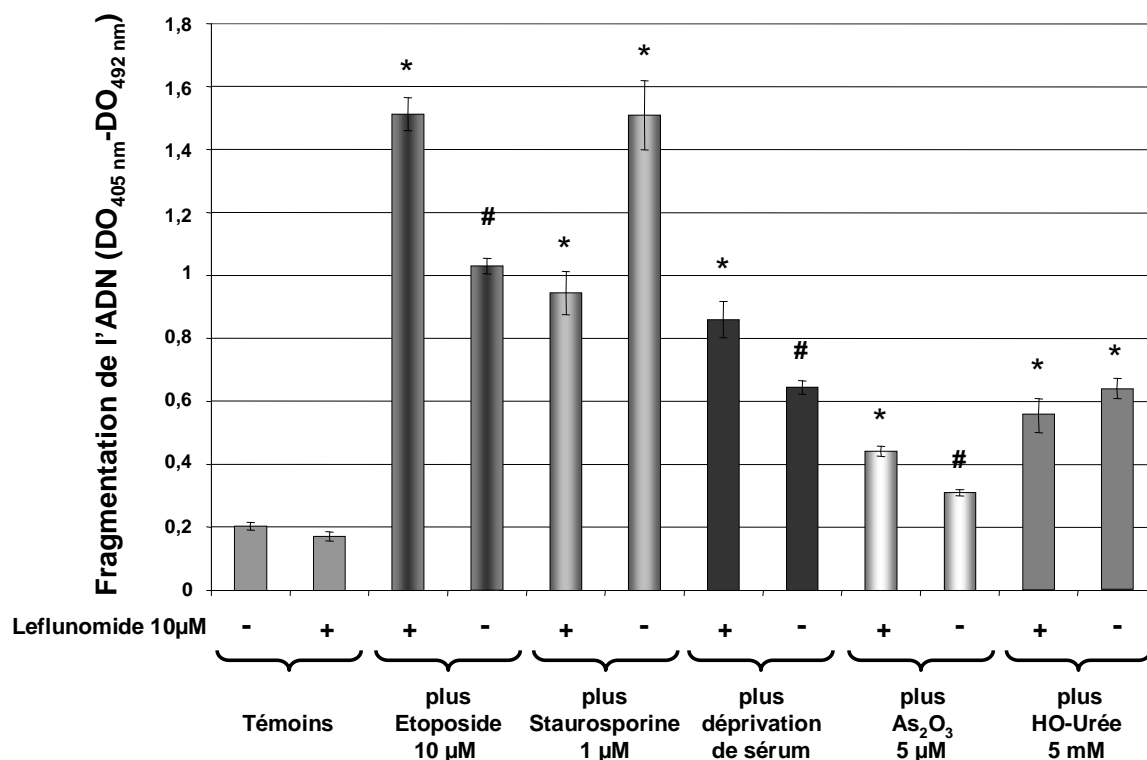


Figure RIII-12 : Effets du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules K562 traitées avec divers agents pro-apoptotiques. La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA après traitement des cellules à l'étoposide 10 μ M pendant 24h, ou à la staurosporine 1 μ M pendant 24h, ou par déprivation en sérum par remplacement du milieu pendant 96h, ou traitement à l'arsenic trioxyde 5 μ M pendant 24h ou à l'hydroxyurée 5 mM pendant 24h. L'effet du léflunomide est évalué sur les cellules qui ont été prétraitées au léflunomide 10 μ M pendant 24h puis traitées par les divers agents pro-apoptotiques. (* augmentation significative par rapport au témoin, $p < 0,05$; # diminution significative par rapport à l'inducteur d'apoptose, $p < 0,05$).

5.2. Etude des effets du léflunomide 10 μ M sur l'apoptose induite dans les cellules HEL

Les cellules HEL ont étéensemencées à une densité de 10^5 cellules/ml de milieu de culture et prétraitées ou non au léflunomide 10 μ M pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées de manière identique aux cellules K562 par l'étoposide, ou la staurosporine, ou l'arsenic trioxyde, ou l'hydroxyurée, ou bien déprivées en sérum. L'étude de la fragmentation de l'ADN a permis d'évaluer l'effet

du léflunomide sur l'apoptose induite par les agents pro-apoptotiques. L'étude de l'exposition de la phosphatidylsérine a permis de confirmer que cet effet était généralisable aux différentes étapes de l'apoptose et pas seulement à l'étape finale de la fragmentation de l'ADN.

Le rôle de l'activation de la voie PI3K/Akt dans l'effet protecteur du léflunomide vis-à-vis de la fragmentation de l'ADN et de l'activation de la caspase-3 induites par les agents pro-apoptotiques a également été étudié.

a. Effets du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN induite après traitement avec les agents pro-apoptotiques

Les cellules HEL ont été prétraitées ou non au léflunomide 10 μ M puis traitées par les différents agents pro-apoptotiques comme décrit précédemment. La génération de fragments oligonucléosomiques est alors évaluée par un test ELISA.

Le traitement à l'étoposide pendant 24h induit un fort taux de fragmentation de l'ADN dans les cellules HEL (Figure RIII-13). Le prétraitement au léflunomide 10 μ M réduit l'apoptose induite par l'étoposide 10 μ M d'un facteur 1,4 (Figure RIII-13).

Le prétraitement au léflunomide permet également de réduire le taux de fragmentation de l'ADN dans les cellules traitées à la staurosporine 1 μ M pendant 24h ou déprivées en sérum pendant 96h (1,5 et 1,8 fois moins respectivement de fragmentation de l'ADN ; Figure RIII-13).

Le prétraitement au léflunomide est par contre sans effet sur le taux de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HEL traitées à l'arsenic trioxyde 5 μ M ou à l'hydroxyurée 5 mM (Figure RIII-13).

Pour le reste de l'étude, nous avons donc choisi de travailler avec l'étoposide, la staurosporine et la déprivation en sérum comme agents inducteurs.

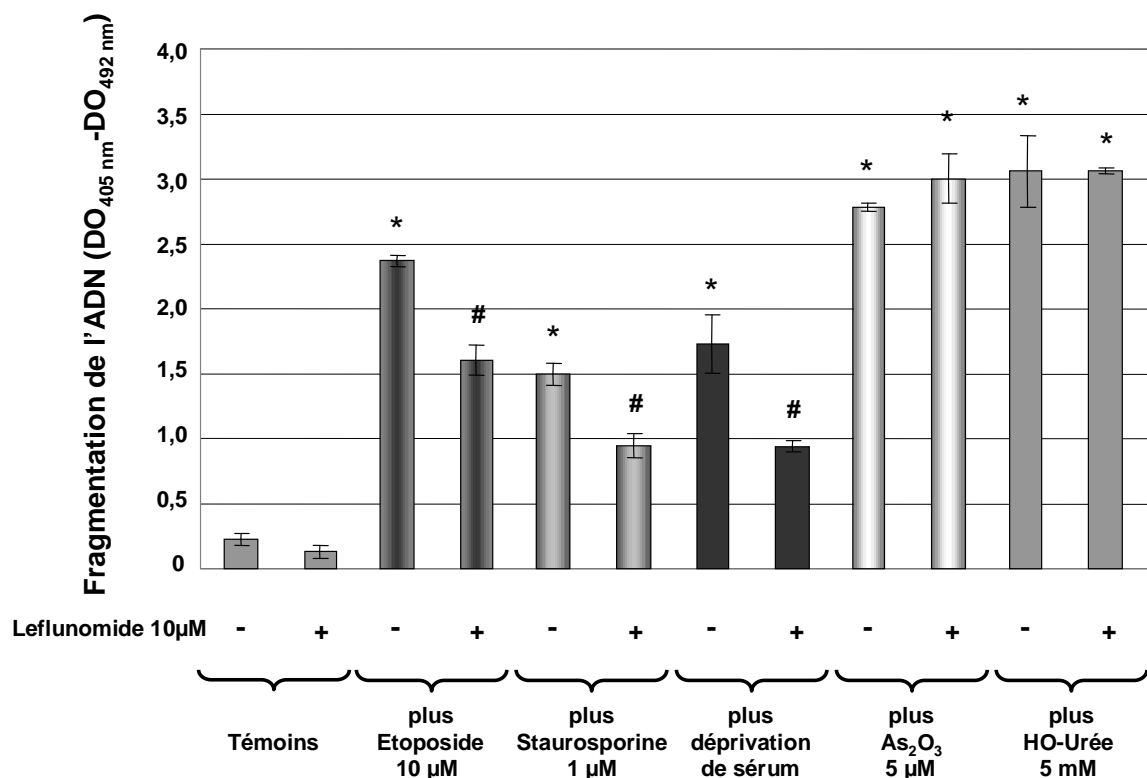


Figure RIII-13 : Effets du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules HEL traitées avec divers agents pro-apoptotiques. La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA après traitement des cellules HEL comme décrit figure RIII-12 pour les cellules K562. L'effet du léflunomide est évalué sur les cellules qui ont été prétraitées au léflunomide 10 µM pendant 24h puis traitées par les divers agents pro-apoptotiques. (* augmentation significative par rapport au témoin, $p < 0,05$; # diminution significative par rapport à l'inducteur d'apoptose, $p < 0,05$).

b. Effets du léflunomide sur l'exposition de la phosphatidylsérine après traitement avec divers inducteurs de l'apoptose

L'exposition de la phosphatidylsérine au niveau de la membrane externe des cellules est une réponse caractéristique des cellules à l'induction de l'apoptose.

Les cellules HEL ont été prétraitées ou non au léflunomide 10 µM puis traitées par l'étoposide ou la staurosporine, ou déprivées en sérum. L'exposition de la phosphatidylsérine est évaluée après marquage des cellules HEL à l'annexine V et la

viabilité des cellules est estimée par marquage à l'iodure de propidium (IP). Les cellules ainsi marquées sont ensuite passées en cytométrie en flux.

Les cellules HEL ont tout d'abord été traitées au léflunomide 10 μM pendant 24h afin de voir si le léflunomide avait un effet propre sur l'exposition de la phosphatidylsérine. Les pourcentages de cellules annexine V positives étant très proches entre les cellules témoins et les cellules traitées au léflunomide, on en déduit que le léflunomide ne perturbe pas l'exposition constitutive de la phosphatidylsérine.

Le prétraitement au léflunomide 10 μM 24h avant le traitement à l'étoposide 10 μM réduit l'exposition de la phosphatidylsérine. En effet, après traitement à l'étoposide 10 μM pendant 24h, 50,8% des cellules sont annexine V positives (11,6% de cellules mortes IP positives et annexine V positives + 39,2% de cellules en cours d'apoptose IP négatives et annexine V positives) (Figure RIII-14). Ce pourcentage tombe à 27,5% (8,7% + 18,8%) dans la population prétraitée au léflunomide 10 μM 24h avant le traitement à l'étoposide (Figure RIII-14).

Dans les cellules traitées à la staurosporine 1 μM pendant 24h, le prétraitement au léflunomide 10 μM 24h avant le traitement à la staurosporine réduit le pourcentage de cellules annexine V positives de 35,5% à 25,3% (Figure RIII-14).

Le taux de cellules annexine V positives dans les cellules déprivées en sérum pendant 96h chute de 58,1% à 24,4% après prétraitement au léflunomide 10 μM pendant 24h (Figure RIII-14).

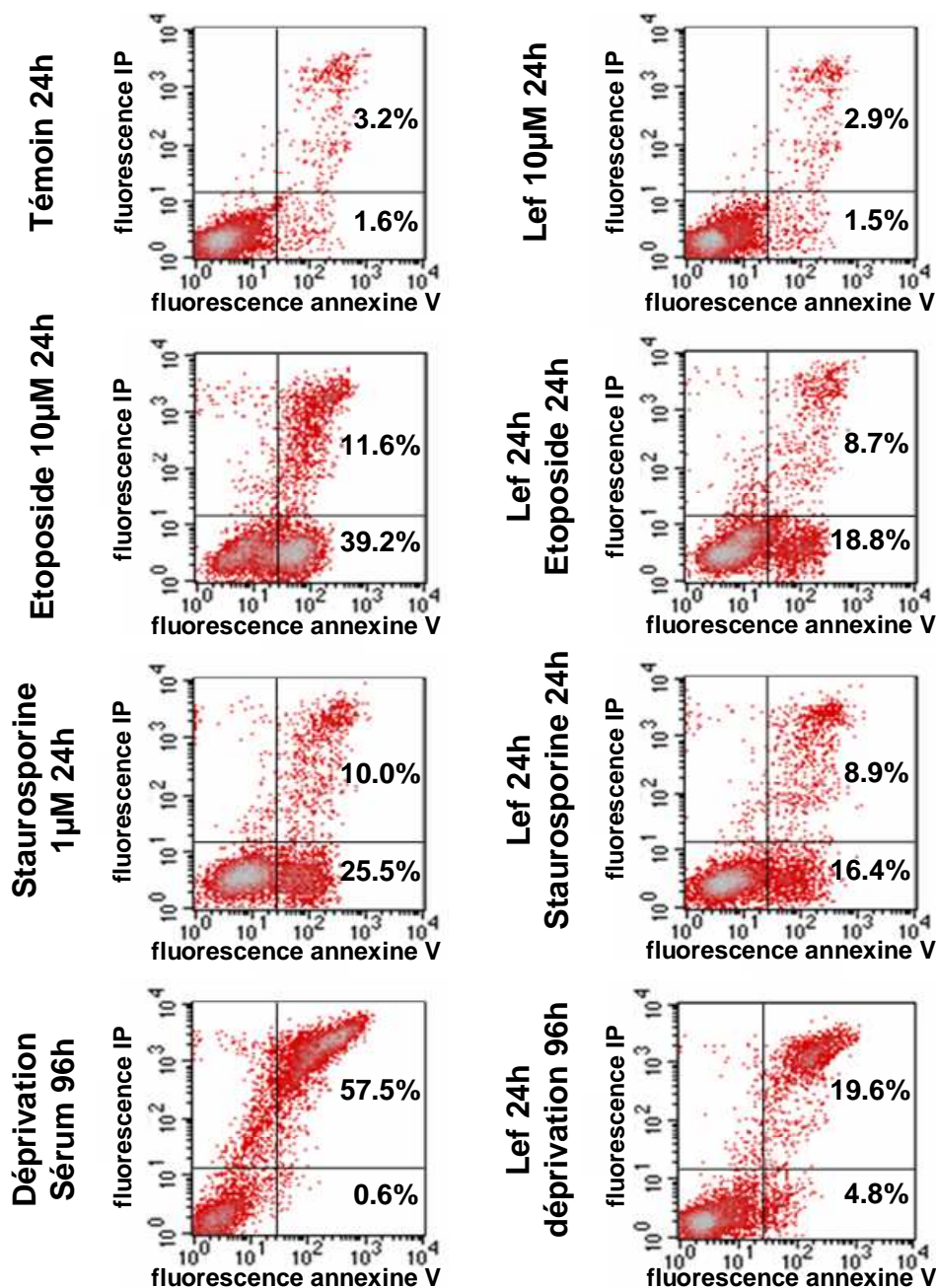


Figure RIII-14 : Effets du léflunomide sur l'exposition de la phosphatidylsérine induite par des agents pro-apoptotiques. Les cellules HEL ont été prétraitées ou non au léflunomide 10 µM pendant 24h puis traitées à l'étoposide 10 µM pendant 24h ou à la staurosporine 1 µM 24h ou déprivées en sérum pendant 96h. L'exposition de la phosphatidylsérine est évaluée après marquage avec de l'annexine V couplée à un fluorochrome. Les cellules sont ensuite marquées à l'iodure de propidium afin d'évaluer la viabilité et passées en cytométrie en flux.

c. Rôle de la voie PI3K/Akt dans l'effet protecteur du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN après traitement des cellules HEL avec des inducteurs de l'apoptose

Les cellules HEL ont été prétraitées ou non au léflunomide 10 μ M puis traitées par les différents agents pro-apoptotiques comme décrit précédemment. De plus, un prétraitement avec un inhibiteur de PI3K, le LY294002 à 10 μ M, a aussi été effectué 2h avant le prétraitement au léflunomide 10 μ M, ou 2h avant le traitement avec les inducteurs de l'apoptose. La génération de fragments oligonucléosomiques est alors évaluée par un test ELISA.

Les résultats démontrent qu'un prétraitement au LY294002 à 10 μ M inhibe l'effet protecteur du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN induite par l'étoposide, la staurosporine, ou la déprivation en sérum (Figure RIII-15). En effet, alors que le prétraitement au léflunomide réduit la fragmentation de l'ADN induite par les différents agents, le prétraitement au LY294002 10 μ M, restaure le taux de fragmentation initial de l'apoptose (Figure RIII-15).

Nous avons également vérifié que le LY294002 10 μ M n'augmentait pas la fragmentation de l'ADN induite par les agents pro-apoptotiques. Les résultats démontrent que le taux de fragmentation de l'ADN est comparable entre les cellules traitées avec les inducteurs seuls et les cellules prétraitées au LY294002 10 μ M et traitées avec les inducteurs de mort (Figure RIII-15).

La restauration du taux de fragmentation de l'ADN par le LY294002 10 μ M dans les conditions (LY294002 10 μ M + léflunomide 10 μ M + inducteur) est donc bien dû à son effet d'inhibition de la voie PI3K/Akt.

On en déduit que l'effet protecteur du léflunomide vis-à-vis de la fragmentation de l'ADN passe par l'induction de la voie PI3K/Akt.

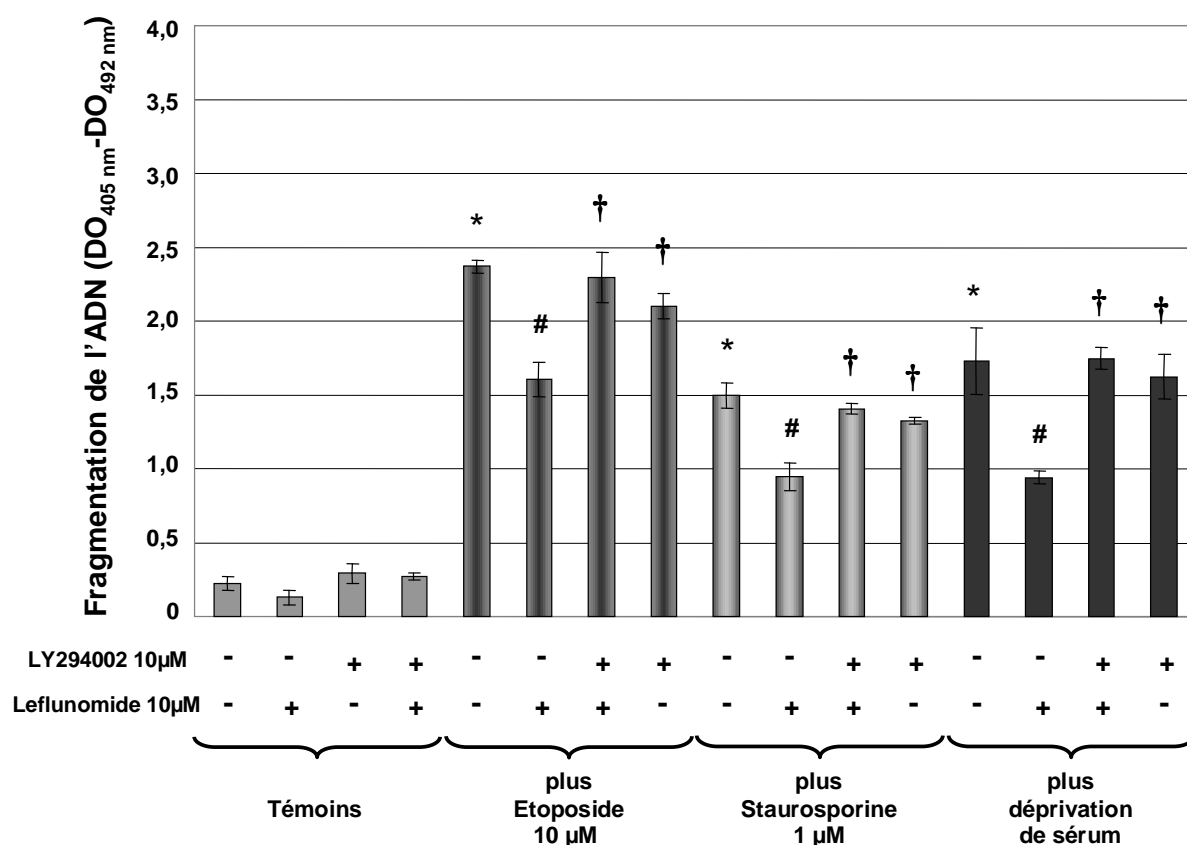


Figure RIII-15 : Rôle de la voie PI3K/Akt dans l'effet protecteur du léflunomide.

La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA après traitement des cellules HEL comme décrit figure RIII-12 pour les cellules K562. L'effet du léflunomide est évalué sur les cellules qui ont été prétraitées au léflunomide 10 µM pendant 24h puis traitées par les divers agents pro-apoptotiques. L'effet de l'inhibition de la voie PI3K/Akt est évalué sur les cellules prétraitées au LY294002 10 µM avant le prétraitement au léflunomide ou avant le traitement avec les inducteurs de mort. (* augmentation significative par rapport au témoin, $p < 0,05$; # diminution significative par rapport à l'inducteur de mort, $p < 0,05$; † augmentation significative par rapport à la condition léflunomide + inducteur de mort).

d. Effet protecteur du léflunomide vis-à-vis de l'activation de la caspase-3. Rôle de la voie PI3K/Akt

Les cellules HEL ont été prétraitées ou non avec le LY294002 puis prétraitées ou non au léflunomide et enfin exposées aux agents pro-apoptotiques. L'activation de la caspase-3 est alors évaluée par un test ELISA spécifique des formes actives de la caspase-3.

Les résultats démontrent que les inducteurs de mort activent très fortement la quantité de caspase-3 active dans les cellules HEL. Il y a en effet une augmentation de la quantité de caspase-3 active d'un facteur +59 après traitement à l'étoposide 10 μM 24h, +8 après traitement à la staurosporine 1 μM 24h et +7 après une déprivation en sérum pendant 96h (Figure RIII-16).

Le prétraitement au léflunomide réduit cette activation de la caspase-3 d'un facteur 2 après traitement à l'étoposide, d'un facteur 2,6 après traitement à la staurosporine, et d'un facteur 1,9 après une déprivation de sérum (Figure RIII-16).

Le prétraitement au LY294002 10 μM inhibe l'effet protecteur du léflunomide et restaure partiellement l'activation de la caspase-3 induite par l'étoposide et la staurosporine. Toutefois, le prétraitement au LY294002 ne modifie pas l'effet protecteur du léflunomide par rapport à l'activation de la caspase-3 après déprivation de sérum (Figure RIII-16).

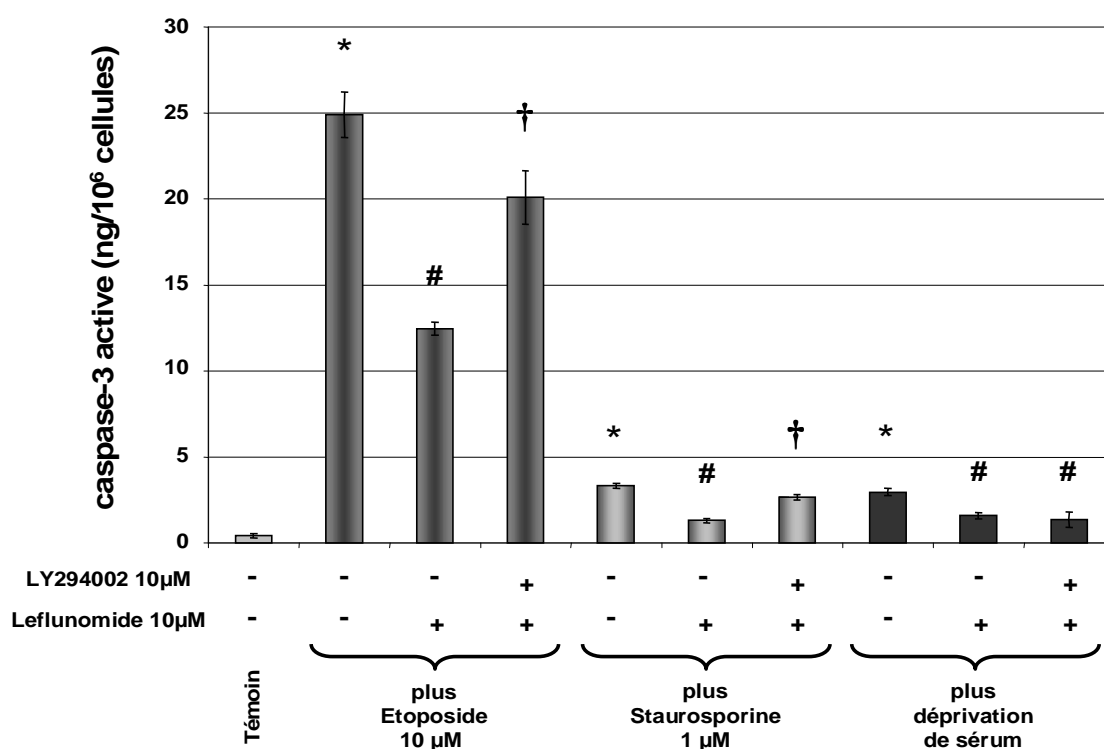


Figure RIII-16 : Effet protecteur du léflunomide par rapport à l'activation de la caspase-3. Rôle de la voie PI3K/Akt. Les cellules HEL sont traitées comme décrit figure RIII-15, toutefois la condition inducteur + LY294002 n'a pas été testée. La quantité de caspase-3 active est estimée par un kit spécifique. (* augmentation significative par rapport au témoin, $p < 0,05$; # diminution significative par rapport à l'inducteur de mort, $p < 0,05$; † augmentation significative par rapport à la condition léflunomide + inducteur de mort).

Nous avons vu que le prétraitement au léflunomide des cellules HEL réduisait l'apoptose induite par différents agents anti-cancéreux connus.

Nous nous sommes donc intéressés à l'effet du léflunomide sur l'induction de l'apoptose par la diosgénine 40 μ M.

e. Effets du léflunomide vis-à-vis de l'apoptose induite par la diosgénine 40 μ M

Les cellules HEL ont été prétraitées ou non au léflunomide 10 μ M pendant 24h avant d'être traitées ou non par la diosgénine 40 μ M pendant 12h et 24h.

Les résultats indiquent que le léflunomide réduit faiblement la fragmentation de l'ADN induite par la diosgénine 40 μ M à 12h et n'a pas d'effet à 24h (Figure RIII-17). L'activation de la voie PI3K/Akt ne suffit donc pas à réduire l'apoptose induite par 40 μ M de diosgénine.

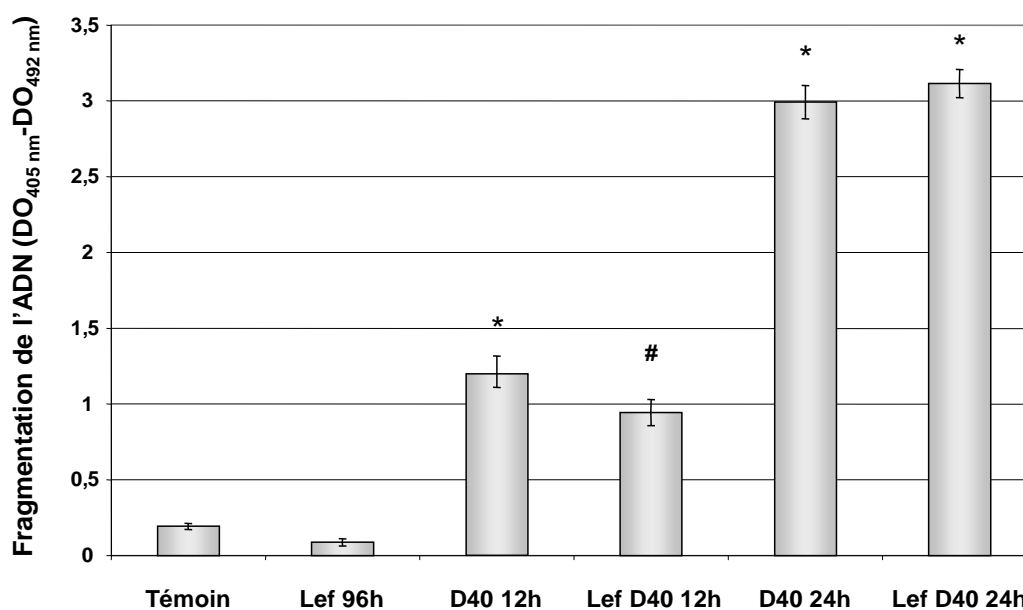


Figure RIII-17 : Effet du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN induite par la diosgénine 40 μ M. Les cellules HEL ont été prétraitées ou non au léflunomide 10 μ M pendant 24h avant d'être traitées ou non par la diosgénine 40 μ M pendant 12h et 24h. La fragmentation de l'ADN a été évaluée par un kit ELISA. (* augmentation significative par rapport au témoin, $p < 0,05$; # diminution significative par rapport à la diosgénine seule, $p < 0,05$).

DISCUSSION

Deux stratégies principales de lutte contre la prolifération des cellules cancéreuses se sont développées au cours des dernières années. La première de ces stratégies est d'activer dans les cellules cancéreuses le processus de mort cellulaire programmée ou apoptose. De nombreuses molécules naturelles ou synthétiques ont démontré leur pouvoir pro-apoptotique. Plus rares sont les molécules capables de réamorcer les processus de différenciation cellulaire qui ont été arrêtés au cours de la transformation cancéreuse. Cette deuxième stratégie présente l'avantage d'être moins toxique pour l'organisme.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux pouvoirs pro-apoptotiques et pro-différenciants d'un stéroïde végétal, la diosgénine, sur la lignée érythroleucémique humaine HEL.

Par ailleurs, nous avons étudié les effets du léflunomide, un inhibiteur de l'activité de la cyclooxygénase-2, sur l'apoptose induite par la diosgénine et par différents agents anti-cancéreux.

I- EFFETS DE LA DIOSGÉNINE SUR LES CELLULES HEL

Apoptose et diosgénine

De précédentes études réalisées au sein du laboratoire avaient démontré que la diosgénine utilisée à une concentration de 40 μ M induisait l'apoptose dans des lignées cancéreuses issues d'ostéosarcome, de mélanome et de laryngocarcinome et dans des cultures primaires de synoviocytes (Moalic S et al. 2001, Corbière C et al. 2004b, Liagre B et al. 2004).

Nous avons étudié l'effet de la diosgénine à 40 μ M sur la prolifération des cellules HEL et démontré que 40 μ M de diosgénine inhibait la prolifération des cellules HEL de plus de 90% par rapport aux cellules témoins après 24h de traitement.

Cette inhibition pouvait provenir d'un blocage des cellules dans le cycle cellulaire et/ou de l'induction de la mort cellulaire dans les cellules traitées.

En effet, des travaux précédents menés sur les cellules 1547 d'ostéosarcome humain avaient démontré une accumulation en G_0/G_1 et l'induction de l'apoptose des cellules traitées à la diosgénine (Moalic S et al. 2001).

Dans les cellules HEL, nous avons démontré que le traitement à la diosgénine 40 μM induit dès 12h de traitement une accumulation des cellules au niveau de la transition G_2/M du cycle cellulaire.

Parmi les régulateurs du cycle cellulaire, les inhibiteurs de CDK, les CKI, sont très souvent impliqués dans les blocages du cycle (Morgan DO 1995). La protéine p21 est un CKI de la famille Cip/Kip qui est activée par divers facteurs physiologiques et par différents traitements chimiques et qui est particulièrement impliquée dans les arrêts du cycle cellulaire en phase G_0/G_1 et au cours de la transition G_2/M (Deng C et al. 1995, Bunz F et al. 1998, Taylor WR et Stark GR 2001). La protéine p21 est donc l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire et sa transcription peut être activée en réponse à divers stress sous la dépendance de p53 qui agit alors comme facteur de transcription (Levine AJ 1997, Kim TK 1997). Ainsi, diverses perturbations (lésions de l'ADN, hypoxie ou surexpression d'oncogènes) augmentent les niveaux cellulaires de p53 (Levine AJ 1997), et augmentent également son activité, principalement par sa phosphorylation sur la sérine 15 et sur la sérine 20 (Shieh SY et al. 1999).

Nous avons démontré que la diosgénine à 40 μM induisait une augmentation de l'expression de la protéine p21 qui était corrélée à l'induction de l'accumulation des cellules en G_2/M . L'étude de l'expression et de l'état de phosphorylation de p53 (sérine 15) nous a permis de démontrer que l'augmentation d'expression de p21 ne dépendait pas de p53 (Léger D et al. 2004b).

Ainsi l'activation de p53 n'est pas requise au cours de l'arrêt du cycle en G_2/M induit par la diosgénine. L'induction d'un arrêt du cycle en G_2/M de manière p53-indépendante a par ailleurs été décrite dans différents types cellulaires traités par diverses molécules d'origine naturelle ou synthétique (Park JH et al. 2001, Takagaki N et al. 2005, Dvory-Sobol H et al. 2006).

L'étude de la distribution des cellules traitées à la diosgénine 40 μM dans les différentes phases du cycle cellulaire a également permis de mettre en évidence l'apparition d'une population de cellules dites sub- G_1 . Ces cellules ayant un contenu en ADN réduit ont été identifiées comme des cellules apoptotiques (Lizard G et al. 1997).

Nous nous sommes donc intéressés à l'induction de l'apoptose dans les cellules HEL.

Au cours de la dernière décennie, le rôle fondamental de la mitochondrie dans l'induction de l'apoptose a été largement étudié (Kroemer G et Reed JC 2000, Zamzami N et Kroemer G 2001, Ravagnan L et al. 2002). Il est apparu qu'une chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) était un événement précoce de l'apoptose (Zamzami N et al. 1995).

Nous avons démontré que le traitement par 40 μ M de diosgénine provoquait une chute rapide du $\Delta\Psi_m$ dans les cellules HEL (Léger D et al. 2004b). De plus, il avait été démontré précédemment dans le laboratoire que la diosgénine induisait une chute du $\Delta\Psi_m$ dans les lignées Hep-2 et 1547 (laryngocarcinome et ostéosarcome) mais pas dans la lignée M4-Beu (mélanome) (Corbière C et al. 2004b).

Plusieurs hypothèses concernant l'origine de la chute du $\Delta\Psi_m$ dans les cellules apoptotiques ont été avancées. Toutes convergent vers une perturbation de la membrane externe mitochondriale impliquant la formation de canaux affectant les membranes externe et interne ou la perte de l'intégrité membranaire mitochondriale (Ly JD et al. 2003). Ces perturbations conduisent à la libération de molécules apoptogéniques présentes dans l'espace intermembranaire mitochondrial.

D'autre part, la mitochondrie est également un lieu de stockage du calcium. La mitochondrie importe le calcium cytosolique au moyen d'uniporteurs qui utilisent pour leur fonctionnement l'énergie créée par l'existence du potentiel membranaire mitochondrial (Crompton M 1999). Les perturbations du fonctionnement mitochondrial au cours de l'apoptose conduisent à la libération du calcium séquestré dans la mitochondrie et participent à l'augmentation du taux de calcium cytosolique (McConkey DJ et Orrenius S 1997).

Au cours du traitement à la diosgénine, nous avons observé une augmentation importante du taux de calcium intracellulaire. Cette augmentation était visible dès 12h de traitement. C'est également à ce temps que la chute du $\Delta\Psi_m$ touche le plus grand nombre de cellules.

Le rôle du calcium dans le déroulement de l'apoptose a été largement étudié (Jiang S et al. 1994, Berridge MJ et al. 1998). Il semble qu'une élévation du taux de calcium intracellulaire à des concentrations supramicromolaires soit observée au cours du déclenchement de l'exécution de l'apoptose en réponse à divers traitements (Tombal B et al. 2002).

Dans le cas du traitement des cellules HEL à la diosgénine 40 μM , la concentration de calcium intracellulaire atteint une valeur supramicromolaire entre 12h et 24h de traitement.

Le taux de calcium intracellulaire régule l'activité d'effecteurs de l'apoptose tels que les calpaïnes et les caspases (McConkey DJ et Orrenius S 1997, Orrenius S et al. 2003).

Les protéases de la famille des caspases sont très généralement activées au cours de l'apoptose (Cohen GM 1997). On distingue les caspases initiatrices telles que les caspases-8 et -9 activées au cours de l'induction de l'apoptose, et les caspases effectrices, principalement représentées par la caspase-3 qui est activée au cours de la phase d'exécution de l'apoptose (Cohen GM 1997, Porter AG et Janicke RU 1999).

Nous avons démontré que la caspase-3 était activée dès 12h au cours du traitement des cellules HEL par la diosgénine 40 μM . Cette activation de caspase-3 avait également été observée dans les lignées 1547, Hep-2 et M4Beu (Corbière C et al. 2004b).

L'activation de la caspase-3 conduit au clivage de nombreux substrats cellulaires dont la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) (Soldani C et Scovassi AI 2002), les lamines, les histones H1 ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans la survie et la mort des cellules (Widmann C et al. 1998).

Dans les cellules HEL, la diosgénine à 40 μM induit un clivage de la PARP dont la cinétique est identique à celle de l'activation de la caspase-3 (Léger D et al. 2004b). Le clivage de PARP est également provoqué sous diosgénine dans les lignées Hep-2 et M4Beu mais pas dans la lignée 1547 (Corbière C et al. 2004b).

De plus, la caspase-3 active également en fin d'apoptose des endonucléases qui vont cliver l'ADN en fragments oligonucléosomiques (Samejima K et al. 2001). Cette fragmentation de l'ADN est caractéristique de cellules apoptotiques et la mesure de la génération de fragments oligonucléosomiques permet d'apprécier le pouvoir apoptogène des traitements.

La diosgénine à 40 μM induit un fort taux de fragmentation de l'ADN dans les cellules HEL et ceci dès 24h de traitement.

Ainsi les résultats présentés jusqu'alors ont démontré que la diosgénine à 40 μM était un puissant inducteur de l'apoptose dans la lignée HEL (Léger D et al. 2004b).

Par ailleurs, nous avons également étudié l'effet de la dose de 10 μM de diosgénine sur les cellules HEL. Il avait été précédemment démontré dans le laboratoire que la diosgénine induisait la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL. Cette différenciation était alors caractérisée par une augmentation de la complexité nucléaire et par une augmentation de l'expression de la glycoprotéine Ib (GpIb), un marqueur de différenciation mégacaryocytaire (Beneytout JL et al. 1995).

Différenciation et diosgénine

Au cours de notre étude, nous avons confirmé que la diosgénine à 10 μM induisait une inhibition de la prolifération des cellules HEL et une augmentation de leur taille. Nous avons ensuite étudié les caractéristiques des cellules différenciées par 10 μM de diosgénine.

La différenciation mégacaryocytaire est un processus physiologique caractérisé par une augmentation progressive du contenu en ADN des cellules (Ravid K et al. 2002) et par l'acquisition de marqueurs de différenciation tels que les marqueurs membranaires CD41, CD61, GpV et GpIX (Lepage A et al. 2000). L'augmentation du contenu en ADN dans les mégacaryocytes se fait par un processus d'endomitose qui aboutit à la polyploïdisation des cellules. Ainsi, les mégacaryocytes matures ont des contenus en ADN allant de 8N à 128N chromosomes, avec une médiane à 16N chromosomes (Ravid K et al. 2002).

Nous avons étudié l'effet de la diosgénine à 10 μM sur le contenu en ADN des cellules HEL. Nos résultats démontrent que la diosgénine induit la polyploïdisation des cellules HEL. En effet, le traitement par 10 μM de diosgénine induit une augmentation progressive du contenu en ADN des cellules, allant jusqu'à 64N chromosomes (Léger D et al. 2006a). Toutefois, il est à noter que la ploïdie des cellules HEL reste dans les limites physiologiques puisqu'elle ne dépasse pas 128N en fin de traitement à la diosgénine.

La polyploïdisation des cellules en cours de différenciation mégacaryocytaire résulte d'un processus appelé endomitose. L'endomitose correspond à une mitose incomplète (Vitrat N et al. 1998), dont la régulation fait principalement intervenir des régulateurs de la phase G1 du cycle cellulaire, telles que les cyclines de type D (Wang Z et al. 1995, Zimmet JM et al. 1997, Sun S et al. 2001).

En effet, l'expression des cyclines D3 principalement et D1 est augmentée durant les phénomènes de polyploïdisation induits par la TPO ou par le PMA (Ravid K et al. 2002, Matsumura I et al. 2000). De plus, l'expression de la cycline D3 est

essentielle à la mégacaryocytopoïèse et la cycline D1 peut également stimuler la polyploïdisation des mégacaryocytes, même si son rôle semble moins crucial que celui de la cycline D3 (Wang Z et al. 1995, Sun S et al. 2001).

Nous avons montré que le traitement des cellules HEL par 10 μ M de diosgénine induisait une augmentation d'expression de la cycline D3 en début de traitement, puis alors que l'expression de la cycline D3 revient à son niveau basal, nous observons une augmentation de l'expression de la cycline D1. L'augmentation de l'expression des cyclines de type D semble participer à la polyploïdisation des cellules HEL traitées par 10 μ M de diosgénine.

Par ailleurs, une augmentation de l'expression de la protéine p21 a également été impliquée dans le processus de polyploïdisation. En effet, il a été démontré que p21 était fortement exprimée dans les mégacaryocytes polyploïdes (Taniguchi T et al. 1999). De plus, l'induction d'une différenciation mégacaryocytaire par la TPO ou par le PMA dans les lignées leucémiques CMK et UT7 augmente l'expression de p21 (Kikuchi J et al. 1997, Matsumura I et al. 1997).

Dans notre étude, le traitement à la diosgénine 10 μ M induit une augmentation transitoire de p21. En fin de traitement, l'expression de p21 retourne à un niveau basal puis en dessous de ce niveau. Ceci suggère que la protéine p21 participe à l'initiation de la polyploïdisation des cellules HEL traitées à la diosgénine 10 μ M mais qu'elle n'est pas le seul facteur responsable de ce processus.

D'autres travaux ont en effet démontré que des souris invalidées pour le gène de p21 ne présentaient pas de défaut dans leur numération plaquettaire ou dans la ploïdie de leurs mégacaryocytes (Deng C et al. 1995, Baccini V et al. 2001). D'autre part, la surexpression de p21 induit une diminution de la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques mais n'induit pas de modification de leur maturation (Albanese P et al. 2002). Toutefois, une étude précise du rôle de p21 au cours de l'endomitose semble indiquer qu'une forte expression de p21 dans les mégacaryocytes ayant atteint une ploïdie importante permet de sortir du cycle endomitotique et de poursuivre la maturation cytoplasmique (Baccini V et al. 2001).

Ainsi, p21 participe vraisemblablement à l'initiation de la polyploïdisation en réponse à des stimuli tels que la TPO, les esters de phorbol (PMA) ou la diosgénine, et la poursuite de l'endomitose semble être sous le contrôle des cyclines de type D.

Diosgénine et marqueurs de différenciation

La maturation mégacaryocytaire se traduit également par l'expression de marqueurs de surface spécifiques de la lignée mégacaryocytaire et qui seront conservés sur les plaquettes. Le marqueur CD41 apparaît précocement au stade de progéniteur mégacaryocytaire et sera conservé jusqu'au stade des plaquettes. Les marqueurs membranaires qui vont ensuite apparaître à la surface du mégacaryocyte constitueront des complexes ayant des fonctions de récepteurs qui seront conservés sur les plaquettes. L'apparition progressive de ces marqueurs témoigne de l'avancement de la maturation du mégacaryocyte (Lepage A et al. 2000). Le marqueur CD61 (GpIIIa) apparaît après le CD41 et forme un complexe avec ce dernier. Le complexe CD41-CD61 (GpIIb-IIIa) constitue un récepteur pour les protéines adhésives, le fibrinogène, la fibronectine, le facteur von Willebrand et la vitronectine. La glycoprotéine Ib (GpIb ou CD42b) apparaît aussitôt après et forme un complexe avec la GpIX qui apparaît simultanément. Lorsque la GpV apparaît ensuite, elle se complexe avec GpIb-GpIX et ce nouveau complexe (GpIb-V-IX) appelé CD42 constitue un récepteur fonctionnel au facteur von Willebrand d'agrégation plaquettaire (Lepage A et al. 2000, Sébahoun G 2005). La sélectine-P ou CD62 apparaît également en fin de différenciation (Schick PK et al. 1993) et sera par la suite exposée à la surface des granules α plaquettaires et à la surface des plaquettes activées.

Les cellules HEL expriment à la fois des marqueurs érythrocytaires tels que la GpA et des marqueurs mégacaryocytaires tels que le CD41 (Papayannopoulou T et al. 1983). Le traitement par 10 μ M de diosgénine induit une augmentation de l'expression membranaire du CD41 et une forte diminution de l'expression de la glycophorine A (GpA) à la surface des cellules HEL (Léger D et al. 2006c). La diosgénine réduit donc fortement le phénotype érythrocytaire et augmente le phénotype mégacaryocytaire. De plus, nous avons montré que la diosgénine à 10 μ M induisait également une activation de la transcription des gènes des marqueurs de différenciation mégacaryocytaires CD41, CD61, CD62, GpV et GpIX. Cette augmentation de la transcription se produit principalement en fin de traitement et est forte pour les gènes CD61, CD62 et surtout GpV.

Nous avons donc montré que la diosgénine induisait la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL en activant un processus de polyploïdisation et en induisant l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation qui sont le reflet de l'état de maturation membranaire des mégacaryocytes.

Diosgénine et maturation mégacaryocytaire

Les mégacaryocytes vont également développer au cours de leur maturation des réseaux de membranes de démarcation puis les mégacaryocytes matures vont se fragmenter et libérer les plaquettes. Le processus de formation des plaquettes au sein des mégacaryocytes présente certaines caractéristiques rappelant celles de l'apoptose. Un processus apoptotique particulier et spécialisé pourrait mener à la libération des plaquettes. Des phénomènes apoptotiques ont été décrits dans les mégacaryocytes (Radley JM et Haller CJ 1983) avec une prévalence dans les mégacaryocytes matures par rapport aux cellules non mûres (Zauli G et al. 1997, Falcieri E et al. 2000). De plus, un certain nombre de facteurs, proapoptotiques et antiapoptotiques, ont été identifiés dans les mégacaryocytes (Kaluzhny Y et Ravid K 2004). Les protéines inhibitrices de l'apoptose telles que Bcl-2 et Bcl-xL (Boise LH et al. 1993) sont exprimées précocement dans les mégacaryocytes, mais Bcl-2 est absent des plaquettes sanguines, et Bcl-xL est absente dans les mégacaryocytes sénescents (Sanz C et al. 2001). Quand ces deux facteurs sont surexprimés dans les mégacaryocytes, ils empêchent également la formation des proplaquettes (de Botton S et al. 2002, Kaluzhny Y et al. 2002).

Nous avons montré que Bcl-xL était exprimée de manière importante dans les cellules HEL. Le traitement à la diosgénine 10 μ M réduit l'expression de Bcl-xL à partir de 48h de traitement, et cette expression continue de décroître progressivement jusqu'à la fin du traitement. Le niveau d'expression de Bcl-xL suit un profil inverse de celui des marqueurs de différenciation et Bcl-xL est pratiquement absent en fin de traitement dans les cellules HEL différenciées par 10 μ M de diosgénine (Léger D et al. 2006c).

Les effecteurs de l'apoptose comme les caspases sont également exprimés dans les mégacaryocytes. De plus, l'activation des caspases a été impliquée dans les processus de formation et de libération des plaquettes à partir des mégacaryocytes matures (de Botton S et al. 2002, Clarke MC et al. 2003).

En effet, il a été démontré que la caspase-3 était activée de manière précoce au cours de la maturation mégacaryocytaire. Cette activation est très localisée, répartie à différents endroits du cytoplasme et ne conduit pas à la fragmentation des mégacaryocytes. De plus, l'activation de la caspase-3 s'est révélée essentielle à la production des plaquettes puisque l'inhibition de caspase-3 bloque la formation des proplaquettes (de Botton S et al. 2002). Certains auteurs proposent également qu'en fin de maturation, au moment de la libération des plaquettes, l'activation de la caspase-3 passe d'une localisation compartimentalisée à une localisation plus

diffuse et participe alors à la fragmentation du mégacaryocyte (de Botton S et al. 2002, Gordge MP 2005).

Dans notre étude, nous avons observé une activation biphasique de la caspase-3 dans les cellules HEL traitées à la diosgénine 10 μ M. Une première activation se produit au bout de 48h de traitement. Cette activation est de forte intensité et ne conduit pas à la fragmentation des cellules. La quantité de caspase-3 active diminue ensuite jusqu'à 96h de traitement à la diosgénine 10 μ M avant d'augmenter à nouveau de manière progressive en fin de traitement. A ce moment, la forte activité de la caspase-3 corrèle avec la fragmentation des cellules différenciées à la diosgénine (Léger D et al. 2006c).

Le profil d'activation de la caspase-3 dans les cellules HEL traitées à la diosgénine suit donc le profil d'activation observé dans les mégacaryocytes en cours de maturation puis libérant leurs plaquettes. Toutefois, nous n'avons pas déterminé dans notre étude si la première activation de caspase-3 observée était compartimentalisée, ou si l'utilisation d'un inhibiteur de caspase bloquait la fragmentation des cellules différenciées à la diosgénine.

Par ailleurs, De Botton et al. (2002) ont également démontré que l'activation de la caspase-3 dans les mégacaryocytes était couplée à un clivage de PARP. Nous avons effectué la même observation dans les cellules différenciées à la diosgénine où le clivage de PARP suit la cinétique d'activation de caspase-3 (Léger D et al. 2006c).

Afin de vérifier si les cellules HEL différenciées à la diosgénine libéraient des plaquettes fonctionnelles en se fragmentant, nous avons recueilli les fragments produits en fin de traitement. Nous avons montré que ces fragments n'étaient pas capables de s'agréger en réponse à une stimulation par l'ADP. De plus, nos observations en microscopie électronique ont révélé que bien que ces fragments présentent une structure générale proche de celles des plaquettes, ils ne possèdent pas de granules de sécrétion qui sont caractéristiques des plaquettes fonctionnelles (Schmitt A et al. 2001). Toutefois, à ce jour, il n'a pas été démontré que la différenciation de cellules leucémiques par des inducteurs autres que la TPO permettait d'obtenir la production de plaquettes fonctionnelles.

Ainsi, nous avons démontré qu'en fonction de la dose utilisée, la diosgénine induisait deux processus différents. D'une part, à une dose de 40 μ M, la diosgénine induit l'apoptose des cellules HEL. D'autre part, à une dose de 10 μ M, la diosgénine induit la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL.

A ce stade de la discussion, deux points sont intéressants à préciser.

Le premier point concerne l'activation de p21. En effet, les deux doses de diosgénine activent p21. L'activation de p21 dans les cellules traitées à la diosgénine 40 μM conduit à une accumulation des cellules en phase G2/M, c'est-à-dire à une augmentation du pourcentage de cellules à 4N chromosomes après 24h de traitement.

Par ailleurs, l'activation de p21 au cours du traitement par 10 μM de diosgénine semble participer à la polyploïdisation des cellules HEL, c'est-à-dire à une augmentation progressive de leur contenu en ADN.

Il serait intéressant de vérifier si une inhibition du processus apoptotique, par l'utilisation d'inhibiteur de caspases par exemple, permettrait d'induire une polyploïdisation des cellules HEL traitées par 40 μM de diosgénine. Ceci pourrait suggérer que la diosgénine présente avant tout un effet pro-différenciant sur les cellules HEL, et que l'utilisation d'une dose trop forte masque cet effet en activant le processus apoptotique.

Une autre question soulevée par ces deux effets de la diosgénine est celle de la fragmentation finale des cellules HEL différenciées par 10 μM de diosgénine. Cette fragmentation intervient-elle parce que le processus de différenciation est arrivé à son terme, ou bien est-ce l'effet pro-apoptotique de la diosgénine qui conduit à la fragmentation.

Des expériences de « wash-out », c'est-à-dire des expériences dans lesquelles la diosgénine est retirée après une courte induction (24h), et l'étude des caractéristiques du processus de différenciation induit au cours de ces expériences nous ont permis de vérifier si la fragmentation des cellules est due à la présence de diosgénine dans le milieu, ou si elle est propre à la différenciation induite (voir p244).

Compte tenu des réponses différentes des cellules HEL en fonction de la dose de diosgénine utilisée, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des voies de transduction du signal qui étaient modulées au cours de l'apoptose et de la différenciation.

Apoptose, différenciation et MAPK

Nous avons ainsi étudié la modulation de l'activation des MAPK en réponse aux traitements par 40 μM et 10 μM de diosgénine. En effet, les MAPK participent à la régulation de phénomènes aussi divers que la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Chang L et Karin M 2001). Les MAPK se divisent en trois sous-familles nommées ERK, JNK et p38 (Johnson GL et Lapadat R 2002). Nous avons étudié la modulation de ces trois voies en réponse à un traitement à la diosgénine 40 μM . Cette concentration inhibe de manière précoce la voie de ERK. Cette inhibition s'accroît au cours du temps jusqu'à être complète en fin de traitement. Par ailleurs, la diosgénine à 40 μM active de manière transitoire les voies de p38 et JNK dans les cellules HEL (Liagre B et al. 2005). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, de nombreux travaux tendent à montrer que les voies de ERK d'une part, et de p38 et JNK d'autre part, ont des effets opposés au cours de l'induction de l'apoptose (Xia Z et al. 1995). La voie de ERK semble en effet stimuler la prolifération des cellules et notamment des cellules hématopoïétiques (Hoyle PE et al. 2000). De plus, l'inhibition de la voie de ERK est également impliquée dans l'induction de la mort des cellules leucémiques par différents agents chimiothérapeutiques (Morgan MA et al. 2001, Yu C et al. 2001).

A l'inverse, de nombreux agents chimiothérapeutiques induisent l'activation des voies p38 et JNK dans les cellules leucémiques. La voie de JNK est ainsi activée au cours des traitements à la daunorubicine (Laurent G et Jaffrezou JP 2001), à la staurosporine et à l'ARA-C (Sampath D et al. 2006), à l'arsenic trioxyde (Davison K et al. 2004), ou encore par des inhibiteurs des histones désacétylases (Yu C et al. 2003). La voie de p38 est également activée au cours de l'apoptose des cellules leucémiques induite par divers traitements (Iwama K et al. 2001, Verma A et al. 2002, Miyoshi N et al. 2004).

La diosgénine utilisée à la dose de 40 μM agit donc comme la plupart des agents chimiothérapeutiques en inhibant la voie de ERK et en activant les voies de p38 et JNK.

L'activation de la voie de p38 par la diosgénine a également été démontrée dans la stimulation de la production du « vascular endothelial growth factor » (VEGF) par les ostéoblastes en culture (Yen ML et al. 2005). Toutefois, il est à noter que dans cette étude sur les effets pro-angiogéniques de la diosgénine sur des cultures d'ostéoblastes, la dose utilisée est de 2 μM et que les cellules utilisées et les effets de cette dose sont différents de ceux évoqués dans notre étude, c'est-à-dire

l'induction d'un processus apoptotique par 40 μM de diosgénine dans des cellules érythroleucémiques (Yen ML et al. 2005).

Utilisée à la dose de 10 μM , la diosgénine induit une forte activation de ERK. Cette activation se produit dès 5 minutes de traitement et est soutenue dans le temps jusqu'à 12h de traitement. De plus, nous avons montré que l'activation de ERK était nécessaire à la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL traitées à la diosgénine 10 μM . En effet, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'activation de ERK, le U0126 (Favata MF et al. 1998), bloque la polyploïdisation des cellules HEL exposées à la dose différenciante de diosgénine (Léger D et al. 2006c).

Par ailleurs, le rôle crucial de l'activation de la voie de ERK a été démontré dans la différenciation mégacaryocytaire des cellules hématopoïétiques et leucémiques. La TPO induit une activation rapide et soutenue de ERK dans les mégacaryocytes et dans les lignées leucémiques exprimant le récepteur à la TPO (Rouyez MC et al. 1997, Rojnuckarin P et al. 1999, Majka M et al. 2002). De plus, le PMA qui est également un inducteur de la différenciation mégacaryocytaire des cellules leucémiques active également de manière rapide la voie de ERK (Whalen AM et al. 1997, Racke FK et al. 1997).

Au cours du traitement différenciant à la diosgénine 10 μM , nous avons observé une inhibition transitoire de JNK et une inhibition forte et soutenue de p38. Il est intéressant de noter que le profil d'inhibition de p38 semble être le reflet inverse du profil d'activation de ERK dans les cellules HEL traitées par 10 μM de diosgénine (Léger D et al. 2006c).

Ceci est à rapprocher de la diminution de l'expression de la glycophorine A, c'est-à-dire de la diminution du phénotype érythrocytaire, dans les cellules HEL différenciées à la diosgénine. En effet, le rôle inverse des voies de p38 et de ERK a également été observé au cours de la différenciation érythrocytaire. L'activation de p38 et, dans une moindre mesure, celle de JNK, ont été décrites comme étant nécessaires à la différenciation érythrocytaire de cellules hématopoïétiques (Uddin S et al. 2004) et leucémiques (Nagata Y et al. 1998, Witt O et al. 2000). Au cours de la différenciation érythrocytaire des cellules leucémiques, on observe également une inhibition de la voie de ERK (Nagata Y et al. 1998, Witt O et al. 2000). Ces observations suggèrent que la différenciation érythrocytaire implique l'activation de p38 et l'inhibition de ERK et que, inversement, la différenciation mégacaryocytaire nécessite, comme nous l'avons vu après traitement à la diosgénine 10 μM , l'activation de la voie de ERK et l'inhibition de celle de p38.

En ce qui concerne les effets propres à la diosgénine, il est intéressant de noter que les deux doses utilisées de 10 et 40 μM ont des effets opposés sur les voies des MAPK. En effet, la dose de 40 μM active p38 et JNK et inhibe ERK alors que la dose de 10 μM conduit à l'activation de ERK et à l'inhibition de p38 et JNK. Cette différence d'action suppose peut-être l'activation de cibles cellulaires différentes en fonction de la dose de diosgénine utilisée.

Apoptose, différenciation et voies PI3K/Akt et NF κ B

Les effets de la diosgénine à 10 μM et 40 μM sur la voie PI3K/Akt et sur l'activation du facteur NF κ B sont pour leur part à relier à l'effet pro-apoptotique de la diosgénine.

En effet, le traitement des cellules HEL par 40 μM de diosgénine induit une diminution précoce de la phosphorylation de Akt et une inhibition tardive de l'activation constitutive de NF κ B (Liagre B et al. 2005). Ces résultats concernant la dose apoptotique de diosgénine sont en accord avec les données de la littérature puisque les voies de PI3K/Akt et NF κ B sont impliquées dans la survie cellulaire et la prolifération (Hammerman PS et al. 2005, Baldwin AS 2001) et des inhibitions de ces voies sont généralement décrites au cours de l'apoptose de cellules leucémiques (Martelli AM et al. 2006, Estrov Z et al. 2003, Shishodia S et Aggarwal BB 2004). De plus, des travaux récents ont également démontré que la diosgénine inhibait l'ostéoclastogenèse, la prolifération de cellules myéloïdes et induisait l'apoptose dans ces cellules en diminuant l'activation d'Akt et en inhibant l'activité transcriptionnelle de NF κ B (Shishodia S et Aggarwal BB 2006).

Le traitement par 10 μM de diosgénine induit quant à lui une diminution de la phosphorylation de Akt et une inhibition de l'activité de NF κ B en fin de traitement (Léger D et al. 2006c). Cet effet tardif est à rapprocher du déclenchement du processus apoptotique conduisant à la fragmentation des cellules HEL différenciées à la diosgénine 10 μM .

Suivi analytique des processus d'apoptose et de différenciation en SdFFF

Nous avons suivi les processus d'apoptose et de différenciation des cellules HEL induits par la diosgénine au moyen d'une technique innovante de chimie analytique, la « sedimentation field flow fractionation » (SdFFF). Cette technique développée pour la séparation de particules a été adaptée à la séparation d'espèces cellulaires (Caldwell KD et al. 1984).

Les cellules HEL traitées à la diosgénine 40 μM ont été passées en SdFFF au bout de différents temps de traitement. Les résultats obtenus ont démontré que le traitement à la dose de 40 μM induisait une augmentation du temps de rétention des cellules HEL dès 6h de traitement et avant même qu'un effet soit visible microscopiquement. Cette augmentation du temps de rétention est visible sur les fractogrammes par un décalage vers la droite du pic d'élution des cellules traitées par rapport aux cellules témoins (Léger D et al. 2004a).

Un décalage de pic vers la droite avait également été observé avec les cellules 1547 d'ostéosarcome humain en réponse à un traitement par 40 μM de diosgénine (Corbière C et al. 2004a).

Nos travaux confirment que l'induction d'un processus apoptotique peut être suivie par SdFFF avant même l'apparition de modifications morphologiques visibles caractéristiques de cellules apoptotiques, et sans utiliser de marquage ou de préparation coûteuse avant passage en SdFFF.

Nous avons par ailleurs suivi en SdFFF le processus de différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL traitées à la diosgénine 10 μM . Nos résultats indiquent que le traitement induit une diminution du temps de rétention des cellules différenciées. Cette diminution est visible par un décalage vers la gauche du pic d'élution des cellules traitées à la diosgénine 10 μM par rapport au pic témoin (Léger D et al. 2004a).

Nos conditions de passage des cellules en SdFFF, c'est-à-dire l'utilisation du mode « hyperlayer », assurent que le temps de rétention des cellules dépend de leur taille, de leur densité, de leur forme et de leur déformabilité. En effet, si l'on applique un champ gravitationnel et une vitesse de circulation de la phase mobile constants, les particules les plus volumineuses ou les moins denses seront éluées en premier (Battu S et al. 2002).

Partant de ce principe, la diminution du temps de rétention indique vraisemblablement une augmentation de la taille des cellules traitées à la diosgénine 10 μM et la répartition des cellules dans le pic d'élution doit se faire en fonction de la taille, les cellules les plus volumineuses sont éluées en début de pic et les cellules les plus petites sont éluées en fin de pic.

La différenciation mégacaryocytaire et la polyploïdisation des cellules en cours de différenciation induisent une augmentation progressive de la taille des cellules. Nous avons donc cherché à trier les cellules différenciées à la diosgénine en fonction de leur degré de différenciation.

Par la suite, nous avons séparé les cellules HEL traitées par 10 μM de diosgénine pendant 96h en différentes fractions en fonction de leur temps de rétention, c'est-à-dire de leur position dans le pic d'éluion.

Nous avons alors caractérisé le degré de différenciation des cellules dans les fractions. Des trois fractions collectées, la première est celle qui contient les cellules les plus volumineuse et les plus différenciées, comme nous avons pu le vérifier par la mesure du contenu en ADN des cellules et par l'évaluation de l'expression des marqueurs glycophorine A et CD41 (Léger D et al. 2006c).

En accord avec les principes théoriques de la SdFFF (Battu S et al. 2002, Reschiglian P et al. 2005), la dernière fraction contient les cellules les plus petites. Ces petites cellules proliférantes ont des caractéristiques très proches de celles des cellules témoins et n'ont vraisemblablement pas répondu à la diosgénine. Toutefois, nous n'avons pas mis en évidence de résistance à la diosgénine puisque le traitement des cellules de la troisième fraction par 10 μM de diosgénine induit une différenciation mégacaryocytaire de manière semblable à celle obtenue lors de la primo induction.

Ceci suggère que la réponse à la dose différenciante de diosgénine n'est pas globale et totale et qu'elle dépend peut-être de caractéristiques cellulaires telles que la position dans le cycle cellulaire par exemple. Des expériences de traitement de cellules synchronisées pourraient permettre de vérifier cette hypothèse.

Enfin, comme le passage des cellules en FFF ne modifie pas leur intégrité et puisque nos conditions de tri permettent de récupérer les cellules et de les remettre en culture, nous avons réalisé des expériences de « wash-out » par SdFFF sur les populations de cellules induites par 10 μM de diosgénine pendant un temps court. Ainsi, nous avons trié des cellules HEL exposées à la diosgénine pendant 24h. Les cellules ont été séparées en quatre fractions puis remises en culture pendant 72h. Les caractéristiques de chacune des fractions sont proches de celles obtenues précédemment, avec une première fraction composée de cellules ayant un volume augmenté, une deuxième et une troisième fractions composées de mélanges entre les différentes populations plus ou moins différenciées, et une dernière fraction composée essentiellement de petites cellules proliférantes et non différenciées.

Les cellules remises en culture pendant 72h en l'absence de diosgénine ont été à nouveau séparées en sous-fractions plus ou moins enrichies en cellules différenciées. La remise en culture des cellules en absence de diosgénine (wash-out) nous a également permis de constater que les cellules engagées dans la voie de différenciation poursuivaient le processus et finissaient par se fragmenter au bout de

192h environ, c'est-à-dire au bout du même temps que les cellules cultivées en présence de diosgénine.

La diosgénine active donc des processus qui induisent la différenciation, celle-ci se poursuivant ensuite même en absence de diosgénine. De plus, la diosgénine ne semble pas être impliquée dans la fragmentation des cellules observée en fin de traitement.

L'utilisation de la SdFFF nous a donc permis de suivre les phénomènes d'apoptose et de différenciation et de trier les cellules en fractions plus ou moins enrichies en cellules différenciées. D'un point de vue biologique, au travers des expériences menées en SdFFF, nous nous sommes rendus compte que l'induction de la différenciation n'était pas globale et totale, mais que par ailleurs, il n'y avait pas de phénomène de résistance à la diosgénine. De plus, une exposition courte à la diosgénine suffit à induire une différenciation qui ira jusqu'à la fragmentation des cellules. Enfin, cette fragmentation n'est pas à imputer à l'effet pro-apoptotique de la diosgénine.

II- EFFETS DU LÉFLUNOMIDE SUR LA PROLIFÉRATION ET LA SURVIE DE CELLULES LEUCÉMIQUES TRAITÉES PAR DIFFÉRENTS INDUCTEURS DE MORT.

Nos travaux sur le léflunomide (LEF) ont débuté au cours de la recherche de l'effet de l'augmentation de l'expression et de l'activité de COX-2 dans l'apoptose des cellules HEL traitées par 40 μ M de diosgénine.

Le LEF est un dérivé isoxazole synthétique dont les propriétés immunomodulatrices ont conduit à son utilisation dans le traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde (PR). La PR est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. De par son activité d'inhibition de la dihydroorotate déshydrogénase, le LEF inhibe la prolifération des lymphocytes activés qui ont envahi la membrane synoviale. Au niveau du processus inflammatoire, il a été observé que le LEF diminuait la production de PGE2 dans plusieurs modèles in vivo et in vitro et notamment dans les cultures de cellules synoviales (Burger D et al.

2003, Vergne-Salle et al. 2005). En fait, le LEF inhibe l'activité de COX-2, c'est-à-dire la production de prostanoïdes, sans affecter l'expression de la protéine COX-2 (Curnock AP et al 1997).

C'est en tant qu'inhibiteur de l'activité de COX-2 que le LEF a d'abord été testé sur les cellules leucémiques.

Léflunomide et prolifération cellulaire

Avant de tester l'effet d'un prétraitement au LEF sur l'apoptose des cellules HEL traitées à la diosgénine 40 μM , nous avons suivi la prolifération des cellules HEL traitées avec différentes concentrations de LEF seul. En effet, le LEF et certains de ses dérivés semblent posséder un potentiel anti-tumoral mis en évidence par une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose dans certaines lignées cellulaires cancéreuses en culture (Ghosh S et al. 1998, Xu X et al. 1999, Huang M et al. 2002).

Nos résultats ont démontré que les fortes doses de LEF (100 μM) présentait un effet anti-prolifératif sur les cellules HEL. Toutefois, nous avons également montré que des doses plus faibles, et notamment celle de 10 μM , favorisaient la survie des cellules HEL en fin de traitement (Léger D et al. 2006b). En effet, la prolifération des cellules a été suivie sans changement du milieu de culture et alors que ce milieu s'épuise en fin de traitement et que les cellules témoins commencent à mourir du fait de phénomènes de toxicité cellulaire et de manque de nutriments, les cellules traitées par 10 μM semblent survivre.

Nous avons ensuite vérifié cet effet du LEF sur la prolifération des cellules érythroleucémiques K562 issues de leucémie myéloïde chronique et sur les cellules Meg-01 de leucémie mégacaryocytaire. Les effets observés étaient les mêmes, à savoir une inhibition de la prolifération des cellules à forte dose de LEF et une amélioration de la survie des cellules en fin de traitement notamment par la dose de 10 μM de LEF. L'effet du LEF sur les cellules Meg-01 est toutefois moins prononcé que dans les deux lignées érythroleucémiques HEL et K562. Ces résultats ont été obtenus par suivi de la prolifération des cellules par le test au MTT. Ce test est basé sur la réduction du MTT en cristaux de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale. Or des travaux récents ont démontré que le LEF, utilisé à une dose de 100 μM , provoque la prolifération des mitochondries dans les cellules 143B d'ostéosarcome humain et dans les cellules hépatiques de rat RL-34 (Spodnik JH et al. 2002). Nous avons donc vérifié nos résultats par une évaluation de la viabilité des cellules par le test d'exclusion au bleu trypan. Ce test a confirmé la stimulation de la

survie des cellules HEL et K562 et dans une moindre mesure la survie des cellules Meg-01 traitées au LEF 10 μ M et cultivées sans changement du milieu de culture.

Cet effet n'ayant pas été décrit jusqu'alors, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisations cellulaires et particulièrement à l'expression et à l'activité des facteurs de survie dans les cellules leucémiques traitées par 10 μ M de léflunomide.

Léflunomide et facteurs de survie

Trois voies principales de signalisation cellulaire sont impliquées dans la régulation de la survie cellulaire : ce sont les voies des MAPK (ERK, p38 et JNK), l'activation du facteur de transcription NF κ B et la voie PI3K/Akt.

Comme nous l'avons vu précédemment, les trois sous-familles de MAPK ont des effets opposés sur la survie des cellules. La voie de ERK régule la croissance cellulaire et est principalement impliquée dans la transduction de signaux de prolifération, de différenciation et de survie dans divers types cellulaires dont les cellules leucémiques (Towatari M et al. 1997, Plataniias LC 2003). A l'inverse, les voies de p38 et JNK sont principalement impliquées dans la transduction de signaux apoptotiques ou de différenciation (Xia Z et al. 1995, Iwama K et al. 2001).

Nous avons démontré que 10 μ M de LEF activait de manière transitoire la phosphorylation et donc l'activité de ERK dans les cellules érythroleucémiques HEL et K562 mais pas dans les cellules Meg-01. L'activation transitoire de la voie de ERK est généralement impliquée dans la transduction de messages de prolifération et de survie cellulaire (Tamemoto H et al. 1992, Johnson GL et Lapadat R 2002). Toutefois, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'activation de ERK, le U0126 (Favata MF et al. 1998), n'a pas eu d'effet inhibiteur sur la survie des cellules HEL et K562 traitées par 10 μ M de LEF. Ceci indique que, bien que la voie de ERK soit activée par le traitement au LEF dans les cellules érythroleucémiques, son activation n'est pas essentielle à l'effet de stimulation de la survie induit par 10 μ M de LEF (Léger D et al. 2006b). Nous avons également démontré que le LEF à 10 μ M diminuait la phosphorylation de p38 et dans une moindre mesure, celle de JNK. De plus, l'inhibition des voies de p38 et de JNK favorise la survie des cellules même dans des conditions de stimulation par des inducteurs de l'apoptose (Brantley-Finley C et al. 2003, Wang D et al. 2005). Ainsi, dans les cellules HEL et K562, la diminution du niveau basal d'activation des voies de p38 et JNK pourrait participer à l'effet de stimulation de la survie induit par 10 μ M de LEF (Léger D et al. 2006b).

En fin de traitement des cellules K562 par 10 μ M de LEF on observe une forte activation des voies de p38 et JNK couplée à une inhibition de la voie de ERK. Cette

observation peut être rattachée aux travaux de Huang M et al. (2002) qui ont décrit l'induction d'une différenciation érythrocytaire des cellules K562 par 25 μM de LEF. En effet, l'activation des voies de p38 et de JNK et l'inhibition de la voie de ERK ont été impliquées dans l'induction de la différenciation érythrocytaire de cellules hématopoïétiques et leucémiques (Nagata Y et al. 1998, Witt O et al. 2000, Uddin S et al. 2004). Toutefois, dans nos conditions (10 μM de LEF), et même en augmentant le temps de traitement des cellules, nous n'avons pas observé de différenciation érythrocytaire des cellules K562.

Une autre voie de signalisation cellulaire impliquée dans la survie cellulaire est celle de l'activation du facteur de transcription NF κ B. En effet, l'activation de NF κ B conduit à sa translocation dans le noyau où, en se fixant sur des séquences nucléotidiques comportant un élément de réponse κ B, il active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ou l'inhibition de l'apoptose (Lee HH et al. 1999). Nos résultats démontrent que le LEF n'a pas d'effet stimulateur sur l'activation du facteur NF κ B. D'autres études ont démontré que le LEF inhibait l'activation de NF κ B induite par des agents pro-inflammatoires comme le TNF α ou l'IL-1 β (Manna SK et al. 2000, Vergne-Salle P et al. 2005).

La voie PI3K/Akt est la principale voie de signalisation cellulaire dont l'activation régule la prolifération et la survie des cellules normales et cancéreuses (Osaki M et al. 2004). En effet, l'activation constitutive de la voie PI3K/Akt a été décrite dans divers cancers et particulièrement dans les leucémies et les lymphomes (Hammerman PS et al. 2005). Dans notre étude, le traitement au LEF 10 μM induisait une forte augmentation de la phosphorylation de Akt dans les cellules HEL et K562. Cette activation de Akt est forte et soutenue dans le temps. Elle est également inhibée par le prétraitement des cellules par un inhibiteur de PI3K, le LY294002, avant le traitement au LEF 10 μM . Ceci indique que le LEF 10 μM active la voie PI3K/Akt dans les cellules érythroleucémiques (Léger D et al. 2006b).

L'activation de la voie PI3K/Akt favorise généralement la survie des cellules en inhibant plusieurs facteurs pro-apoptotiques. En effet, Akt est une protéine kinase dont l'activation induit la phosphorylation de protéines cibles telles que Bad, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, ou la caspase-9. Ces protéines une fois phosphorylées sont inactivées et n'exercent plus leur action pro-apoptotique (Osaki M et al. 2004). Akt phosphoryle et inhibe également les facteurs de transcription de la famille de Forkhead qui participent normalement à l'activation de la transcription de gènes codant des protéines pro-apoptotiques telles que le ligand de Fas (FasL, activation de la voie des récepteurs de mort), IGFBP-1 (insulin-like growth factor-

binding protein-1) et Bim (protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2) (Datta SR et al. 1999). A l'inverse, Akt phosphoryle et active le facteur de transcription CREB (cyclic AMP-response element-binding protein) qui est impliqué dans l'augmentation de transcription de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Akt (Datta SR et al. 1999). En raison des effets anti-apoptotiques évoqués précédemment, l'activation de la voie PI3K/Akt a été également impliquée *in vitro* dans l'apparition de phénomènes de résistance aux agents chimiothérapeutiques et à la radiothérapie (Brognard J et al. 2001, Knuefermann C et al. 2003).

Comme le LEF active la voie PI3K/Akt dans les cellules érythroleucémiques nous avons étudié l'induction de l'apoptose dans les cellules HEL et K562 prétraitées au LEF pendant 24h avant d'être traitées par des agents pro-apoptotiques. Les inducteurs d'apoptose utilisés dans notre étude sont : la déprivation de sérum, et les traitements par 10 μ M d'étoposide, 1 μ M de staurosporine, 5 μ M d'arsenic trioxyde ou 5 mM d'hydroxyurée. Tous ces traitements ont démontré leur pouvoir pro-apoptotiques sur des cellules leucémiques (Kolitz JE et al. 2004, Hahn M et al. 2005, Mathews V et al. 2006, Latagliata R et al. 2006).

Nos résultats démontrent tout d'abord que tous les traitements utilisés induisent l'apoptose dans les cellules HEL et K562. Cette apoptose a été quantifiée par la recherche de fragmentation de l'ADN dans les cellules traitées par rapport aux cellules témoins. De plus, nous avons décrit pour la première fois pour le LEF un effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose. En effet, un prétraitement au LEF 10 μ M pendant 24h diminue la fragmentation de l'ADN induite dans les cellules HEL et K562 par l'étoposide ou par la déprivation de sérum. Nous avons également montré que le LEF réduisait la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine dans les cellules HEL et par l'arsenic trioxyde dans les cellules K562 (Léger D et al. 2006b). Le prétraitement au LEF est par contre sans effet sur la fragmentation de l'ADN induite par l'hydroxyurée et ceci dans les deux lignées étudiées. Le LEF ne réduit pas non plus la fragmentation de l'ADN induite par la diosgénine dans les cellules HEL.

Paradoxalement, dans les cellules K562, le prétraitement au LEF augmente la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine. Le mécanisme exact de cet effet du LEF n'a pas été élucidé au cours de notre étude. Toutefois, il ne semble pas que la synergie observée dans l'induction de la fragmentation de l'ADN implique la voie d'Akt puisque la staurosporine inhibe généralement l'activation d'Akt au cours de l'apoptose induite dans les cellules leucémiques (Dai Y et al. 2005).

Nous avons donc vu que dans les cellules HEL, le prétraitement par 10 μ M de LEF réduisait la fragmentation de l'ADN induite par l'étoposide, la staurosporine et la déprivation de sérum. Afin de préciser l'effet du LEF sur l'apoptose des cellules HEL, nous avons également étudié l'exposition de la phosphatidylsérine et l'activation de la caspase-3 dans les cellules prétraitées au LEF et traitées par l'étoposide, la staurosporine ou déprivées en sérum. Nous avons montré que le LEF réduisait l'exposition de la phosphatidylsérine et l'activation de la caspase-3 dans les cellules prétraitées au LEF et traitées par l'étoposide, la staurosporine ou déprivées en sérum. Le LEF réduit donc de manière globale l'induction de l'apoptose par ces agents pro-apoptotiques (Léger D et al. 2006b).

Le LEF active la voie de PI3K/Akt. Or l'activation de cette voie est généralement associée avec l'acquisition d'un phénotype résistant, notamment au cours des traitements à l'étoposide ou à la staurosporine (Lee SM et al. 2006, Larribere L et al. 2004). Dans notre étude, l'exposition des cellules HEL à un inhibiteur de PI3K, le LY294002, avant le prétraitement au LEF restaure la sensibilité des cellules à l'induction de l'apoptose (activation de caspase-3 et fragmentation de l'ADN) par l'étoposide, la staurosporine ou la déprivation en sérum (Léger D et al. 2006b). L'effet protecteur du LEF vis-à-vis de l'induction de l'apoptose passe donc bien par l'activation de la voie de PI3K/Akt.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les leucémies myéloïdes constituent un groupe d'hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale de cellules appartenant à certaines lignées médullaires. Au cours de la transformation leucémique, ces cellules perdent leur sensibilité aux facteurs de croissance et de différenciation hématopoïétique et prolifèrent de manière incontrôlée.

Il existe à ce jour deux stratégies principales pour stopper ou freiner la prolifération des cellules leucémiques. La première vise à activer un processus d'apoptose dans les cellules, la seconde vise à réactiver un programme de différenciation hématopoïétique dans les cellules leucémiques.

Dans cette perspective, nous avons étudié l'effet de la diosgénine, un stéroïde végétal, sur la prolifération des cellules érythroleucémiques humaines HEL.

Nous avons mis en évidence que la diosgénine, utilisée à une dose de 40 μM , induit un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules HEL. En effet, au cours du traitement des cellules HEL, on observe une accumulation des cellules en phase G_2/M du cycle cellulaire. Cette dose de 40 μM de diosgénine induit également une chute du potentiel membranaire mitochondrial, une augmentation du taux de calcium intracellulaire, l'activation de la caspase-3, le clivage de la PARP et la fragmentation de l'ADN des cellules HEL. Tous ces événements indiquent que la diosgénine à 40 μM est un puissant inducteur de l'apoptose dans les cellules HEL.

Au cours de l'apoptose induite par la diosgénine, on observe une augmentation de l'expression et de l'activité de la COX-2. L'activation de cette enzyme par 40 μM de diosgénine a été observée dans de nombreux types cellulaires. Toutefois, son rôle au cours de l'apoptose induite par la diosgénine reste à élucider.

D'autre part, dans la continuité des travaux initiés dans le laboratoire, nous avons démontré que la diosgénine à 10 μM induit la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL. Cette différenciation est caractérisée par une polyploïdisation progressive des cellules, une forte diminution du phénotype érythrocytaire et une augmentation de l'expression de marqueurs de la lignée mégacaryocytaire.

Au cours cette différenciation induite par 10 μM de diosgénine, on observe une activation biphasique de la caspase-3, une diminution de Bcl-xL et une fragmentation des cellules différenciées en fin de traitement. Bien que ces événements soient proches de ceux observés au cours de la maturation des mégacaryocytes normaux, les fragments libérés par les cellules HEL différenciées

sous diosgénine ne sont pas des plaquettes fonctionnelles. Mais à ce jour, il n'a pas été démontré que des cellules leucémiques différenciées étaient capables de produire des plaquettes fonctionnelles.

L'étude des voies de signalisation cellulaire modulées par la diosgénine dans les cellules HEL a révélé que les deux doses utilisées activaient des voies de transduction du signal différentes. En effet, la dose de 40 μM induit une forte inhibition de la voie de ERK et active les voies de p38 et JNK. A l'inverse, l'activation de la voie de ERK est nécessaire à la différenciation mégacaryocytaire induite par 10 μM de diosgénine, et à cette dose, on observe également une inhibition des voies de p38 et JNK.

Cette différence d'action suppose peut-être l'activation de cibles cellulaires différentes en fonction de la dose de diosgénine utilisée.

En collaboration avec l'équipe du Service de Pharmacologie biologique et pharmacocinétique du CHRU de Limoges, nous avons démontré que la diosgénine pénétrait rapidement dans les cellules après traitement. La diosgénine étant un stéroïde végétal, il serait intéressant d'étudier l'intervention des récepteurs aux stéroïdes qui sont des récepteurs intracellulaires, au cours de la différenciation mégacaryocytaire et de l'apoptose induites par la diosgénine.

Une étude récente sur un effet pro-angiogénique de la diosgénine a démontré que ce composé était capable de se fixer sur le récepteur aux oestrogènes ER α dans des ostéoblastes en culture (Yen ML et al. 2005). Le récepteur ER α étant exprimé dans les cellules HEL (Khetawat G et al. 2000), il serait intéressant d'étudier son implication dans la réponse de ces cellules à la diosgénine. En effet, de nombreuses études imputent aux oestrogènes un rôle dans la stimulation de la différenciation mégacaryocytaire et la formation des plaquettes (Landshman N et Bleiberg I 1979, Bord S et al. 2000, Nagata Y et al. 2003, Bord S et al. 2004, Fox SW et Chambers TJ 2006). Toutefois les oestrogènes présentent en général un caractère plutôt anti-apoptotique.

Une autre cible potentielle de la diosgénine pourrait être le récepteur aux glucocorticoïdes. En effet, le traitement de cellules leucémiques par des glucocorticoïdes peut conduire à une différenciation mégacaryocytaire de ces cellules (Song LN et Cheng T 1993, Hicsonmez et al. 2003). De plus, le traitement de cellules leucémiques par des glucocorticoïdes peut également conduire à l'induction de l'apoptose (Greenstein S et al. 2002, Schmidt S et al. 2004).

Il serait donc intéressant d'étudier l'implication de l'un ou l'autre, ou des deux récepteurs, lors de la stimulation des cellules par la diosgénine à 10 μM et 40 μM . L'étude pourrait également être étendue aux récepteurs à la progestérone ou aux androgènes ou encore au récepteur à la vitamine D.

L'utilisation de la SdFFF nous a permis de démontrer que les phénomènes d'apoptose et de différenciation mégacaryocytaire pouvaient être détectés par cette technique de manière précoce et sans préparation spécifique des cellules. Au cours de nos travaux, nous avons également mis en évidence la possibilité de trier par SdFFF des cellules traitées à la diosgénine 10 μM en fonction de leur degré de différenciation. Cette étude nous a permis d'observer différents niveaux de différenciation dans la population traitée à la diosgénine et de trier des cellules qui ne s'étaient pas différenciées. Nous n'avons pas mis en évidence de phénomènes de résistance à la diosgénine puisqu'une seconde exposition à 10 μM de diosgénine induit la différenciation des cellules non différenciées.

Les expériences de tri et de wash-out menées en SdFFF nous ont également permis de démontrer qu'une courte exposition à 10 μM de diosgénine suffit à induire un processus de différenciation qui, pour les cellules les plus différenciées, ira jusqu'à la fragmentation. Cette fragmentation des cellules différenciées est donc due au processus de différenciation qui est arrivé à son terme et pas à la présence de diosgénine dans le milieu de culture.

Si la diosgénine est effectivement capable d'enclencher un processus complet de différenciation mégacaryocytaire *in vitro*, il serait intéressant de tester son effet sur la production de plaquettes *in vivo*. La diosgénine intégrée à une proportion de 0,5% à 1% dans l'alimentation des rats est bien supportée et présente des effets biologiques intéressants tels que l'augmentation de la sécrétion biliaire de cholestérol et la réduction de la formation de cancers colorectaux induits par l'azoxyméthane (Kosters A et al. 2005, Raju J et al. 2004). L'étude de la numération plaquettaire et de la maturation médullaire des mégacaryocytes chez des rats dont l'alimentation est complétée à la diosgénine pourrait nous permettre de vérifier si la diosgénine présente son effet différenciant *in vivo*. Cette étude pourrait être menée en parallèle sur des rats qui ont été préalablement rendus thrombocytopéniques par des traitements chimiques ou par radiothérapie. Il serait alors intéressant de voir si la complémentation à la diosgénine permet d'accélérer le processus de recouvrement d'une numération plaquettaire normale.

Nos travaux sur le léflunomide (LEF) ont débuté au cours de la recherche de l'effet de l'augmentation de l'expression et de l'activité de COX-2 dans l'apoptose des cellules HEL traitées par 40 μ M de diosgénine.

Le LEF est un dérivé isoxazole synthétique dont les propriétés immunomodulatrices ont conduit à son utilisation dans le traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde (PR). Le LEF présente des propriétés anti-inflammatoires en réduisant la production de PGE2 dans plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* et notamment dans les cultures de cellules synoviales (Burger D et al. 2003, Vergne-Salle P et al. 2005). En fait, le LEF inhibe l'activité de COX-2, sans affecter l'expression de la protéine COX-2 (Curnock AP et al. 1997). C'est en tant qu'inhibiteur de l'activité de COX-2 que le LEF a d'abord été testé sur les cellules leucémiques.

Notre première étude a consisté à suivre la prolifération des cellules HEL traitées par différentes doses de LEF. Nous avons démontré qu'une dose de 10 μ M de LEF augmentait la survie des cellules HEL cultivées sans changement de milieu. Cette étude a été étendue aux cellules érythroleucémiques K562 et aux cellules Meg-01 de leucémie mégacaryocytaire. Nous avons ainsi confirmé que 10 μ M de LEF favorisait la survie des cellules leucémiques.

Par la suite, nous avons montré que le LEF augmentait de manière transitoire la voie de ERK et diminuait les voies de p38 et JNK. Le LEF active également de manière importante la voie PI3K/Akt. L'activation de la voie PI3K/Akt dans les cellules leucémiques étant généralement associée à l'acquisition de phénotypes chimiorésistants, nous avons étudié la réponse des cellules leucémiques à des inducteurs connus de l'apoptose. Nous avons montré que le LEF réduisait l'exposition de la phosphatidylsérine, l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN dans les cellules HEL traitées à l'étoposide, à la staurosporine ou déprivées en sérum. Cet effet protecteur du LEF vis-à-vis de l'apoptose passe par l'activation de la voie PI3K/Akt puisque l'inhibition préalable de cette voie restaure un niveau normal d'apoptose.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 2002; 296:1653-5.

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

Adrain C, Slee EA, Harte MT, Martin SJ. Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem*. 1999; 274:20855-60.

Agis H, Weltermann A, Mitterbauer G, Thalhammer R, Edelhauser M, Seewann HL, Valent P, Lechner K, Fonatsch C, Geissler K. Successful treatment with arsenic trioxide of a patient with ATRA-resistant relapse of acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol*. 1999; 78:329-32.

Albanese P, Chagraoui J, Charon M, Cocault L, Dusanter-Fourt I, Romeo PH, Uzan G. Forced expression of p21 in GPIIb-p21 transgenic mice induces abnormalities in the proliferation of erythroid and megakaryocyte progenitors and primitive hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2002; 30:1263-72.

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

Amaravadi R, Thompson CB. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest*. 2005;115:2618-24.

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.

Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J*. 2000; 345:271-8.

Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 315:971-9.

Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:420-30.

Athanasiou M, Clausen PA, Mavrothalassitis GJ, Zhang XK, Watson DK, Blair DG. Increased expression of the ETS-related transcription factor FLI-1/ERGB correlates with and can induce the megakaryocytic phenotype. *Cell Growth Differ*. 1996; 7:1525-34.

Athanasiou M, Mavrothalassitis G, Sun-Hoffman L, Blair DG. FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells. *Leukemia*. 2000; 14:439-45.

Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Sauvage F, Rafii S. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med.* 2004; 10:64-71.

B

Baccini V, Roy L, Vitrat N, Chagraoui H, Sabri S, Le Couedic JP, Debili N, Wendling F, Vainchenker W. Role of p21(Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes. *Blood.* 2001; 98:3274-82.

Bacon CM, Tortolani PJ, Shimosaka A, Rees RC, Longo DL, O'Shea JJ. Thrombopoietin (TPO) induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT5 and STAT3. *FEBS Lett.* 1995; 370:63-8.

Baeuerle PA, Baichwal VR. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol.* 1997; 65:111-37.

Baird WM, Boutwell RK. Tumor-promoting activity of phorbol and four diesters of phorbol in mouse skin. *Cancer Res.* 1971; 31:1074-9.

Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest.* 2001; 107:241-6.

Banu N, Wang JF, Deng B, Groopman JE, Avraham H. Modulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin: the c-Mpl ligand. *Blood.* 1995; 86(4):1331-8.

Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dorken B. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest.* 1997; 100:2961-9.

Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999; 18:6910-24.

Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell.* 1994; 77:1117-24.

Bastian LS, Kwiatkowski BA, Breininger J, Danner S, Roth G. Regulation of the megakaryocytic glycoprotein IX promoter by the oncogenic Ets transcription factor Fli-1. *Blood.* 1999; 93:2637-44.

Battu S, Cook-Moreau J, Cardot PJP. Sedimentation field-flow fractionation: methodological basis and applications for cell sorting. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2002; 25:2193-2210.

Beer TM, Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3:373-81.

- Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M.** Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*. 2003; 101:2940-54.
- Beneytout JL, Nappiez 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, Eckie R, Hughes J.** The effects of sustained delivery of diosgenin on the adrenal gland of female rats. *Biomed Sci Instrum*. 2003; 39:335-40.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P.** Calcium--a life and death signal. *Nature*. 1998; 395:645-8.
- Bittova L, Sumandea M, Cho W.** A structure-function study of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2. Identification of essential calcium ligands and hydrophobic membrane binding residues. *J Biol Chem*. 1999; 274:9665-72.
- Blalock WL, Pearce M, Steelman LS, Franklin RA, McCarthy SA, Cherwinski H, McMahan M, McCubrey JA.** A conditionally-active form of MEK1 results in autocrine transformation of human and mouse hematopoietic cells. *Oncogene*. 2000; 19:526-36.
- Blangy A, Lane HA, d'Herin P, Harper M, Kress M, Nigg EA.** Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell*. 1995; 83:1159-69.
- Boatright KM, Salvesen GS.** Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15:725-31.
- Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB.** bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 1993; 74:597-608.
- Bord S, Frith E, Ireland DC, Scott MA, Craig JI, Compston JE.** Estrogen stimulates differentiation of megakaryocytes and modulates their expression of estrogen receptors alpha and beta. *J Cell Biochem*. 2004; 92:249-57.
- Bord S, Vedi S, Beavan SR, Horner A, Compston JE.** Megakaryocyte population in human bone marrow increases with estrogen treatment: a role in bone remodeling? *Bone*. 2000; 27:397-401.
- Borner C.** The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003; 39:615-47.
- 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.
- Bouscary D, Lecoq-Lafon C, Chretien S, Zompi S, Fichelson S, Muller O, Porteu F, Dusanter-Fourt I, Gisselbrecht S, Mayeux P, Lacombe C.** Role of Gab proteins in phosphatidylinositol 3-kinase activation by thrombopoietin (Tpo). *Oncogene*. 2001; 20:2197-204.

Brantley-Finley C, Lyle CS, Du L, Goodwin ME, Hall T, Szewo D, Kaushal GP, Chambers TC. The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66:459-69.

Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:6148-52.

Brognaard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res.* 2001; 61:3986-97.

Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest.* 2002; 109:1139-42.

Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999; 96:857-68.

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.

Burger D, Begue-Pastor N, Benavent S, Gruaz L, Kaufmann MT, Chicheportiche R, Dayer JM. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, inhibits the production of prostaglandin E(2), matrix metalloproteinase 1 and interleukin 6 in human fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2003; 42:89-96.

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

Cai X, Shen YL, Zhu Q, Jia PM, Yu Y, Zhou L, Huang Y, Zhang JW, Xiong SM, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z, Chen GQ. Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia.* 2000; 14:262-70.

Caldwell KD, Cheng ZQ, Hradecky P, Giddings JC. Separation of human and animal cells by steric field-flow fractionation. *Cell Biophys.* 1984; 6:233-51.

Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol.* 2002; 190:279-86.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998; 282:1318-21.

Carey JO, Posekany KJ, deVente JE, Pettit GR, Ways DK. Phorbol ester-stimulated phosphorylation of PU.1: association with leukemic cell growth inhibition. *Blood.* 1996; 87:4316-24.

- Castro A, Vigneron S, Lorca T, Labbe JC.** Mitosis under control. *Med Sci (Paris)*. 2003; 19:309-17.
- 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 L, Karin M.** Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001; 410:37-40.
- Chong AS, Zeng H, Knight DA, Shen J, Meister GT, Williams JW, Waldman WJ.** Concurrent antiviral and immunosuppressive activities of leflunomide in vivo. *Am J Transplant*. 2006; 6:69-75.
- Claria J, Romano M.** Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Curr Pharm Des*. 2005; 11:3431-47.
- Clarke MC, Savill J, Jones DB, Noble BS, Brown SB.** Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death. *J Cell Biol*. 2003; 160:577-87.
- Clarke PG, Posada A, Primi MP, Castagne V.** Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother*. 1998; 52:356-62.
- Cochet O, Frelin C, Peyron JF, Imbert V.** Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma-derived cell lines supports cell survival. *Cell Signal*. 2006; 18:449-55.
- Coelho SM, Vaisman M, Carvalho DP.** Tumour re-differentiation effect of retinoic acid: a novel therapeutic approach for advanced thyroid cancer. *Curr Pharm Des*. 2005; 11:2525-31.
- Cohen GM.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997; 326:1-16.
- 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.
- Corbiere C, Battu S, Liagre B, Cardot PJ, Beneytout JL.** SdFFF monitoring of cellular apoptosis induction by diosgenin and different inducers in the human 1547 osteosarcoma cell line. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004a; 808:255-62.
- Corbiere C, Liagre B, Terro F, Beneytout JL.** 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. *Cell Res*. 2004b; 14:188-96.

Coso OA, Chiariello M, Kalinec G, Kyriakis JM, Woodgett J, Gutkind JS. Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. *J Biol Chem.* 1995; 270:5620-4.

Cramer EM, Norol F, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W, Masse JM, Debili N. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood.* 1997; 89:2336-46.

Cripe LD, Gelfanov VM, Smith EA, Spigel DR, Phillips CA, Gabig TG, Jung SH, Fyffe J, Hartman AD, Kneebone P, Mercola D, Burgess GS, Boswell HS. Role for c-jun N-terminal kinase in treatment-refractory acute myeloid leukemia (AML): signaling to multidrug-efflux and hyperproliferation. *Leukemia.* 2002; 16:799-812.

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

Curnock AP, Robson PA, Yea CM, Moss D, Gadher S, Thomson TA, Westwood R, Ruuth E, Williamson RA. Potencies of leflunomide and HR325 as inhibitors of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2: comparison with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 282:339-47.

D

Dai Y, Rahmani M, Pei XY, Khanna P, Han SI, Mitchell C, Dent P, Grant S. Farnesyltransferase inhibitors interact synergistically with the Chk1 inhibitor UCN-01 to induce apoptosis in human leukemia cells through interruption of both Akt and MEK/ERK pathways and activation of SEK1/JNK. *Blood.* 2005; 105:1706-16.

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.

Dannenber AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol.* 2001; 2:544-51.

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.

Das S, Rafter JD, Kim KP, Gygi SP, Cho W. Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A(2) activation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 2003; 278:41431-42.

Datta NS, Williams JL, Long MW. Differential modulation of G1-S-phase cyclin-dependent kinase 2/cyclin complexes occurs during the acquisition of a polyploid DNA content. *Cell Growth Differ.* 1998; 9:639-50.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999; 13:2905-27.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997; 91:231-41.

- Davis RJ.** Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 2000; 103:239-52.
- Davison K, Mann KK, Waxman S, Miller WH Jr.** JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood.* 2004; 103:3496-502.
- De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, Debili N.** Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood.* 2002; 100:1310-7.
- de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, et al.** Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature.* 1994; 369:533-8.
- Debili N, Wendling F, Cosman D, Titeux M, Florindo C, Dusanter-Fourt I, Schooley K, Methia N, Charon M, Nador R, et al.** The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood.* 1995a; 85:391-401.
- Debili N, Wendling F, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Hunt P, Vainchenker W.** The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood.* 1995b; 86:2516-25.
- Degos L, Wang ZY.** All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene.* 2001; 20:7140-5.
- 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.
- Deveaux S, Filipe A, Lemarchandel V, Ghysdael J, Romeo PH, Mignotte V.** Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes. *Blood.* 1996; 87:4678-85.
- Desagher S, Martinou JC.** Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000; 10:369-77.
- Deveraux QL, Reed JC.** IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999; 13:239-52.
- Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, Miller DK.** Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature.* 1990; 343:282-4.
- Dorsch M, Danial NN, Rothman PB, Goff SP.** A thrombopoietin receptor mutant deficient in Jak-STAT activation mediates proliferation but not differentiation in UT-7 cells. *Blood.* 1999; 94:2676-85.

Drach J, McQueen T, Engel H, Andreeff M, Robertson KA, Collins SJ, Malavasi F, Mehta K. Retinoic acid-induced expression of CD38 antigen in myeloid cells is mediated through retinoic acid receptor- α . *Cancer Res.* 1994; 54:1746-52.

Drachman JG, Millett KM, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem.* 1999; 274:13480-4.

Drachman JG, Sabath DF, Fox NE, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood.* 1997; 89:483-92.

Dvory-Sobol H, Cohen-Noyman E, Kazanov D, Figer A, Birkenfeld S, Madar-Shapiro L, Benamouzig R, Arber N. Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and down-regulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner. *Eur J Cancer.* 2006; 42:422-6.

E

Eisbacher M, Holmes ML, Newton A, Hogg PJ, Khachigian LM, Crossley M, Chong BH. Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding. *Mol Cell Biol.* 2003; 23:3427-41.

Espert L, Dusanter-Fourt I, Chelbi-Alix MK. Negative regulation of the JAK/STAT: pathway implication in tumorigenesis. *Bull Cancer.* 2005; 92:845-57.

Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M, Aggarwal BB. Resveratrol blocks interleukin-1 β -induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 2003; 102:987-95.

Evans JH, Gerber SH, Murray D, Leslie CC. The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A2 C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells. *Mol Biol Cell.* 2004; 15:371-83.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 1983; 33:389-96.

F

Falcieri E, Bassini A, Pierpaoli S, Luchetti F, Zamai L, Vitale M, Guidotti L, Zauli G. Ultrastructural characterization of maturation, platelet release, and senescence of human cultured megakaryocytes. *Anat Rec.* 2000; 258:90-9.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* 1998; 273:18623-32.

Fesik SW, Shi Y. Structural biology. Controlling the caspases. *Science.* 2001; 294:1477-8.

Fichelson S, Freyssinier JM, Picard F, Fontenay-Roupie M, Guesnu M, Cherai M, Gisselbrecht S, Porteu F. Megakaryocyte growth and development factor-induced proliferation and differentiation are regulated by the mitogen-activated protein kinase pathway in primitive cord blood hematopoietic progenitors. *Blood*. 1999; 94:1601-13.

Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 2003; 10:76-100.

Fox AH, Liew C, Holmes M, Kowalski K, Mackay J, Crossley M. Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J*. 1999; 18:2812-22.

Fox RI. Mechanism of action of leflunomide in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl*. 1998; 53:20-6.

Fox SW, Chambers TJ. The effect of oestrogen on megakaryocyte differentiation and platelet counts in vivo. *Int J Cardiol*. 2006; 109:359-66.

Francisco L, Wang W, Chan CS. Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol*. 1994; 14:4731-40.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*. 2004; 384:201-32.

Fujishima T, Zhaopeng L, Konno K, Nakagawa K, Okano T, Yamaguchi K, Takayama H. Highly potent cell differentiation-inducing analogues of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃: synthesis and biological activity of 2-methyl-1,25-dihydroxyvitamin D₃ with side-chain modifications. *Bioorg Med Chem*. 2001; 9:525-35.

Fujita H, Koshida K, Keller ET, Takahashi Y, Yoshimoto T, Namiki M, Mizokami A. Cyclooxygenase-2 promotes prostate cancer progression. *Prostate*. 2002; 53:232-40.

Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:12355-8.

G

Gaines P, Geiger JN, Knudsen G, Seshasayee D, Wojchowski DM. GATA-1- and FOG-dependent activation of megakaryocytic α IIB gene expression. *J Biol Chem*. 2000; 275:34114-21.

Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*. 2002; 16:1053-68.

Geddis AE, Fox NE, Kaushansky K. Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors. *J Biol Chem*. 2001; 276:34473-9.

- Geddis AE, Kaushansky K.** Megakaryocytes express functional Aurora-B kinase in endomitosis. *Blood*. 2004; 104:1017-24.
- Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA.** Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*. 1996; 12:1173-80.
- Gewirtz AM, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak M, Park KS, Li C, Yan Z, Poncz M.** Chemokine regulation of human megakaryocytopoiesis. *Blood*. 1995; 86:2559-67.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB.** NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16:225-60.
- Ghosh S, Zheng Y, Jun X, Narla RK, Mahajan S, Navara C, Mao C, Sudbeck EA, Uckun FM.** Alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-[4-(trifluoromethoxy)phenyl] propenamide: an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase with potent cytotoxic activity against breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 1998; 4:2657-68.
- Ghysdael J, Tran Quang C, Deiner EM, Dolznig H, Mullner EW, Beug H.** Erythroid cell development and leukemic transformation: interplay between signal transduction, cell cycle control and oncogenes. *Pathol Biol (Paris)*. 2000; 48:211-26.
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW.** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 1991; 349:132-8.
- 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.
- Gordge MP.** Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals. *Br J Pharmacol*. 2005; 145:271-3.
- Gordon MS, Hoffman R.** Growth factors affecting human thrombocytopoiesis: potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood*. 1992; 80:302-7.
- 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.
- Green DR, Reed JC.** Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998; 281:1309-12.
- Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST.** Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:1681-94.
- Griffin J, Munroe D, Major P, Kufe D.** Induction of differentiation of human myeloid leukemia cells by inhibitors of DNA synthesis. *Exp Hematol*. 1982; 10:774-81.
- Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Ciocce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S, Pelicci PG.** Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*. 1998; 391:815-8.

Grisar J, Aringer M, Koller MD, Stummvoll GH, Eselbock D, Zwolfer B, Steiner CW, Zierhut B, Wagner L, Pietschmann P, Smolen JS. Leflunomide inhibits transendothelial migration of peripheral blood mononuclear cells. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63:1632-7.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985; 260:3440-50.

Guerrero R, Mattia G, Testa U, Chelucci C, Macioce G, Casella I, Samoggia P, Peschle C, Hassan HJ. Stromal cell-derived factor 1alpha increases polyploidization of megakaryocytes generated by human hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2001; 97:2587-95.

Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncol.* 2003; 22:15-20.

Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, Jordan CT. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood.* 2001; 98:2301-7.

H

Hahn M, Li W, Yu C, Rahmani M, Dent P, Grant S. Rapamycin and UCN-01 synergistically induce apoptosis in human leukemia cells through a process that is regulated by the Raf-1/MEK/ERK, Akt, and JNK signal transduction pathways. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4:457-70.

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.

Hammerman PS, Fox CJ, Birnbaum MJ, Thompson CB. Pim and Akt oncogenes are independent regulators of hematopoietic cell growth and survival. *Blood.* 2005; 105:4477-83.

Han ZT, Zhu XX, Yang RY, Sun JZ, Tian GF, Liu XJ, Cao GS, Newmark HL, Conney AH, Chang RL. Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:5357-61.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.

Haridas V, Higuchi M, Jayatilake GS, Bailey D, Mujoo K, Blake ME, Arntzen CJ, Gutterman JU. Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:5821-6.

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.

- Harris AL, Hochhauser D.** Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncol.* 1992; 31:205-13.
- 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.
- Hatakeyama M, Brill JA, Fink GR, Weinberg RA.** Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 1994; 8:1759-71.
- Hengartner MO.** The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407:770-6.
- Herrera R, Hubbell S, Decker S, Petruzzelli L.** A role for the MEK/MAPK pathway in PMA-induced cell cycle arrest: modulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Exp Cell Res.* 1998; 238:407-14.
- Hicsonmez G, Cetin M, Okur H, Erdemli E, Gurgey A.** The potential effect of short-course high-dose steroid on the maturation and apoptosis of leukemic cells in a child with acute megakaryoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2003; 44:1037-42.
- 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.
- Holmes ML, Bartle N, Eisbacher M, Chong BH.** Cloning and analysis of the thrombopoietin-induced megakaryocyte-specific glycoprotein VI promoter and its regulation by GATA-1, Fli-1, and Sp1. *J Biol Chem.* 2002; 277:48333-41.
- 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.
- Hoyle PE, Moyer PW, Steelman LS, Blalock WL, Franklin RA, Pearce M, Cherwinski H, Bosch E, McMahon M, McCubrey JA.** Differential abilities of the Raf family of protein kinases to abrogate cytokine dependency and prevent apoptosis in murine hematopoietic cells by a MEK1-dependent mechanism. *Leukemia.* 2000; 14:642-56.
- Huang C, Ma WY, Li J, Dong Z.** Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH2-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Res.* 1999; 59:3053-8.
- Huang HM, Chang TW, Liu JC.** Basic fibroblast growth factor antagonizes activin A-mediated growth inhibition and hemoglobin synthesis in K562 cells by activating ERK1/2 and deactivating p38 MAP kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 320:1247-52.
- Huang M, Wang Y, Collins M, Mitchell BS, Graves LM.** A77 1726 induces differentiation of human myeloid leukemia K562 cells by depletion of intracellular CTP pools. *Mol Pharmacol.* 2002; 62:463-72.

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.

Huberman E, Callaham MF. Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76:1293-7.

I

Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* 1997; 275:90-4.

Iida K, Nobori T, Matsumine A, Isaka A, Seto M, Shiraishi T, Uchida A. Effect of retinoblastoma tumor suppressor gene expression on chemosensitivity of human osteosarcoma cell lines. *Oncol Rep.* 2003; 10:1961-5.

Issing WJ, Wustrow TP, Oeckler R, Mezger J, Nerlich A. An association of the RB gene with osteosarcoma: molecular genetic evaluation of a case of hereditary retinoblastoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1993; 250:277-80.

Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol.* 1999; 147:1299-312.

Iwama K, Nakajo S, Aiuchi T, Nakaya K. Apoptosis induced by arsenic trioxide in leukemia U937 cells is dependent on activation of p38, inactivation of ERK and the Ca²⁺-dependent production of superoxide. *Int J Cancer.* 2001; 92:518-26.

J

Jeannesson P, Lahlil R, Chenais B, Devy L, Gillet R, Aries A, Morceau F, Trentesaux C. Anthracyclines as tumor cell differentiating agents: effects on the regulation of erythroid gene expression. *Leuk Lymphoma.* 1997; 26:575-87.

Jiang F, Jia Y, Cohen I. Fibronectin- and protein kinase C-mediated activation of ERK/MAPK are essential for proplateletlike formation. *Blood.* 2002; 99:3579-84.

Jiang H, Lin J, Su ZZ, Collart FR, Huberman E, Fisher PB. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene.* 1994; 9:3397-406.

Jiang S, Chow SC, Nicotera P, Orrenius S. Intracellular Ca²⁺ signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin. *Exp Cell Res.* 1994; 212:84-92.

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002; 298:1911-2.

K

Kalden JR, Schattenkirchner M, Sorensen H, Emery P, Deighton C, Rozman B, Breedveld F. The efficacy and safety of leflunomide in patients with active rheumatoid arthritis: a five-year followup study. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:1513-20.

Kaluzhny Y, Ravid K. Role of apoptotic processes in platelet biogenesis. *Acta Haematol.* 2004; 111:67-77.

Kaluzhny Y, Yu G, Sun S, Toselli PA, Nieswandt B, Jackson CW, Ravid K. BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation. *Blood.* 2002; 100:1670-8.

Kamisako T, Ogawa H. Regulation of biliary cholesterol secretion is associated with *abcg5* and *abcg8* expressions in the rats: effects of diosgenin and ethinyl estradiol. *Hepatol Res.* 2003; 26:348-352.

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol.* 1999; 9:601-4.

Kang CD, Lee BK, Kim KW, Kim CM, Kim SH, Chung BS. Signaling mechanism of PMA-induced differentiation of K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 221:95-100.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:301-10.

Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell.* 1998; 1:543-51.

Kasibhatla S, Genestier L, Green DR. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem.* 1999; 274:987-92.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991; 51:6304-11.

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.

Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res.* 2000; 256:42-9.

Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med.* 1998; 339:746-54.

Kaushansky K, Broudy VC, Lin N, Jorgensen MJ, McCarty J, Fox N, Zucker-Franklin D, Lofton-Day C. Thrombopoietin, the Mp1 ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:3234-8.

Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*. 1994; 369:568-71.

Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood*. 2002; 99:310-8.

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.

Kharbanda S, Saleem A, Emoto Y, Stone R, Rapp U, Kufe D. Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases during monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*. 1994; 269:872-8.

Khayat CM, Johnston DL. Rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, and adrenocortical carcinoma in a child with a germline p53 mutation. *Pediatr Blood Cancer*. 2004; 43:683-6.

Khetawat G, Faraday N, Nealen ML, Vijayan KV, Bolton E, Noga SJ, Bray PF. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood*. 2000; 95:2289-96.

Khosravi-Far R, Esposti MD. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*. 2004; 3:1051-7.

Kikuchi J, Furukawa Y, Iwase S, Terui Y, Nakamura M, Kitagawa S, Kitagawa M, Komatsu N, Miura Y. Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocytic differentiation: involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization. *Blood*. 1997; 89:3980-90.

Kim KW, Kim SH, Lee EY, Kim ND, Kang HS, Kim HD, Chung BS, Kang CD. Extracellular signal-regulated kinase/90-KDA ribosomal S6 kinase/nuclear factor-kappa B pathway mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem*. 2001; 276:13186-91.

Kim SC, Hahn JS, Min YH, Yoo NC, Ko YW, Lee WJ. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood*. 1999; 93:3893-9.

Kim SE, Lee YH, Park JH, Lee SK. Ginsenoside-Rs4, a new type of ginseng saponin concurrently induces apoptosis and selectively elevates protein levels of p53 and p21WAF1 in human hepatoma SK-HEP-1 cells. *Eur J Cancer*. 1999; 35:507-11.

Kim TK. In vitro transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 234:300-2.

Kirito K, Fox N, Kaushansky K. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003; 102:3172-8.

Kirsch BM, Zeyda M, Stuhlmeier K, Grisar J, Smolen JS, Watschinger B, Stulnig TM, Horl WH, Zlabinger GJ, Saemann MD. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, interferes with dendritic cell function. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7:694-703.

Kizaki M, Norman AW, Bishop JE, Lin CW, Karmakar A, Koeffler HP. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptor RNA: expression in hematopoietic cells. *Blood.* 1991; 77:1238-47.

Knuefermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, Liang K, Wu L, Schmidt M, Mills GB, Mendelsohn J, Fan Z. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene.* 2003; 22:3205-12.

Kohmura K, Miyakawa Y, Kawai Y, Ikeda Y, Kizaki M. Different roles of p38 MAPK and ERK in STI571-induced multi-lineage differentiation of K562 cells. *J Cell Physiol.* 2004; 198:370-6.

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.

Kolitz JE, George SL, Dodge RK, Hurd DD, Powell BL, Allen SL, Velez-Garcia E, Moore JO, Shea TC, Hoke E, Caligiuri MA, Vardiman JW, Bloomfield CD, Larson RA; Cancer and Leukemia Group B. Dose escalation studies of cytarabine, daunorubicin, and etoposide with and without multidrug resistance modulation with PSC-833 in untreated adults with acute myeloid leukemia younger than 60 years: final induction results of Cancer and Leukemia Group B Study 9621. *J Clin Oncol.* 2004; 22:4290-301.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000; 7:1166-73.

Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood.* 1992; 80:879-86.

Kosters A, Frijters RJ, Kunne C, Vink E, Schneiders MS, Schaap FG, Nibbering CP, Patel SB, Groen AK. Diosgenin-induced biliary cholesterol secretion in mice requires Abcg8. *Hepatology.* 2005; 41:141-50.

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, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000; 6:513-9.

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

Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 304:433-5.

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.

Kutuk O, Pedrech A, Harrison P, Basaga H. Pramanicin induces apoptosis in Jurkat leukemia cells: a role for JNK, p38 and caspase activation. *Apoptosis.* 2005; 10:597-609.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 1994; 369:156-60.

L

Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science.* 1997; 278:1309-12.

Lagarde M. Metabolism of bioactive lipids. *Pathol Biol (Paris).* 2003; 51:241-3.

Landshman N, Bleiberg I. Effect of estradiol on erythropoiesis and megakaryocytopoiesis in mice. *Isr J Med Sci.* 1979; 15:140-6.

Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, Valentin-Vega YA, Terzian T, Caldwell LC, Strong LC, El-Naggar AK, Lozano G. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell.* 2004; 119:861-72.

Larribere L, Khaled M, Tartare-Deckert S, Busca R, Luciano F, Bille K, Valony G, Eyche A, Auberger P, Ortonne JP, Ballotti R, Bertolotto C. PI3K mediates protection against TRAIL-induced apoptosis in primary human melanocytes. *Cell Death Differ.* 2004; 11:1084-91.

Latagliata R, Bongarzone V, Carosino I, Mengarelli A, Breccia M, Borza PA, D'Andrea M, D'Elia GM, Mecarocci S, Morano SG, Petti MC, Mandelli F, Alimena G. Acute myelogenous leukemia in elderly patients not eligible for intensive chemotherapy: the dark side of the moon. *Ann Oncol.* 2006; 17:281-5.

Laurent G, Jaffrezou JP. Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood.* 2001; 98:913-24.

Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:9136-41.

Lee JY, Shin JW, Chun KS, Park KK, Chung WY, Bang YJ, Sung JH, Surh YJ. Antitumor promotional effects of a novel intestinal bacterial metabolite (IH-901) derived from the protopanaxadiol-type ginsenosides in mouse skin. *Carcinogenesis.* 2005; 26:359-67.

- Lee MG, Nurse P.** Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*. 1987; 327:31-5.
- Lee SM, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yoo CG.** Hypoxia confers protection against apoptosis via PI3K/Akt and ERK pathways in lung cancer cells. *Cancer Lett*. 2006 sous presse.
- Leger DY, Battu S, Liagre B, Beneytout JL, Cardot PJ.** Megakaryocyte cell sorting from diosgenin-differentiated human erythroleukemia cells by sedimentation field-flow fractionation. *Anal Biochem*. 2006a; 355:19-28.
- Leger DY, Liagre B, Beneytout JL.** Low dose leflunomide activates PI3K/Akt signalling in erythroleukemia cells and reduces apoptosis induced by anticancer agents. *Apoptosis* 2006b sous presse.
- Leger DY, Liagre B, Beneytout JL.** Role of MAPKs and NF-kappaB in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation and subsequent apoptosis in HEL cells. *Int J Oncol*. 2006c; 28:201-7.
- Leger DY, Liagre B, Cardot PJ, Beneytout JL, Battu S.** Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in human erythroleukemia cell line and sedimentation field-flow fractionation monitoring. *Anal Biochem*. 2004a; 335:267-78.
- Leger DY, Liagre B, Corbiere C, Cook-Moreau J, Beneytout JL.** Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HEL cells with increase in intracellular calcium level, activation of cPLA2 and COX-2 overexpression. *Int J Oncol*. 2004b; 25:555-62.
- Lemarchandel V, Ghysdael J, Mignotte V, Rahuel C, Romeo PH.** GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression. *Mol Cell Biol*. 1993; 13:668-76.
- Lepage A, Leboeuf M, Cazenave JP, de la Salle C, Lanza F, Uzan G.** The alpha(IIb)beta(3) integrin and GPIb-V-IX complex identify distinct stages in the maturation of CD34(+) cord blood cells to megakaryocytes. *Blood*. 2000; 96:4169-77.
- Leslie CC.** Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004; 70:373-6.
- Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB.** Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther*. 2001; 90:105-56.
- Leung MF, Sartorelli AC.** The effects of microtubule disrupting drugs on the differentiation of HL-60 leukemia cells. *Leuk Res*. 1992; 16:929-35.
- Leval X, Julemont F, Delarge J, Pirotte B, Dogne JM.** New trends in dual 5-LOX/COX inhibition. *Curr Med Chem*. 2002; 9:941-62.
- Levine AJ.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997; 88:323-31.
- 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 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.
- Liagre B, Vergne-Salle P, Corbiere C, Charissoux JL, Beneytout JL.** Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in human rheumatoid arthritis synoviocytes with cyclooxygenase-2 overexpression. *Arthritis Res Ther*. 2004; 6:373-83.
- Liagre B, Bertrand J, Leger DY, Beneytout JL.** Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in COX-2 deficient K562 cells with activation of the p38 MAP kinase signalling and inhibition of NF-kappaB binding. *Int J Mol Med*. 2005; 16:1095-101.
- Lippens S, Kockx M, Knaepen M, Mortier L, Polakowska R, Verheyen A, Garmyn M, Zwijsen A, Formstecher P, Huylebroeck D, Vandenabeele P, Declercq W.** Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ*. 2000; 7:1218-24.
- Liston P, Fong WG, Korneluk RG.** The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*. 2003; 22:8568-80.
- Liu RY, Fan C, Garcia R, Jove R, Zuckerman KS.** Constitutive activation of the JAK2/STAT5 signal transduction pathway correlates with growth factor independence of megakaryocytic leukemic cell lines. *Blood*. 1999; 93:2369-79.
- Lizard G, Miguet C, Gueldry S, Monier S, Gambert P.** Flow cytometry measurement of DNA fragmentation in the course of cell death via apoptosis. New techniques for evaluation of DNA status for the pathologist. *Ann Pathol*. 1997; 17:61-6.
- Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, et al.** Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature*. 1994; 369:565-8.
- Lozzio BB, Lozzio CB.** Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 1977; 19:136.
- Lucken-Ardjomande S, Martinou JC.** Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *C R Biol*. 2005; 328:616-31.
- Ludlow LB, Schick BP, Budarf ML, Driscoll DA, Zackai EH, Cohen A, Konkle BA.** Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ibbeta promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Biol Chem*. 1996; 271:22076-80.
- Lundberg AS, Weinberg RA.** Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*. 1998; 18:753-61.

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.

Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003; 8:115-28.

M

Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Kowalska MA, Vilaire G, Pan ZK, Honczarenko M, Marquez LA, Poncz M, Ratajczak MZ. Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood*. 2000; 96:4142-51.

Majka M, Ratajczak J, Villaire G, Kubiczek K, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Thrombopoietin, but not cytokines binding to gp130 protein-coupled receptors, activates MAPKp42/44, AKT, and STAT proteins in normal human CD34+ cells, megakaryocytes, and platelets. *Exp Hematol*. 2002; 30:751-60.

Manna SK, Aggarwal BB. Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF-dependent nuclear factor-kappa B activation and gene expression. *J Immunol*. 1999; 162:2095-102.

Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Leflunomide suppresses TNF-induced cellular responses: effects on NF-kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal protein kinase, and apoptosis. *J Immunol*. 2000; 165:5962-9.

Martelli AM, Nyakern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, Cocco L. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2006; 20:911-28.

Martin F, Prandini MH, Thevenon D, Marguerie G, Uzan G. The transcription factor GATA-1 regulates the promoter activity of the platelet glycoprotein IIb gene. *J Biol Chem*. 1993; 268:21606-12.

Martin P, Papayannopoulou T. HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science*. 1982; 216:1233-5.

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.

Martirosyan AR, Rahim-Bata R, Freeman AB, Clarke CD, Howard RL, Strobl JS. Differentiation-inducing quinolines as experimental breast cancer agents in the MCF-7 human breast cancer cell model. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68:1729-38.

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.

Masmoudi A, Chevalier TL, Sabatier L, Soria JC. Cyclooxygenase 2 inhibitors and cancer chemoprevention. *Bull Cancer*. 2004; 91 Suppl 2:S77-84.

Mathews V, George B, Lakshmi KM, Viswabandya A, Bajel A, Balasubramanian P, Shaji RV, Srivastava VM, Srivastava A, Chandy M. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity. *Blood*. 2006; 107:2627-32.

Matsumura I, Ishikawa J, Nakajima K, Oritani K, Tomiyama Y, Miyagawa J, Kato T, Miyazaki H, Matsuzawa Y, Kanakura Y. Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21(WAF1/Cip1) by STAT5. *Mol Cell Biol*. 1997; 17:2933-43.

Matsumura I, Tanaka H, Kawasaki A, Odajima J, Daino H, Hashimoto K, Wakao H, Nakajima K, Kato T, Miyazaki H, Kanakura Y. Increased D-type cyclin expression together with decreased cdc2 activity confers megakaryocytic differentiation of a human thrombopoietin-dependent hematopoietic cell line. *J Biol Chem*. 2000; 275:5553-9.

McConkey DJ, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 239:357-66.

Messmer UK, Pfeilschifter J. New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays*. 2000; 22:878-81.

Methia N, Louache F, Vainchenker W, Wendling F. Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene c-mpl specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis. *Blood*. 1993; 82:1395-401.

Missero C, Di Cunto F, Kiyokawa H, Koff A, Dotto GP. The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev*. 1996; 10:3065-75.

Miyakawa Y, Rojnuckarin P, Habib T, Kaushansky K. Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem*. 2001; 276:2494-502.

Miyoshi N, Uchida K, Osawa T, Nakamura Y. A link between benzyl isothiocyanate-induced cell cycle arrest and apoptosis: involvement of mitogen-activated protein kinases in the Bcl-2 phosphorylation. *Cancer Res*. 2004; 64:2134-42.

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*. 2001; 506:225-30.

Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol*. 2006; 16:264-72.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995; 374:131-4.

Morgan MA, Dolp O, Reuter CW. Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling. *Blood*. 2001; 97:1823-34.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65:55-63.

Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci.* 2005; 118:4589-92.

Mujoo K, Haridas V, Hoffmann JJ, Wachter GA, Hutter LK, Lu Y, Blake ME, Jayatilake GS, Bailey D, Mills GB, Gutterman JU. Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. *Cancer Res.* 2001; 61:5486-90.

Murate T, Kagami Y, Hotta T, Yoshida T, Saito H, Yoshida S. Terminal differentiation of human erythroleukemia cell line K562 induced by aphidicolin. *Exp Cell Res.* 1990; 191:45-50.

N

Nadel JA, Conrad DJ, Ueki IF, Schuster A, Sigal E. Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells. *J Clin Invest.* 1991; 87:1139-45.

Nagata Y, Muro Y, Todokoro K. Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J Cell Biol.* 1997; 139:449-57.

Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, Todokoro K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood.* 1998; 92:1859-69.

Nagata Y, Yoshikawa J, Hashimoto A, Yamamoto M, Payne AH, Todokoro K. Proplatelet formation of megakaryocytes is triggered by autocrine-synthesized estradiol. *Genes Dev.* 2003; 17:2864-9.

Najman A. Cas cliniques en hématologie. Paris : Flammarion médecine-sciences, 1994, 124 p.

Nervi F, Marinovic I, Rigotti A, Ulloa N. Regulation of biliary cholesterol secretion. Functional relationship between the canalicular and sinusoidal cholesterol secretory pathways in the rat. *J Clin Invest.* 1988; 82:1818-25.

Niculescu AB 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:629-43.

Nie D, Honn KV. Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59:799-807.

O

Obaya AJ, Sedivy JM. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59:126-42.

Oda M, Kurasawa Y, Todokoro K, Nagata Y. Thrombopoietin-induced CXC chemokines, NAP-2 and PF4, suppress polyploidization and proplatelet formation during megakaryocyte maturation. *Genes Cells.* 2003; 8:9-15.

Odell TT Jr, Jackson CW. Polyploidy and maturation of rat megakaryocytes. *Blood.* 1968; 32:102-10.

O'Gorman DM, McKenna SL, McGahon AJ, Knox KA, Cotter TG. Sensitisation of HL60 human leukaemic cells to cytotoxic drug-induced apoptosis by inhibition of PI3-kinase survival signals. *Leukemia.* 2000; 14:602-11.

Ogura M, Morishima Y, Ohno R, Kato Y, Hirabayashi N, Nagura H, Saito H. Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1985; 66:1384-92.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4:552-65.

Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 2004; 9:667-76.

Osiri M, Shea B, Robinson V, Suarez-Almazor M, Strand V, Tugwell P, Wells G. Leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *J Rheumatol.* 2003; 30:1182-90.

Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis.* 2002; 7:335-45.

Ozoren N, El-Deiry WS. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia.* 2002; 4:551-7.

P

Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 1992; 11:961-71.

Pallard C, Gouilleux F, Benit L, Cocault L, Souyri M, Levy D, Groner B, Gisselbrecht S, Dusanter-Fourt I. Thrombopoietin activates a STAT5-like factor in hematopoietic cells. *EMBO J.* 1995; 14:2847-56.

Pang L, Weiss MJ, Poncz M. Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin Invest.* 2005; 115:3332-8.

Papayannopoulou T, Yokochi T, Nakamoto B, Martin P. The surface antigen profile of HEL cells. *Prog Clin Biol Res.* 1983; 134:277-92.

Park JH, Oh EJ, Choi YH, Kang CD, Kang HS, Kim DK, Kang KI, Yoo MA. Synergistic effects of dexamethasone and genistein on the expression of Cdk inhibitor p21WAF1/CIP1 in human hepatocellular and colorectal carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2001; 18:997-1002.

Park JI, Choi HS, Jeong JS, Han JY, Kim IH. Involvement of p38 kinase in hydroxyurea-induced differentiation of K562 cells. *Cell Growth Differ.* 2001; 12:481-6.

Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 2005; 115:3348-54.

Paulus JM, Debili N, Larbret F, Levin J, Vainchenker W. Thrombopoietin responsiveness reflects the number of doublings undergone by megakaryocyte progenitors. *Blood.* 2004; 104: 2291-8.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; 22:153-83.

Perisic O, Paterson HF, Mosedale G, Lara-Gonzalez S, Williams RL. Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem.* 1999; 274:14979-87.

Peter M, Nakagawa J, Doree M, Labbe JC, Nigg EA. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell.* 1990; 61:591-602.

Peters JM. Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res.* 1999; 248:339-49.

Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med.* 2004; 8:432-44.

Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood.* 2003; 101:4667-79.

Pommier Y, Kohn KW. Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets. *Med Sci (Paris).* 2003; 19:173-86.

Ponzoni M, Bocca P, Chiesa V, Decensi A, Pistoia V, Raffaghello L, Rozzo C, Montaldo PG. Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer Res.* 1995; 55:853-61.

Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6:99-104.

Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* 2000; 2:291-9.

Pulverer BJ, Hughes K, Franklin CC, Kraft AS, Leever SJ, Woodgett JR. Co-purification of mitogen-activated protein kinases with phorbol ester-induced c-Jun kinase activity in U937 leukaemic cells. *Oncogene.* 1993; 8:407-15.

R

Racke FK, Lewandowska K, Goueli S, Goldfarb AN. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Biol Chem.* 1997; 272:23366-70.

- Radley JM, Haller CJ.** The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*. 1982; 60:213-9.
- Radley JM, Haller CJ.** Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br J Haematol*. 1983; 53:277-87.
- Raju J, Patlolla JM, Swamy MV, Rao CV.** Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13:1392-8.
- Ramos AM, Fernandez C, Amran D, Sancho P, de Blas E, Aller P.** Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukemia cells. *Blood*. 2005; 105:4013-20.
- Raslova H, Roy L, Vourc'h C, Le Couedic JP, Brison O, Metivier D, Feunteun J, Kroemer G, Debili N, Vainchenker W.** Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood*. 2003; 101:541-4.
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G.** Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol*. 2002; 192:131-7.
- Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR.** Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol*. 2002; 190:7-20.
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA.** The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004; 117:1281-3.
- Reddy J, Shivapurkar N, Takahashi T, Parikh G, Stastny V, Echebiri C, Crumrine K, Zochbauer-Muller S, Drach J, Zheng Y, Feng Z, Kroft SH, McKenna RW, Gazdar AF.** Differential methylation of genes that regulate cytokine signaling in lymphoid and hematopoietic tumors. *Oncogene*. 2005; 24:732-6.
- Reschiglian P, Zattoni A, Roda B, Michelini E, Roda A.** Field-flow fractionation and biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2005; 23:475-83.
- Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE Jr.** Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*. 2005; 106:4066-75.
- Richmond A.** Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:664-74.
- Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA.** A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:3003-7.
- Richon VM, Webb Y, Merger R, Sheppard T, Jursic B, Ngo L, Civoli F, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA.** Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:5705-8.

Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5:897-907.

Rodrigues S, Bruyneel E, Rodrigue CM, Shahin E, Gespach C. Cyclooxygenase 2 and carcinogenesis. *Bull Cancer.* 2004; 91 Suppl 2:S61-76.

Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 1999; 13:3179-84.

Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood.* 1999; 94:1273-82.

Rojnuckarin P, Kaushansky K. Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha. *Blood.* 2001; 97:154-61.

Romano MF, Petrella A, Bisogni R, Turco MC, Venuta S. Effect of NF-kappaB/Rel inhibition on spontaneous vs chemotherapy-induced apoptosis in AML and normal cord blood CD34+ cells. *Leukemia.* 2003; 17:1190-2.

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.

Rouyez MC, Boucheron C, Gisselbrecht S, Dusanter-Fourt I, Porteu F. Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 1997; 17:4991-5000.

Roy L, Coullin P, Vitrat N, Hellio R, Debili N, Weinstein J, Bernheim A, Vainchenker W. Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal metaphase/anaphase checkpoint in polyploid megakaryocytes. *Blood.* 2001; 97:2238-47.

Ruchatz H, Coluccia AM, Stano P, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C. Constitutive activation of Jak2 contributes to proliferation and resistance to apoptosis in NPM/ALK-transformed cells. *Exp Hematol.* 2003; 31:309-15.

Ruckemann K, Fairbanks LD, Carrey EA, Hawrylowicz CM, Richards DF, Kirschbaum B, Simmonds HA. Leflunomide inhibits pyrimidine de novo synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans. *J Biol Chem.* 1998; 273:21682-91.

S

Sabapathy K, Wagner EF. JNK2: a negative regulator of cellular proliferation. *Cell Cycle.* 2004; 3:1520-3.

Sachs L. Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. *Nature.* 1978; 274:535-9.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004; 23:2861-74.

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.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:10964-7.

Samejima K, Tone S, Earnshaw WC. CAD/DFP40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276:45427-32.

Sampath D, Cortes J, Estrov Z, Du M, Shi Z, Andreeff M, Gandhi V, Plunkett W. Pharmacodynamics of cytarabine alone and in combination with 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in AML blasts in vitro and during a clinical trial. *Blood.* 2006; 107:2517-24.

Sanz C, Benet I, Richard C, Badia B, Andreu EJ, Prosper F, Fernandez-Luna JL. Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes. *Exp Hematol.* 2001; 29:728-35.

Sattler M, Salgia R, Durstin MA, Prasad KV, Griffin JD. Thrombopoietin induces activation of the phosphatidylinositol-3' kinase pathway and formation of a complex containing p85PI3K and the protooncogene p120CBL. *J Cell Physiol.* 1997; 171:28-33.

Sawafuji K, Miyakawa Y, Kizaki M, Ikeda Y. Cyclosporin A induces erythroid differentiation of K562 cells through p38 MAPK and ERK pathways. *Am J Hematol.* 2003; 72:67-9.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998; 17:1675-87.

Schick PK, Konkle BA, He X, Thornton RD. P-selectin mRNA is expressed at a later phase of megakaryocyte maturation than mRNAs for von Willebrand factor and glycoprotein Ib-alpha. *J Lab Clin Med.* 1993; 121:714-21.

Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 2004; 11 Suppl 1:S45-55.

Schmitt A, Guichard J, Masse JM, Debili N, Cramer EM. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol.* 2001; 29:1295-302.

Schulze H, Korpai M, Hurov J, Kim SW, Zhang J, Cantley LC, Graf T, Shivdasani RA. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood.* 2006; 107:3868-75.

Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE Jr, Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol.* 2001; 11:579-86.

- Sébahoun G.** Hématologie clinique et biologique 2e éd. Rueil-Malmaison : Arnette, 2005, 578 p.
- Secchiero P, Melloni E, Heikinheimo M, Mannisto S, Di Pietro R, Iacone A, Zauli G.** TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood*. 2004; 103:517-22.
- Sherr CJ, Roberts JM.** Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 1995; 9:1149-63.
- Sherr CJ.** D-type cyclins. *Trends Biochem Sci*. 1995; 20:187-90.
- 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.
- 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.
- Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y.** Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem*. 2000; 275:12321-5.
- Shiohara M, Uskokovic M, Hisatake J, Hisatake Y, Koike K, Komiyama A, Koeffler HP.** 24-Oxo metabolites of vitamin D3 analogues: disassociation of their prominent antileukemic effects from their lack of calcium modulation. *Cancer Res*. 2001; 61:3361-8.
- Shishodia S, Aggarwal BB.** Guggulsterone inhibits NF-kappaB and IkappaBalpha kinase activation, suppresses expression of anti-apoptotic gene products, and enhances apoptosis. *J Biol Chem*. 2004; 279:47148-58.
- Shishodia S, Aggarwal BB.** Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, I kappa B kinase activation and NF-kappa B-regulated gene expression. *Oncogene*. 2006; 25:1463-73.
- Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH.** A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J*. 1997; 16:3965-73.
- Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris CJ, Orkin SH.** Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*. 1995; 81:695-704.
- Shivdasani RA.** Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells*. 2001; 19:397-407.
- Sidell N, Altman A, Haussler MR, Seeger RC.** Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res*. 1983; 148:21-30.

- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K.** Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol.* 1994; 10:405-55.
- Singh SV, Zeng Y, Xiao D, Vogel VG, Nelson JB, Dhir R, Tripathi YB.** Caspase-dependent apoptosis induction by guggulsterone, a constituent of Ayurvedic medicinal plant *Commiphora mukul*, in PC-3 human prostate cancer cells is mediated by Bax and Bak. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4:1747-54.
- 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 WL, DeWitt DL, Garavito RM.** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69:145-82.
- Smits VA, Medema RH.** Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1519:1-12.
- Soldani C, Scovassi AI.** Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis.* 2002; 7:321-8.
- Song LN, Cheng T.** Glucocorticoid-induced growth inhibition and differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line: involvement of glucocorticoid receptor. *Stem Cells.* 1993; 11:312-8.
- 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.
- Spodnik JH, Wozniak M, Budzko D, Teranishi MA, Karbowski M, Nishizawa Y, Usukura J, Wakabayashi T.** Mechanism of leflunomide-induced proliferation of mitochondria in mammalian cells. *Mitochondrion.* 2002; 2:163-79.
- Srinivasa SP, Doshi PD.** Extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways cooperate in mediating cytokine-induced proliferation of a leukemic cell line. *Leukemia.* 2002; 16:244-53.
- 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.
- Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, el-Houseini ME.** Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene.* 1994; 9:3389-96.
- Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF.** Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science.* 1994; 264:1463-7.
- Sun S, Zimmet JM, Toselli P, Thompson A, Jackson CW, Ravid K.** Overexpression of cyclin D1 moderately increases ploidy in megakaryocytes. *Haematologica.* 2001; 86:17-23.

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, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:8662-7.

T

Tablin F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci*. 1990; 97:59-70.

Takagaki K, Katsuma S, Kaminishi Y, Horio T, Tanaka T, Ohgi T, Yano J. Role of Chk1 and Chk2 in Ara-C-induced differentiation of human leukemia K562 cells. *Genes Cells*. 2005; 10:97-106.

Takagaki N, Sowa Y, Oki T, Nakanishi R, Yogosawa S, Sakai T. Apigenin induces cell cycle arrest and p21/WAF1 expression in a p53-independent pathway. *Int J Oncol*. 2005; 26:185-9.

Tam LS, Li EK, Wong CK, Lam CW, Szeto CC. Double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of leflunomide in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004; 13:601-4.

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Ueki K, Izumi T, Chatani Y, Kohno M, Kasuga M, Yazaki Y, Akanuma Y. Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1992; 267:20293-7.

Tanaka T, Kurokawa M, Ueki K, Tanaka K, Imai Y, Mitani K, Okazaki K, Sagata N, Yazaki Y, Shibata Y, Kadowaki T, Hirai H. The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability. *Mol Cell Biol*. 1996; 16:3967-79.

Taniguchi T, Endo H, Chikatsu N, Uchimaru K, Asano S, Fujita T, Nakahata T, Motokura T. Expression of p21(Cip1/Waf1/Sdi1) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood*. 1999; 93:4167-78.

Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001; 20:1803-15.

Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:89-101.

- Terada Y.** Role of chromosomal passenger complex in chromosome segregation and cytokinesis. *Cell Struct Funct.* 2001; 26:653-7.
- Terui K, Takahashi Y, Kitazawa J, Toki T, Yokoyama M, Ito E.** Expression of transcription factors during megakaryocytic differentiation of CD34+ cells from human cord blood induced by thrombopoietin. *Tohoku J Exp Med.* 2000; 192:259-73.
- Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267:1456-62.
- Thompson JE, Thompson CB.** Putting the rap on Akt. *J Clin Oncol.* 2004; 22:4217-26.
- Thornberry NA, Lazebnik Y.** Caspases: enemies within. *Science.* 1998; 281:1312-6.
- Thornberry NA.** Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol.* 1998; 5:97-103.
- Tombal B, Denmeade SR, Gillis JM, Isaacs JT.** A supramicromolar elevation of intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) is consistently required to induce the execution phase of apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002; 9:561-73.
- Tortolani PJ, Johnston JA, Bacon CM, McVicar DW, Shimosaka A, Linnekin D, Longo DL, O'Shea JJ.** Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of the Janus kinase, JAK2. *Blood.* 1995; 85:3444-51.
- Towatari M, Iida H, Tanimoto M, Iwata H, Hamaguchi M, Saito H.** Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells. *Leukemia.* 1997; 11:479-84.
- Tratner I.** The efficacy of the politics of prevention and screening in the fight against cancer. *Med Sci (Paris).* 2003; 19:368-70.
- Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, Crossley M, Orkin SH.** FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell.* 1997; 90:109-19.
- Tsiftoglou AS, Pappas IS, Vizirianakis IS.** Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther.* 2003; 100:257-90.
- Tsuji M, DuBois RN.** Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 1995; 83:493-501.
- U**
- Uddin S, Ah-Kang J, Ulaszek J, Mahmud D, Wickrema A.** Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:147-52.
- 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 Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenaabeele 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, Drillenburger 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.

Vergne-Salle P, Leger DY, Bertin P, Treves R, Beneytout JL, Liagre B. Effects of the active metabolite of leflunomide, A77 1726, on cytokine release and the MAPK signalling pathway in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Cytokine.* 2005; 31:335-48.

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.

Verma A, Mohindru M, Deb DK, Sassano A, Kambhampati S, Ravandi F, Minucci S, Kalvakolanu DV, Plataniotis LC. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to arsenic trioxide. *J Biol Chem.* 2002; 277:44988-95.

Vial JP, Praloran V. Hématopoïèse et sa régulation dans Hématologie clinique et biologique 2e éd. Rueil-Malmaison : Arnette, 2005, p. 9-16.

Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, Le Couedic JP, Norol F, Larsen AK, Katz A, Vainchenker W, Debili N. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood.* 1998; 91:3711-23.

W

Wang D, Li H, Yuan H, Zheng M, Bai C, Chen L, Pei X. Humanin delays apoptosis in K562 cells by downregulation of P38 MAP kinase. *Apoptosis.* 2005; 10:963-71.

Wang JF, Liu ZY, Gropman JE. The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood.* 1998; 92:756-64.

Wang X, Crispino JD, Letting DL, Nakazawa M, Poncz M, Blobel GA. Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors. *EMBO J.* 2002a; 21:5225-34.

Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2002b; 298:1587-92.

Wang Z, Zhang Y, Kamen D, Lees E, Ravid K. Cyclin D3 is essential for megakaryocytopoiesis. *Blood*. 1995; 86:3783-8.

Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*. 2000; 95:19-29.

Weil M, Raff MC, Braga VM. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol*. 1999; 9:361-4.

Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin*. 1994; 44:160-70.

Weiss MJ, Orkin SH. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:9623-7.

Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, Cordon-Cardo C, Pelletier J, Lowe SW. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature*. 2004; 428:332-7.

West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat*. 2002; 5:234-48.

Whalen AM, Galasinski SC, Shapiro PS, Nahreini TS, Ahn NG. Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol*. 1997; 17:1947-58.

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.

Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem*. 1998; 273:7141-7.

Witt O, Sand K, Pekrun A. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood*. 2000; 95:2391-6.

Woo EJ, Kim YG, Kim MS, Han WD, Shin S, Robinson H, Park SY, Oh BH. Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Mol Cell*. 2004; 14:531-9.

Wood W, Turmaine M, Weber R, Camp V, Maki RA, McKercher SR, Martin P. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development*. 2000; 127:5245-52.

X

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995; 270:1326-31.

Xu X, Shen J, Mall JW, Myers JA, Huang W, Blinder L, Saclarides TJ, Williams JW, Chong AS. In vitro and in vivo antitumor activity of a novel immunomodulatory drug, leflunomide: mechanisms of action. *Biochem Pharmacol*. 1999; 58:1405-13.

Xu X, Williams JW, Bremer EG, Finnegan A, Chong AS. Inhibition of protein tyrosine phosphorylation in T cells by a novel immunosuppressive agent, leflunomide. *J Biol Chem*. 1995; 270:12398-403.

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. *Hepatology Res*. 2003; 25:287-295.

Yamamoto S, Suzuki H, Ueda N. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prog Lipid Res*. 1997; 36:23-41.

Yan Y, Verbeken E, Yu L, Rutgeerts O, Goebels J, Segers C, Lin Y, Waer M. Effects of a short course of leflunomide on T-independent B-lymphocyte xenoreactivity and on susceptibility of xenografts to acute or chronic rejection. *Transplantation*. 2005; 79:135-41.

Yang YW, Chang YH. Induction of erythroid differentiation by 5-fluorouracil in K562 leukemia cells. *Jpn J Cancer Res*. 1995; 86:948-55.

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.

Yen ML, Su JL, Chien CL, Tseng KW, Yang CY, Chen WF, Chang CC, Kuo ML. Diosgenin induces hypoxia-inducible factor-1 activation and angiogenesis through estrogen receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Mol Pharmacol*. 2005; 68(4):1061-73.

Yoshimoto T, Takahashi Y. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002; 68-69:245-62.

Yu C, Subler M, Rahmani M, Reese E, Krystal G, Conrad D, Dent P, Grant S. Induction of apoptosis in BCR/ABL+ cells by histone deacetylase inhibitors involves reciprocal effects on the RAF/MEK/ERK and JNK pathways. *Cancer Biol Ther*. 2003; 2:544-51.

Yu C, Wang S, Dent P, Grant S. Sequence-dependent potentiation of paclitaxel-mediated apoptosis in human leukemia cells by inhibitors of the mitogen-activated protein kinase/ mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Pharmacol*. 2001; 60:143-54.

Yu HM, Zhi JL, Cui Y, Tang EH, Sun SN, Feng JQ, Chen PX. Role of the JAK-STAT pathway in protection of hydrogen peroxide preconditioning against apoptosis induced by oxidative stress in PC12 cells. *Apoptosis*. 2006; 11:931-941.

Yu L, Gupta S, Xu F, Liverman AD, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Repa JJ, Hobbs HH, Cohen JC. Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. *J Biol Chem*. 2005; 280:8742-7.

Z

Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2:67-71.

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med*. 1995; 181:1661-72.

Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 2005; 15:11-8.

Zauli G, Vitale M, Falcieri E, Gibellini D, Bassini A, Celeghini C, Columbaro M, Capitani S. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood*. 1997; 90:2234-43.

Zhang P, Wong C, Liu D, Finegold M, Harper JW, Elledge SJ. p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev*. 1999; 13:213-24.

Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 2002; 12:9-18.

Zhang Y, Sun S, Wang Z, Thompson A, Kaluzhny Y, Zimmet J, Ravid K. Signaling by the Mpl receptor involves IKK and NF-kappaB. *J Cell Biochem*. 2002; 85:523-35.

Zhang Y, Wang Z, Ravid K. The cell cycle in polyploid megakaryocytes is associated with reduced activity of cyclin B1-dependent cdc2 kinase. *J Biol Chem*. 1996; 271:4266-72.

Zheng X, Ravatn R, Lin Y, Shih WC, Rabson A, Strair R, Huberman E, Conney A, Chin KV. Gene expression of TPA induced differentiation in HL-60 cells by DNA microarray analysis. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30:4489-99.

Zimmet JM, Ladd D, Jackson CW, Stenberg PE, Ravid K. A role for cyclin D3 in the endomitotic cell cycle. *Mol Cell Biol*. 1997; 17:7248-59.

Zon LI, Yamaguchi Y, Yee K, Albee EA, Kimura A, Bennett JC, Orkin SH, Ackerman SJ. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood*. 1993; 81:3234-41.

Zucker RM, Whittington KB, Decal DL. The effect of glutathione on HL-60 treated with dimethylsulfoxide, butyric acid or 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *FEBS Lett*. 1983; 155:107-12.

Table des Matières

Sommaire.....	7
Publications élaborées au cours de la thèse	9
Liste des abréviations	11
INTRODUCTION.....	16
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I- Les cancers	20
1. Généralités et origine	20
2. Les cellules cancéreuses	20
2.1. Les proto-oncogènes	21
2.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes.....	22
2.3. Les gènes de réparation de l'ADN.....	22
3. Les leucémies	23
4. Les leucémies myéloïdes.....	23
4.1. Les leucémies myéloïdes chroniques (LMC).....	24
4.2. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM).....	26
II- Le cycle cellulaire.....	29
1. Généralités (<i>Omnis cellula e cellula</i> , toutes les cellules proviennent de cellules, R Virchow)	29
2. Régulation du cycle cellulaire.....	30
2.1. Régulation du cycle par les complexes cyclines/CDK.....	31
2.2. Régulation des complexes cycline/CDK par les inhibiteurs de CDK.....	34
III. Apoptose	36
1. Généralités sur l'apoptose	36
1.1. Historique et définition de l'apoptose.....	36
1.2. Rôle physiologique de l'apoptose	36
1.3. Caractéristiques des cellules apoptotiques	37
1.4. Pathologies et dérégulations de l'apoptose.....	38
2. Les voies d'induction de l'apoptose	39
2.1. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque.....	39
2.2. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque	42
a. Origine des perturbations membranaires observées dans l'apoptose induite par la voie mitochondriale	43
b. Les SIMPs et leur rôle dans l'exécution de la voie mitochondriale de l'apoptose	46
2.3. La voie dépendante du réticulum endoplasmique	50

3. Les effecteurs de l'apoptose : les caspases	50
3.1. Structure et activation des caspases	51
3.2. Les différentes classes de caspases	52
3.3. Principaux substrats des caspases et conséquences de leur clivage.....	54
3.4 La régulation des caspases	55
4. Les membres de la famille Bcl-2	56
4.1. Structure	56
4.2. Mode d'action et rôle dans les processus apoptotiques.....	58
a. Les facteurs de survie de type Bcl-2	58
b. Les facteurs de mort de type Bax.....	59
c. Les facteurs de mort à BH3-only	59
IV- La thérapie de différenciation.....	62
1. Généralités	62
2. La thérapie de différenciation des leucémies.....	63
3.1. L'acide rétinoïque	64
3.2. La vitamine D ₃ et ses analogues	65
3.3. Les esters de phorbol	65
3.4. Les inhibiteurs des histones désacétylases	66
3.5. Les agents chimiothérapeutiques classiques	66
V- La mégacaryocytopoïèse.....	68
1. L'hématopoïèse.....	68
1.1. Les différents compartiments de l'hématopoïèse	68
a. Le compartiment des cellules souches	68
b. Le compartiment des progéniteurs.....	70
c. Le compartiment des précurseurs	70
d. Le compartiment des cellules matures.....	71
1.2. Régulation de l'hématopoïèse	71
2. La mégacaryocytopoïèse	72
2.1. Définition	72
2.2 Le déroulement de la mégacaryocytopoïèse.....	72
a. Le compartiment des progéniteurs.....	72
b. L'endomitose	73
c. La maturation cytoplasmique et membranaire	78
d. Les différents stades de maturation des mégacaryocytes.....	79
2.3. Formation et libération des plaquettes	82
a. Formation des plaquettes	82
b. Libération des plaquettes.	84
c. Rôle des régulateurs de l'apoptose	84
2.4. Régulation de la mégacaryocytopoïèse	85
a. Régulation par les cytokines	86
La thrombopoïétine	86
Les chimiokines SDF-1 et PF4	89

	304
b. Régulation par les facteurs de transcription	89
Le complexe GATA/FOG	89
Le facteur de transcription Fli-1	90
Le facteur de transcription p45 NF-E2	91
VI- Transduction du signal	92
1. La voie des MAPKs	92
1.1 La voie de ERK	93
1.2 La voie de JNK	93
1.3 La voie de p38	95
2. La voie PI3K/Akt	96
3. La voie JAK/STAT	96
4. L'activation du facteur de transcription NFκB	99
5. Voies de transduction du signal impliquées dans la différenciation mégacaryocytaire	101
6. Voies de transduction du signal impliquées dans la régulation de l'apoptose des cellules leucémiques	104
VII- Les stéroïdes végétaux	108
VIII- Le métabolisme de l'acide arachidonique	111
1. L'acide arachidonique (AA) et la phospholipase A ₂	111
2. Les lipoxgénases ou LOX	112
3. Les cyclooxygénases ou COX	115
IX- Le Léflunomide	121
MATERIELS ET METHODES	123
I- Lignées cellulaires, culture et traitements	124
II- Etude de la prolifération des cellules leucémiques	125
1. Etude de la prolifération par le test au MTT	125
2. Etude de la morphologie des cellules traitées à la diosgénine par microscopie optique à contraste de phase	126
III- Analyse de la quantité d'ADN (niveau de ploïdie) par cytométrie en flux ..	127
IV- Analyse de l'expression des protéines par Western Blot	128
1. Extraction des protéines	128
1.1. Extraction des protéines totales	128
1.2. Extraction des protéines cytosoliques et membranaires	128
2. Analyses de l'expression des protéines	129
V- Etude du potentiel membranaire mitochondrial	130

VI- Etude de l'activation de la caspase-3.....	131
VII- Etude de l'exposition de la phosphatidylsérine au cours de l'apoptose ..	132
VIII- Analyse qualitative de la fragmentation de l'ADN.....	133
IX- Mesure de la concentration en calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$.....	134
X- Suivi spécifique de la différenciation mégacaryocytaire.....	135
1. Suivi de la différenciation en microscopie optique	136
2. Suivi de la différenciation en microscopie électronique	136
3. Marquages membranaires du CD41 et de la glycophorine A	136
XI- Analyse de l'activation des MAP Kinases	137
1. Analyse quantitative des formes phosphorylées des MAP Kinases ERK, p38 et JNK.....	137
2. Analyse de la phosphorylation de ERK par cytométrie en flux	138
XII- Préparation des extraits nucléaires et étude de l'activation de NF-κB par des analyses de retard sur gel.....	139
1. Préparation des extraits nucléaires.....	139
2. Analyse de retard sur gel	140
XIII- Etude de l'activité COX-2 par dosage de la PGE2.....	141
XIV- Analyse de l'expression des ARNm de certains marqueurs de différenciation mégacaryocytaire	142
1. Extraction des ARNs totaux	142
2. Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire	143
XV- Utilisation du modèle HEL/diosgénine en SdFFF	144
1. Principe de la SdFFF (sedimentation field flow fractionation).....	144
2. Etude de l'induction de l'apoptose par la diosgénine en SdFFF.....	147
3. Etude de l'induction de la différenciation mégacaryocytaire par la diosgénine en SdFFF	148
4. Détermination du diamètre des cellules éluées par SdFFF	148
5. Tri de population différenciées à la diosgénine par SdFFF	148
XIV-Statistiques	149
RÉSULTATS	150
I- Effets pro-apoptotiques de la diosgénine sur les cellules HEL.....	152
1. Prolifération cellulaire.....	152
1.1. Etude de la prolifération cellulaire par le test au MTT	152

1.2. Observation microscopique des cellules traitées par 40 μM de diosgénine pendant 24h ..	153
2. Etude du cycle cellulaire des cellules traitées à la diosgénine 40 μM	154
2.1. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux	154
2.2. Etude des effets de 40 μM de diosgénine sur les régulateurs du cycle cellulaire p53 et p21	156
3. Etude de l'apoptose induite par la diosgénine dans les cellules HEL.....	157
3.1. Chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) après traitement à la diosgénine 40 μM	157
3.2. Augmentation du taux de calcium intracellulaire [Ca^{2+}] _i	159
3.3. Etude du ratio d'expression des protéines Bax et Bcl-2 après traitement des cellules HEL par la diosgénine 40 μM	160
3.4. Activation de la caspase-3.....	161
3.5. Etude du clivage de la Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) dans les cellules HEL traitées à la diosgénine 40 μM	162
3.6. Analyse de la fragmentation de l'ADN après traitement des cellules HEL à la diosgénine 40 μM	162
4. Etude des voies de transduction du signal modulées après traitement par la dose apoptotique de diosgénine.	164
4.1. Activation des voies de JNK et p38	164
4.2. Inhibition des voies de Erk et PI3K/Akt.....	166
4.3. Inhibition de l'activation du facteur de transcription NF κ B.....	167
5. Etude du métabolisme de l'acide arachidonique sous diosgénine 40 μM	169
5.1. Activation de la cPLA ₂ après traitement à la diosgénine 40 μM	169
5.2. Etude de l'expression et de l'activité de la cyclooxygénase-2 dans les cellules HEL traitées par 40 μM de diosgénine	170
6. Suivi de l'induction de l'apoptose par SdFFF.....	172
II- Effets pro-différenciants de la diosgénine sur les cellules HEL.....	174
1. Prolifération cellulaire.....	174
1.1. Etude de la prolifération cellulaire par le test au MTT	174
1.2. Observation microscopique des cellules traitées par 10 μM de diosgénine pendant 48h ..	175
2. Etude de la différenciation induite par la diosgénine à 10 μM	176
2.1. Induction de la polyploïdisation des cellules HEL traitées par 10 μM de diosgénine.....	176
2.2. Etude de la réponse de régulateurs du cycle cellulaire au cours de la différenciation mégacaryocytaire induite par 10 μM de diosgénine.....	177
2.3. Etude de l'expression de marqueurs de différenciation mégacaryocytaire à la surface des cellules HEL traitées à la diosgénine 10 μM	179
2.4. Evolution des cellules différenciées par la diosgénine	181
2.5. Rôle des facteurs apoptotiques lors de la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine.....	184
3. Etude des voies de transduction du signal modulées après traitement par la dose différenciante de diosgénine.	186

3.1. Activation de la voie de ERK et rôle dans la polyploïdisation des cellules HEL traitées par 10 μ M de diosgénine	186
3.2. Inhibition des voies p38 et JNK	187
3.3. Inhibition de la voie PI3K/Akt et de l'activation du facteur de transcription NF κ B	189
4. Contribution de la SdFFF à l'étude de la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL ...	190
4.1. Suivi de la différenciation des cellules HEL par SdFFF	191
4.2. Tri de population cellulaires différenciées à la diosgénine par SdFFF.....	195
4.3. Tri de populations cellulaires après 24h d'exposition à la diosgénine et évolution de ces cellules après remise en culture	201
III- Modulation par le léflunomide de l'apoptose induite dans les cellules érythroleucémiques HEL et K562	209
1. Prolifération cellulaire et viabilité.....	209
1.1. Prolifération et viabilité des cellules HEL.....	209
1.2. Prolifération et viabilité des cellules K562	214
1.3. Prolifération et viabilité des cellules Meg-01	215
2. Modulation de l'activation des MAPKs dans les cellules leucémiques traitées au léflunomide 10 μ M	218
2.1. Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules HEL	218
2.2. Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules K562.....	221
2.3. Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules Meg-01	223
3. Effet du léflunomide sur l'activation du facteur de transcription NF κ B	225
4. Effet du léflunomide 10 μ M sur l'activation de la voie PI3K/Akt.....	227
5. Diminution par 10 μ M de léflunomide de l'apoptose induite par divers agents pro-apoptotiques	229
5.1. Etude des effets du léflunomide sur l'apoptose induite dans les cellules K562	229
5.2. Etude des effets du léflunomide 10 μ M sur l'apoptose induite dans les cellules HEL	230
a. Effets du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN induite après traitement avec les agents pro-apoptotiques.....	231
b. Effets du léflunomide sur l'exposition de la phosphatidylsérine après traitement avec divers inducteurs de l'apoptose.....	232
c. Rôle de la voie PI3K/Akt dans l'effet protecteur du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN après traitement des cellules HEL avec des inducteurs de l'apoptose.....	235
d. Effet protecteur du léflunomide vis-à-vis de l'activation de la caspase-3. Rôle de la voie PI3K/Akt.....	236
e. Effets du léflunomide vis-à-vis de l'apoptose induite par la diosgénine 40 μ M.....	238
DISCUSSION.....	239
I- Effets de la diosgénine sur les cellules HEL	240
II- Effets du léflunomide sur la prolifération et la survie de cellules leucémiques traitées par différents inducteurs de mort.....	255

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	261
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	266
Table des Matières	302
Liste des tableaux	309
Liste des figures.....	309
ANNEXES	313

Liste des tableaux

Tableau 1	28
Tableau RII-1.....	180
Tableau RII-2.....	192
Tableau RII-3.....	194

Liste des figures

Figure RI-1 : Effets de la diosgénine sur la prolifération des cellules HEL.	153
Figure RI-2 : Observation en microscopie optique des cellules HEL traitées à la diosgénine 40 μ M pendant 24h (grossissement x 400).	154
Figure RI-3 : Effets de 40 μ M de diosgénine sur le cycle cellulaire des cellules HEL.....	155
Figure RI-4 : Effets de la diosgénine 40 μ M sur l'expression des protéines p53, phospho-p53 et p21 régulant le cycle cellulaire.....	156
Figure RI-5 : Etude de la chute du potentiel mitochondrial après traitement des cellules HEL par 40 μ M de diosgénine.....	158
Figure RI-6 : Variations du taux de calcium intracellulaire après traitement par 40 μ M de diosgénine.....	159
Figure RI-7 : Analyse de l'expression des protéines Bax et Bcl-2 dans les cellules HEL après traitement à la diosgénine 40 μ M.....	160
Figure RI-8 : Etude de l'activité de la caspase-3 après traitement des cellules à la diosgénine 40 μ M.....	161
Figure RI-9 : Etude du clivage de la PARP après traitement des cellules HEL par 40 μ M de diosgénine.....	162
Figure RI-10 : Analyse de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HEL traitées par 40 μ M de diosgénine.....	163
Figure RI-11 : Activation transitoire des voies de JNK et p38 après traitement à la diosgénine 40 μ M.....	165
Figure RI-12 : Inhibition des voies de ERK et PI3K/Akt après traitement à la diosgénine 40 μ M.....	167
Figure RI-13 : Inhibition de l'activation de NF κ B après traitement à la diosgénine 40 μ M.	168
Figure RI-14 : Activation de la cPLA ₂ après traitement à la diosgénine 40 μ M.	170
Figure RI-15 : Etude de l'expression et de l'activité de la COX-2 dans les cellules HEL traitées à la diosgénine 40 μ M.	171
Figure RI-16 : Evolution des fractogrammes obtenus après passage en SdFFF des cellules traitées à la diosgénine 40 μ M.	173
Figure RII-1 : Effets de la diosgénine 10 μ M sur la prolifération des cellules HEL.	174
Figure RII-2 : Observation en microscopie optique des cellules HEL traitées à la diosgénine 10 μ M pendant 48h (grossissement x 200).	175
Figure RII-3 : Evolution de la ploïdie des cellules HEL traitées par 10 μ M de diosgénine. .	177

Figure RII-4 : Etude de l'expression de régulateurs du cycle cellulaire au cours de la polyploïdisation induite par la diosgénine 10 μ M.....	178
Figure RII-5 : Expression membranaire du CD41 et de la glycophorine A au cours de la différenciation induite par 10 μ M de diosgénine.	180
Figure RII-6 : Evolution morphologiques des cellules HEL induites par 10 μ M de diosgénine.	181
Figure RII-7 : Vues en microscopie électronique de cellules HEL différenciées à la diosgénine 10 μ M et des fragments libérés par ces cellules dans le milieu de culture.	183
Figure RII-8 : Activation de la caspase-3, clivage de PARP et inhibition de Bcl-xL après traitement à la diosgénine 10 μ M.....	185
Figure RII-9 : Activation de ERK au cours de la différenciation induite par la diosgénine 10 μ M. Rôle dans la polyploïdisation des cellules.....	187
Figure RII-10 : Inhibition des voies de p38 et JNK après traitement à la diosgénine 10 μ M.	188
Figure RII-11 : Evolution des facteurs de survie Akt et NF κ B après traitement à la diosgénine 10 μ M.....	190
Figure RII-12 : Evolution des fractogrammes obtenus après passage en FFF des cellules différenciées à la diosgénine 10 μ M.	191
Figure RII-13 : Evolution des fractogrammes obtenus après passage en FFF des cellules différenciées au PMA 50 nM.	193
Figure RII-14 : Collection de fractions à partir de cellules HEL témoin en FFF.	195
Figure RII-15 : Collection de fractions à partir de cellules HEL différenciées à la diosgénine pendant 96h et passées en FFF.....	197
Figure RII-16 : Evaluation du contenu en ADN des cellules différenciées à la diosgénine 10 μ M et triées en FFF.	199
Figure RII-17 : Expression membranaire du CD41 et de la glycophorine A des cellules HEL différenciées et passées en FFF.....	200
Figure RII-18 : Fractogrammes obtenus après passage en FFF de cellules traitées ou non à la diosgénine 10 μ M pendant 24h.....	202
Figure RII-19 : Profil d'élution des cellules HEL exposées à la diosgénine 10 μ M pendant 24h puis cultivées pendant 72h sans diosgénine.	203
Figure RII-20 : Mesure de la ploïdie des cellules après « wash out ».....	205
Figure RII-21 : Profils d'élution des fractions collectées au bout de 24h de traitement à la diosgénine 10 μ M puis cultivées sans diosgénine pendant 24h.....	206
Figure RII-22 : Evaluation du contenu en ADN des fractions collectées et soumises au « wash out ».....	208

Figure RIII-1 : Effets du léflunomide sur la prolifération et la viabilité des cellules HEL. ..	211
Figure RIII-2 : Prolifération après remise en culture des cellules HEL traitées ou non au léflunomide 10 μ M.....	212
Figure RIII-3 : Effet de l'uridine sur la prolifération des cellules HEL traitées au léflunomide 10 μ M.	213
Figure RIII-4 : Effets du léflunomide sur la prolifération et la viabilité des cellules K562. .	215
Figure RIII-5 : Effets du léflunomide sur la prolifération et la viabilité des cellules Meg-01.	217
Figure RIII-6 : Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules HEL traitées au léflunomide 10 μ M.....	219
Figure RIII-7 : Modulation de l'intensité du marquage de phospho-ERK dans les cellules HEL traitées au léflunomide.	220
Figure RIII-8 : Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules K562 traitées au léflunomide 10 μ M.....	222
Figure RIII-9 : Etude de l'activation des MAPKs dans les cellules Meg-01 traitées au léflunomide 10 μ M.....	224
Figure RIII-10 : Effet du léflunomide sur l'activation du facteur NF κ B dans les cellules HEL et K562.	226
Figure RIII-11 : Activation de Akt dans les cellules HEL et K562 traitées au léflunomide 10 μ M.	228
Figure RIII-12 : Effets du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules K562 traitées avec divers agents pro-apoptotiques.	230
Figure RIII-13 : Effets du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules HEL traitées avec divers agents pro-apoptotiques.	232
Figure RIII-14 : Effets du léflunomide sur l'exposition de la phosphatidylsérine induite par des agents pro-apoptotiques.	234
Figure RIII-16 : Effet protecteur du léflunomide par rapport à l'activation de la caspase-3. Rôle de la voie PI3K/Akt.	237
Figure RIII-17 : Effet du léflunomide sur la fragmentation de l'ADN induite par la diosgénine 40 μ M.	238

ANNEXES