



HAL
open science

Arguments en faveur de l'existence d'une activité pro-apoptotique des lamellarines vis-à-vis des cellules tumorales par ciblage mitochondrial

Caroline Ballot

► **To cite this version:**

Caroline Ballot. Arguments en faveur de l'existence d'une activité pro-apoptotique des lamellarines vis-à-vis des cellules tumorales par ciblage mitochondrial. Biologie cellulaire. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT: . tel-00440821

HAL Id: tel-00440821

<https://theses.hal.science/tel-00440821>

Submitted on 11 Dec 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université du Droit et de la Santé – Lille 2

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline Biologie Cellulaire

Par

Caroline BALLOT

Le 30 octobre 2009.

**ARGUMENTS EN FAVEUR DE L'EXISTENCE D'UNE
ACTIVITE PRO-APOPTOTIQUE DES LAMELLARINES
VIS-A-VIS DES CELLULES TUMORALES PAR CIBLAGE
MITOCHONDRIAL.**

Membres du jury :

Professeur Pierre FORMSTECHE

Docteur Bertrand JOSEPH (rapporteur)

Docteur Olivier SORDET (rapporteur)

Docteur Christian BAILLY (examineur)

Directeur de thèse : Professeur Philippe MARCHETTI.

Je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance au Docteur Joseph et au Docteur Sordet pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie le Docteur Bailly de me faire l'honneur de siéger dans ce jury.

REMERCIEMENTS.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur FORMSTECHE, Directeur du Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe « Ciblage moléculaire et cellulaire pour le traitement des Cancers ».

Je souhaite remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur Philippe MARCHETTI, pour son aide, ses conseils avisés et ses encouragements durant ces quatre années. Je te suis très reconnaissante de la confiance que tu m'as accordée depuis mon arrivée dans ton équipe, de ton écoute et de ton soutien face aux différentes épreuves. Merci pour m'avoir tant appris et fait découvrir une partie de la biologie et de la physiologie des mitochondries. Expérience passionnante ! Je te remercie également de m'avoir permise de réaliser le monitorat et un Mastère spécialisé en Drug Design.

Je remercie également les thésards, post-doctorants et étudiants que j'ai eu la chance de côtoyer durant ma thèse : Jérôme, Manel, Miguel, Alain, Thomas, Khaled, Sébastien, Malika, Hélène, Yasmine, Magali, Paul, Gaëlle. Sans oublier les « amis du 5^{ème} ». Merci pour votre bonne humeur et votre soutien.

Je ne voudrais oublier de mentionner ceux qui dans l'équipe n'ont jamais hésité à m'aider : Anne-Sophie, Edith, Florence, Michèle, le Docteur Carole Marchetti, le Docteur Claude Méreau, le Docteur Laurent Mortier, le Docteur Amélie Lansiaux, le Docteur Renata Polakowska, le Docteur Marie-Hélène David. Merci à l'ensemble de l'équipe 4.

Je remercie mes amis pour leur présence et leur compréhension : la science du vivant impose certaines contraintes temporelles et parfois un timing hors du commun !

Merci Aurélien pour ta présence, ta patience, ta compréhension et ton soutien.

Toute ma reconnaissance et mes plus grands remerciements s'adressent à mes parents et Mathilde pour leur patience, leur confiance en moi et leur inconditionnel soutien. Merci de votre présence sans faille à mes côtés dans cette aventure de la thèse.

A François, la vie ne nous a pas laissé le temps de partager nos passions et nos projets.

RESUME.

La plupart des traitements anticancéreux induisent l'apoptose des cellules tumorales *in vitro* comme *in vivo*. Les agents anticancéreux classiques agissent au niveau de cibles primitives, principalement localisées au niveau nucléaire, et activent consécutivement les différentes voies apoptotiques conduisant au stade ultime à la mort des cellules. Cependant, la résistance à l'induction de l'apoptose par les agents chimiothérapeutiques classiques reste un problème crucial. De nouvelles approches ont été développées pour dépasser la résistance à l'apoptose. Parmi elles, le ciblage de la mitochondrie apparaît comme une stratégie prometteuse pour tuer les cellules cancéreuses résistantes. Ainsi, de nouvelles molécules ciblant la mitochondrie ont été identifiées. Parmi celles-ci, notre laboratoire s'est intéressé aux Lamellarines, alcaloïdes pyrroliques hexacycliques d'origine marine. Outre leur effet inhibiteur des topoisomérases-I nucléaires, elles agissent également sur les mitochondries des cellules cancéreuses.

Mon travail a consisté 1) à évaluer l'avantage des Lamellarines dans le traitement de lignées de cellules cancéreuses résistantes, défaillantes dans les voies apoptotiques (cas des carcinomes pulmonaires non à petites cellules, NSCLC) et 2) à décrypter les voies apoptotiques déclenchées par les Lamellarines. Ainsi, 1) sur les cellules NSCLC hautement résistantes à l'apoptose induite par les chimiothérapies classiques, nous avons évalué deux agents anticancéreux potentiels de la famille des Lamellarines. La Lamellarine-D (Lam-D) et son dérivé de synthèse, le PM031379, agissent directement sur la mitochondrie, induisant l'activation de Bax, la libération mitochondriale de cytochrome-c et d'AIF et l'activation de la caspase-3. Cependant, seul le PM031379 induit la mort cellulaire qui s'accompagne de la translocation nucléaire d'AIF. De plus, cet effet létal nécessite la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) d'origine exclusivement mitochondriale. Ces résultats ont permis de comprendre les mécanismes permettant de restaurer l'apoptose des cellules chimiorésistantes. 2) La seconde partie de ce travail a consisté à caractériser les voies apoptotiques déclenchées par la Lam-D en évaluant précisément le rôle du noyau et des mitochondries dans son effet pro-apoptotique. La Lam-D exerce une remarquable cytotoxicité envers un large panel de tumeurs. A des concentrations de l'ordre du micromolaire, elle provoque l'apoptose nucléaire dans les cellules leucémiques sans blocage du cycle cellulaire. Les signaux transmis par la Lam-D initient l'apoptose *via* la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale, activant Bax et réduisant les taux des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et cIAP2, en association avec l'activation des caspases-9 et -3. Nos résultats ont également permis d'évincer l'implication de la voie apoptotique extrinsèque dans la mort cellulaire induite par la Lam-D. Par ailleurs, la Lam-D engendre une réponse aux dommages à l'ADN générés par son effet inhibiteur de topoisomérase-I, résultant en la phosphorylation de l'histone H2AX γ , l'expression de la protéine de réparation Rad51 et de p53. Grâce à diverses lignées de cellules cancéreuses, nous avons démontré que les mécanismes apoptotiques induits par la Lam-D sont indépendants du statut p53 des cellules tumorales. De plus, des cellules dépourvues de noyau (cytoplastes) subissent aussi l'apoptose induite par la Lam-D. L'ensemble de ces résultats démontre que la Lam-D ne nécessite pas la signalisation nucléaire pour promouvoir la mort des cellules cancéreuses et que la mitochondrie est la cible primordiale responsable de son effet pro-apoptotique.

Ainsi, la Lamellarine-D et ses dérivés de synthèse, de par leur mécanisme d'action original ciblant directement les mitochondries, sont capables d'induire l'apoptose de cellules tumorales y compris résistantes aux chimiothérapies classiques (NSCLC, mélanomes).

ABSTRACT.

Most anticancer treatments induce apoptosis of tumor cells *in vitro* and *in vivo*. The common anticancer agents act on primitive cellular targets, mainly localized in nucleus, and active subsequently different apoptotic pathways leading ultimately to cell death. Therefore, resistance to apoptosis induction by classical chemotherapeutic compounds is a crucial problem. Thus targeting others subcellular structures different from nucleus may be useful to bypass in part phenomenon of apoptosis resistance. The mitochondria appear an interesting target localized on crossroad of the different apoptotic pathways. Thus, new drugs targeting the mitochondria have been identified. From them, our lab interested on the Lamellarins, marine hexacyclic pyrrolic alkaloids. In addition to their inhibitor effects on nuclear topoisomerases-I, Lamellarins also act on mitochondria of cancer cells.

My work consisted 1) on evaluating advantages of the Lamellarins in treatment of resistant cancer cell lines with inefficient apoptotic pathways (non small carcinoma lung cancer cells, NSCLC) and 2) on elucidating the apoptotic pathways activated by the Lamellarins. Thereby, we tested effects of two potential anticancer agents from Lamellarins class on a highly apoptosis-resistant NSCLC cell line. Both the Lamellarin-D (Lam-D) and its synthetic amino derivative PM031379, act directly on mitochondria inducing the Bax activation, the mitochondrial release of cytochrome-c and AIF, as well as the activation of caspase-3. However the PM031379 only triggered cell death coupled to the nuclear translocation of AIF. Furthermore, this lethal effect needs the generation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS). These results allowed understanding the mechanisms useful to restore apoptosis in chemoresistant cells. 2) The second part of this work consisted on characterizing the apoptotic pathways activated by the Lam-D by evaluating precisely the nuclear and mitochondrial contributions on its pro-apoptotic effects. The Lam-D displays high potent cytotoxicity against a large panel of tumors. In the micromolar range, Lam-D promoted nuclear apoptosis in leukemia cells without prominent cell cycle arrest. Signals transmitted by Lam-D initiated apoptosis *via* the mitochondrial intrinsic apoptotic pathway, activating Bax and reducing the levels of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and cIAP2 in association with activation of caspases-9 and -3. Our results indicate that cell death induced by Lam-D was independent of the extrinsic apoptotic pathway. Lam-D also exerted a topoisomerase I-mediated DNA damage response resulting in phosphorylation of H2AX, upregulation of the repair protein Rad51 and of p53. However, using several cancer cell lines, we have shown that the mechanism of apoptosis induced by Lam-D is independent of the p53 status of the tumor cells. Furthermore sensitivity to Lam-D was abrogated in enucleated cells (cytoplasts). Altogether these results demonstrate that the Lam-D exerts its cytotoxic effects by inducing mitochondrial apoptosis and that these effects can be initiated independently of nuclear signaling. The mitochondria are the fundamental target responsible of its pro-apoptotic effect.

Thus the Lam-D and its synthetic derivative, by an original action mechanism targeting directly mitochondria, are able to induce apoptosis of cancer cells resistant to conventional chemotherapies (NSCLC, melanoma).

LISTE DES ABREVIATIONS.

$\Delta\Psi_m$	Potentiel de membrane mitochondrial
AA	Acides aminés
ACG	Annonaceous acetogenins
ADME	Administration – Distribution – Métabolisation - Elimination
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AMID	AIF-homologous Mitochondrion associated Inducer of Death
AML	Leucémies myéloïdes aigues
ALL	Leucémies lymphoïdes aigues
ANT	Adenine Nucleotide Translocator
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor-1
ASPP	Apoptosis-Stimulating Protein of p53
ATM	Ataxia-telangiectasia protein
ATR	ATM-Rad3-related
Bad	Bcl-2 –antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 –antagonist/killer
Bax	Bcl-2 –associated X protein
Bcl-2	B cell leukemia/lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology domain
Bid	Bcl-2 inhibitory domain
Bim	Bcl-2 –interacting mediator of cell death
BIR	Baculovirus IAP Repeat
CAD	Caspase Activated Deoxyribonuclease
CAD/DFF40	Caspase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 40
CARD	Caspase recruitment domain DED
Cdk	Cyclin dependent kinase
Ced	<i>Caenorhabditis Elegans Death</i>
CK	Créatine kinase
CPT	Camptothécine
CRM	Chaîne Respiratoire Mitochondriale
CsA	Cyclosporine-A
CyD	Cyclophiline-D
Cyt-c	Cytochrome C
DAG	Diacylglycérol
DD	Death Domain ou Domaine de mort cellulaire
DED	Death Effector Domain
DIABLO	Direct IAP Binding protein with Low pI
DISC	Death-inducing Signaling Complex
DLCs	Delocalized Lipophilic Cations
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DSB	Double-Strand Break
EGF (EGFR)	Epidermal Growth factor (Epidermal Growth Factor Receptor)
EIM	Espace intermembranaire mitochondrial
EndoG	Endonucléase G
FADD	Fas-Associated Death Domain
FEN1	Flap endonucléase 1
FLIP	FLICE Inhibitory Proteins
GSAO	4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino)phenylarsenoxide
GSH	Glutathion
HGF/c-Met	Hepatocyte growth factor
HK-II	Hexokinase II
4HPR	N-(4-hydroxyphenyl)retinamide

HSP	Heat Shock Protein
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
ICAD	Inhibitor of Caspase-Activated DNAs (CAD)
ICAD/DFF45	Inhibitor of Caspase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 45
IGF	Insulin-like growth factor
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Lam-D	Lamellarine-D
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MLS	Séquence de localisation mitochondriale
MME	Membrane Mitochondriale Externe
MMI	Membrane Mitochondriale Interne
MNNG	N-nitrosoguanidine
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
MRP	Multidrug resistance protein
MTX	Méthotrexate
NBS1	Nitrine
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NOX	NAD(P)H oxydase
NSCLC	Non Small Cell Lung Carcinomas
Omni/HtrA2	High Temperature Requirement protein A2
PAO	Phenyl Arsenoxide
PARP	Poly-(ADP Ribose Polymerase)
PBR	Peripheral Benzodiazepin Receptor
PgP	Glycoprotéine P
PIDD	p53-induced protein with death domain
PIG	p53 Inducible Genes
PIKK	phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases
PML	Promyelocytic leukemia protein
PRG3	P53-responsive gene 3
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis/Bcl-2 binding component 3
RAIDD	Receptor interacting protein (RIP)-associated ICH1/CED-3 homologous protein with a death domain
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Reactive Oxygen Species
SAHBs	Stabilized alpha-helix of Bcl-2 domains
SAPK	Stress activated protein kinase
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
STS	Staurosporine
TGF	Tumor Growth Factor
THF-ACG	Bistetrahydrofuranic anetogenins
TNF (TNF-R)	Tumor Necrosis Factor (TNF-Receptor)
Topo I, II	Topoisomérase I, II
TP	Transition de perméabilité
TRADD	TNR Receptor Associated Death Domain
TRAF-1 & 2	TNF-R associated factors-1 & -2
TRAIL	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

SOMMAIRE.

PREAMBULE.	16
INTRODUCTION.	20
<u>Partie I</u> - Les mécanismes moléculaires de l'apoptose et leurs régulations.	22
I- La voie apoptotique classique dépendante des caspases.	24
1.1- La fragmentation oligonucléosomique de l'ADN résulte de l'activation de pro-caspases effectrices.	24
1.2- Régulation des caspases par la famille des IAPs.	26
1.3- La cascade d'activation des caspases : les pro-caspases effectrices sont activées par des caspases initiatrices.	28
1.4- Les pro-caspases initiatrices sont capables de s'auto-activer.	28
1.5- L'auto-activation des caspases initiatrices est secondaire à l'engagement des voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque.	29
1.5.1- La voie extrinsèque de l'apoptose passe par l'activation des récepteurs de mort.	30
1.5.2- La voie intrinsèque mitochondriale.	33
a) <i>La famille Bcl-2.</i>	34
b) <i>Les mécanismes de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe lors de l'apoptose.</i>	37
c) <i>Les conséquences de la perméabilisation accrue de la membrane mitochondriale externe lors de l'apoptose : libération dans le cytosol d'une multitude de facteurs pro-apoptotiques.</i>	43
II- Les voies apoptotiques alternatives indépendantes des caspases.	46
2.1- La voie dépendante d'AIF.	47
2.2- Les voies dépendantes de molécules homologues d'AIF.	49
2.3- Les voies apoptotiques impliquant d'autres protéases que les caspases.	49
<u>Partie II</u> - Les chimiothérapies conventionnelles induisent l'apoptose des cellules tumorales.	53
I- Les effets pro-apoptotiques des chimiothérapies conventionnelles : un mécanisme en plusieurs étapes.	53

1.1- 1 ^{ère} étape : les chimiothérapies conventionnelles endommagent les cibles intracellulaires.	55
1.2- 2 ^{ème} étape : les dommages de l'ADN sont détectés par la cellule.	59
1.3- 3 ^{ème} étape : la réponse cellulaire apoptotique.	61
1.3.1- Activation de l'apoptose à travers les récepteurs de mort.	61
1.3.2- Activation de la voie intrinsèque de l'apoptose : la communication noyau - mitochondrie.	62
a) Activation d'une voie dépendante de p53.	62
b) Les homologues de p53.	66
c) c-Abl.	69
d) La kinase Chk2.	70
e) Autres protéines requises en réponse aux dommages de l'ADN.	71
f) Les céramides, seconds messagers lipidiques.	73
g) La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).	74
II- Illustration du mécanisme d'induction de l'apoptose suite aux dommages de l'ADN : les inhibiteurs de topoisomérase-1 nucléaire.	77
III- Les thérapies ciblées induisent l'apoptose des cellules tumorales.	78
3.1- Les anticorps monoclonaux à visée antitumorale sont peu cytotoxiques.	78
3.2- Les petites molécules inhibiteurs des protéines kinases induisent l'apoptose des cellules tumorales.	79
IV- Les chimiothérapies classiques peuvent induire des réponses cellulaires différentes de l'apoptose.	80
<u>Partie III</u> - Résistance à l'apoptose : une caractéristique des cellules cancéreuses.	83
I- Arguments en faveur de l'implication d'une résistance à l'apoptose dans la genèse des cancers.	83
II- Arguments en faveur de l'implication d'une résistance à l'apoptose dans la persistance et la dissémination des cancers.	85
III- Arguments en faveur de l'implication d'une résistance à l'apoptose dans la résistance des cancers aux traitements : exemple du cancer du poumon.	89

<u>Partie IV</u> - Une nouvelle approche : le développement de molécules capables de cibler directement les acteurs de l'apoptose dans les cellules tumorales.	94
I- Interférer avec la voie apoptotique extrinsèque : les récepteurs de mort comme cible antitumorale.	94
II- Interférer avec la voie apoptotique intrinsèque : la mitochondrie comme cible thérapeutique.	98
<u>Partie V</u> - Les chimiothérapies du futur seront-elles d'origine naturelle ? L'exemple des Lamellarines.	104
OBJECTIFS DU TRAVAIL.	110
RESULTATS.	114
<u>Article 1</u> : « Overcoming chemoresistance of non-small cell lung carcinoma through restoration of an AIF-dependent apoptotic pathway ».	116
<u>Article 2</u> : « Essential role of mitochondria in the apoptosis of cancer cells by the marine alkaloid Lamellarin-D ».	130
DISCUSSION.	174
PERSPECTIVES.	191
AUTRES TRAVAUX.	195
<u>Article 3</u> : « Apoptosis-related mitochondrial dysfunction defines human monocyte-derived dendritic cells with impaired immuno-stimulatory capacities ».	197
<u>Article 4</u> : «Synthesis and biological evaluation of novel oxophenylarcyriaflavins as potential anticancer agents ».	217
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.	229

PREAMBULE

PREAMBULE.

Notre équipe s'intéresse au rôle de la mitochondrie dans la résistance et la sensibilité à l'apoptose induite par les agents anticancéreux. Durant ma thèse, mon travail a consisté :

➤ à évaluer l'effet létal des Lamellarines sur des cellules cancéreuses chimiorésistantes. Nous nous sommes intéressés à une lignée de cellules de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) caractérisées pour sa résistance à l'induction de l'apoptose par les radio- et chimio- thérapies conventionnelles. Ainsi, l'utilisation de la Lamellarine-D (Lam-D) et de son dérivé de synthèse, le PM031379, en tant qu'outils pharmacologiques, a permis de décrypter les mécanismes apoptotiques dans les cellules NSCLC. Le but de ce travail a été de comprendre la signalisation apoptotique dans les cellules NSCLC.

➤ à décrypter les voies apoptotiques déclenchées par les Lamellarines. Nous avons évalué la contribution respective du noyau et de la mitochondrie dans l'apoptose induite par les Lamellarines. Les voies moléculaires à travers lesquelles la Lam-D provoque l'apoptose des cellules leucémiques ont été examinées. Par ailleurs, nous avons cherché à déterminer si l'induction de l'apoptose par la Lam-D constituait un avantage pour vaincre la chimiorésistance dans les cellules cancéreuses.

Afin d'introduire ce travail, un résumé des connaissances actuelles sur :

- 1) les mécanismes moléculaires de l'apoptose et leurs régulations,
- 2) la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses,
- 3) la place des Lamellarines parmi les molécules antitumorales actuelles et en développement, a été présenté.

INTRODUCTION

Partie I - Mécanismes moléculaires de l'apoptose et leurs régulations.

Le concept de mort cellulaire « naturelle » fut pour la première fois évoqué en 1842 par Carl Vogt (pour revue *Cotter TG*, 2009, dans laquelle il retrace l'histoire de la recherche sur l'apoptose). Il aura fallu attendre 1972 pour que le terme «apoptose» soit introduit dans la littérature par Kerr, Wyllie et Curie (*Kerr & al*, 1972). Par ce terme signifiant en grec « la chute des feuilles en automne », un type de mort cellulaire différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire caractérisée jusqu'alors, fut décrit. En réalité, au moment où le mot est introduit, l'apoptose était déjà connue mais faisait l'objet de descriptions disparates (nécrose acidophile ou corps de Councilman pour les anatomo-pathologistes) et était plutôt considérée comme une curiosité morphologique inexplicée. Il revient ensuite à Wyllie d'avoir montré dès 1980 que la condensation de la chromatine observée au cours du processus apoptotique avait une traduction biochimique particulière, caractérisée par la fragmentation régulière de l'ADN en oligonucléosomes et en nucléosomes, objectivée sur gel d'agarose sous forme de barreaux d'échelle (*Wyllie & al*, 1980). Malgré l'importance de ces travaux, l'apoptose n'a acquis droit de citer que lorsque les scientifiques ont compris que l'apoptose était un phénomène actif génétiquement programmé. Cette découverte essentielle a été appuyée par les travaux d'Horvitz et de son équipe (*Horvitz & al*, 1994) lors de l'étude de l'embryogenèse du nématode *Caenorhabditis elegans* qui présente la particularité, au cours de son développement, de voir mourir par apoptose un nombre restreint et constant de cellules (*Hengartner & Horvitz*, 1994). Ainsi, la sélection par mutagenèse chimique de larves présentant des défauts d'élimination des cellules au cours du développement a permis l'identification de 11 gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée chez *C. elegans*. Parmi ceux-ci, 3 ont été identifiés comme des régulateurs clé de l'apoptose dans toutes les cellules somatiques : il s'agit de ced-3, ced-4 et ced-9 (ced pour *Caenorhabditis Elegans Death*). Ced-3 et ced-4 sont tous deux requis pour la mort cellulaire. En effet, une mutation conduisant à une inactivation de l'un ou l'autre de ces gènes aboutit au blocage de l'apoptose dans chacune des 131 cellules somatiques du ver. Ced-9, pour sa part, a une fonction antagoniste de ced-3 et ced-4 en ce sens qu'il est capable de promouvoir la survie. Ainsi une perte partielle de fonction de ced-9 est létale, suite à une mort cellulaire

exacerbée, alors qu'un gain de fonction de ced-9 conduit à un excès cellulaire. Le clonage de ces différents gènes a révélé que :

- ced-3 code pour une protéase à cystéine homologue à l'enzyme de conversion de l'IL-1b (*Yuan & al, 1993*).
- ced-4 code pour une protéine ayant des homologies avec la protéine humaine Apaf-1 (*Zou & al, 1997*).
- ced-9 code pour une protéine homologue à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (*White, 1996*).

Il a été démontré que ced-4 est capable d'interagir à la fois avec ced-3 et ced-9 (*Chinnaiyan & al, 1997*). Ce résultat rend bien compte des différents niveaux de régulation entre ces protéines et leurs homologues chez les mammifères. Ainsi Ced-3, Ced-4 et Ced-9 constituent le noyau de la machinerie apoptotique de *C.elegans*, à laquelle on peut ajouter d'autres régulateurs dont il existe aussi des homologues chez les mammifères (*Metzstein & al, 1998*). Par exemple, Egl-1 est l'homologue des protéines à « BH3-only » chez les mammifères. WAH-1 de *C. elegans* est l'homologue du facteur mitochondrial AIF bien que son rôle dans la mort du nématode reste limité (pour revue *Joza & al, 2009*).

Jusqu'au milieu des années 1990, par analogie avec les données obtenues chez *C. elegans*, il était généralement admis que les cellules recevant un signal de mort ou l'absence de signal de survie déclenchaient un programme génétique de mort avec activation de gènes spécifiques ou « killer genes ». Dans ce scénario, l'apoptose était avant tout « une affaire nucléaire » de l'initiation des gènes à la dégradation finale de l'ADN. Au fur et à mesure de l'avancée des connaissances, de cette vision purement nucléocentrique (*Skalka & al, 1976 ; Wyllie & al, 1980*), l'apoptose est devenue un processus aboutissant à la fragmentation nucléaire étroitement contrôlée par de multiples étapes cytoplasmiques en amont. Ce sont ces événements résumés dans les chapitres suivants qui définissent les voies apoptotiques classiques dépendantes des caspases.

I- La voie apoptotique classique dépendante des caspases.

1.1- La fragmentation oligonucléosomique de l'ADN résulte de l'activation de pro-caspases effectrices.

Il a fallu plus de 15 ans pour caractériser les mécanismes moléculaires responsables de la fragmentation oligonucléosomique apoptotique. Celle-ci est secondaire à l'effet d'endonucléases appelées CAD/DFF40 (Caspase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 40) dont le mécanisme d'activation est désormais clairement identifié. Dans des cellules non apoptotiques, CAD/DFF40 est présente au sein du cytosol sous forme inactive complexée à son inhibiteur naturel ICAD/DFF45 (Inhibitor of Caspase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 45). Au cours du processus apoptotique, l'inhibiteur ICAD est spécifiquement dégradé par un sous-groupe de caspases dites effectrices permettant alors la libération et la translocation nucléaire de la nucléase CAD active qui pourra ainsi fragmenter l'ADN des cellules apoptotiques (*Nagata & al, 2000 ; Uegaki & al, 2000*).

Les caspases sont des cystéines protéases qui clivent spécifiquement leur substrat après un motif peptidique contenant un aspartate d'où le terme caspases ou c-Asp-ases pour cystéines Asp protéases (*Alnemri & al, 1997*). Actuellement, chez les Mammifères, 15 membres de la famille des caspases ont été identifiés, dont 12 enzymes humaines sont connues (tableau 1) (*Thornberry & Lazebnik, 1998*). Comme de nombreuses protéases, les caspases sont exprimées sous une forme zymogénique (pro-enzyme) inactive qui contient trois domaines : un pro-domaine N-terminal, une large sous-unité contenant le site actif QACXG et une petite sous-unité C-terminale. Ces trois domaines sont séparés par des résidus aspartate, sites de clivage potentiel par les caspases elles-mêmes. Les caspases, une fois activées, reconnaissent sur leur substrat cible un motif térapeptidique se terminant par le résidu d'aspartate définissant le site de clivage. Ainsi, le motif DEVD est celui habituellement reconnu par les caspases -3 et -7. Les caspases effectrices (caspases-3, -7, -6) sont appelées ainsi car elles participent activement à la destruction de la cellule apoptotique en clivant spécifiquement différents substrats cytosoliques et nucléaires C'est pourquoi les caspases effectrices sont comparées à des « ciseaux » capables de découper la cellule. Outre la protéine ICAD, plus de 100 protéines substrats des caspases effectrices ont été décrites lors de l'apoptose (*Stennicke & Salvesen, 2000 ; Chang & Yang, 2000*). Une enzyme de réparation nucléaire, la PARP (Poly-(ADP Ribose Polymerase)), est la cible majeure du clivage protéolytique par les

caspases effectrices qui l'inactivent. Citons également le clivage par les caspases de structures de l'architecture des cellules comme l'actine, la gelsoline ou certaines lamines nucléaires. Des protéines de signalisation peuvent être des cibles potentielles des caspases effectrices, comme la PKC δ . Son clivage par la caspase-3 entraîne une accumulation du domaine catalytique de PKC δ , ce qui constitue le signal d'entrée en apoptose de la cellule (*Denning & al, 1998 ; Emoto & al, 1995*). Les kinases de type MEKK1 peuvent être activées par les caspases, leur protéolyse contribuant à amplifier les signaux de mort cellulaire (*Nicholson, 1999*). Enfin, les caspases peuvent inactiver par clivage certaines protéines anti-apoptotiques (comme Bcl-2) contribuant ainsi à précipiter irréversiblement la cellule vers la mort. Les caspases sont cytosoliques mais peuvent également se localiser dans l'espace intermembranaire mitochondrial (caspase-2, -3 et -9), dans le noyau (caspase-2 et -3) ou dans l'appareil de Golgi (caspase-2) (*Chandra & Tang, 2003 ; O'Reilly & al, 2002 ; Zhivotovsky & al, 1999*). Les caspases peuvent changer de compartiment pour cliver leurs substrats. Par exemple, dans certaines lignées de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC), les caspases effectrices cytosoliques comme la caspase-3 doivent franchir la membrane nucléaire pour directement dégrader les substrats nucléaires (*Joseph & al, 2001*).

Le mécanisme exact de ce transport nucléaire (translocation active ou diffusion) est sujet à débat (*Faleiro & Lazebnik, 2000 ; Pinkoski & al, 2000*). Cependant, il a été suggéré que la caspase-3, qui ne possède pas de séquence de localisation nucléaire (NLS), entrerait dans le noyau par diffusion facilitée par l'existence d'altérations des pores nucléaires (*Faleiro & Lazebnik, 2000*). L'activation de la caspase-9 serait à l'origine, par un mécanisme inconnu, de l'augmentation du seuil de diffusion nucléaire qui physiologiquement ne laisse diffuser que les particules de moins de 9nM ou inférieures à 50-60 kDa (*Pinkoski & al, 2000*).

Tableau I : Caractéristiques structurales et fonctionnelles des membres de la famille des caspases

Enzyme	Type de pro-domaine	Protéines adaptatrices	Complexe activant les caspases
Caspases apoptotiques initiatrices			
Caspase-2	Long avec un domaine CARD	PIDD, RAID	PIDDosome
Caspase-8, -10	Long avec 2 domaines DED	FADD	DISC
Caspase-9	Long avec un domaine CARD	Apaf-1	Apoptosome
Caspase-12 ^a	Long avec un domaine CARD	TRAF-2	n.d.
Caspases apoptotiques effectrices			
Caspase-3, -7	Court	-	Caspases initiatrices
Caspase-6	Court	-	Caspases initiatrices
Caspases inflammatoires			
Caspase-1	Long avec un domaine CARD	ASC, CARDIAK	Inflammosome
Caspase-4	Long avec un domaine CARD	n.d	
Caspase-5	Long avec un domaine CARD	ASC	Inflammosome
Caspase-11 ^a	Long avec un domaine CARD	n.d	
Autre caspase			
Caspase-14	Court	-	n.d

^a caspases murines

n.d : non déterminé

1.2- Régulation des caspases par la famille des IAPs.

Les caspases sont régulées naturellement par des protéines de la famille des IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (pour revues *Dubrez-Daloz & al, 2008 ; Fulda, 2009*). D'abord découvertes chez les baculovirus où leur rôle est de bloquer la réponse apoptotique induite par les mécanismes de défense immunitaire de l'hôte suite à l'infection virale, leurs homologues ont été découverts ensuite chez *Caenorhabditis elegans*, la levure, la drosophile et finalement les vertébrés. Actuellement, il en existe au moins 8 chez les mammifères. Les IAPs et autres inhibiteurs de caspases empêcheraient les conséquences de l'activation accidentelle ou spontanée des caspases en établissant un seuil à partir duquel les caspases peuvent dégrader la cellule. Deux critères définissent les membres de la famille des IAPs : ces

protéines possèdent à la fois des capacités inhibitrices d'apoptose et contiennent un ou plusieurs domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat). Facultativement, les IAPs peuvent présenter un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de zinc (RING finger) dans leur partie C-terminale. Huit homologues ont été identifiés chez les mammifères. Il s'agit des cIAP-1 (Rothe & al, 1995), cIAP-2 (Rothe & al, 1995), XIAP (Liston & al, 1996), la survivine (Liston & al, 1996), Livin/ML-IAP, ILP2, NAIP (Liston & al, 1996) et Apollon (Chen & al, 1999). L'inhibition de l'apoptose par les IAPs survient le plus souvent par l'inhibition directe des caspases secondairement à l'interaction entre le domaine BIR des IAPs et le site catalytique des caspases, conduisant ce complexe vers la voie du protéasome. Par exemple, chez l'homme, XIAP, cIAP-1, cIAP-2 ou la survivine sont capables de se lier aux caspases effectrices (-3, -7) actives et également à la caspase-9, et de les inhiber directement. Cette interaction se fait par les domaines BIR3 des XIAP et par la petite sous-unité de la caspase-9 (Deveraux & al, 1998). Pour les caspases-3 et -7, la liaison se fait par les domaines BIR1 et 2 avec le site catalytique des caspases (Suzuki & al, 2001). Les XIAP peuvent également interagir avec Apaf-1 et ainsi réguler l'activité de l'apoptosome, soit en fixant la caspase-9, soit en séquestrant la caspase-3 dans l'apoptosome (Bratton & al, 2002).

cIAP-1 et cIAP-2 se lient à TRAF-1 et 2 (TNF-R associated factors) grâce à leur motif BIR (Rothe & al, 1995; Roy & al, 1997). Ces deux cIAP peuvent inhiber les caspases-3, -7 et -9 mais sont moins puissantes que les XIAP. Cependant, les IAPs ne peuvent pas inhiber les caspases-1, -6, -8 ou -10. Il est à noter que les IAPs peuvent également exercer leur fonction anti-apoptotique indépendamment de l'inhibition des caspases, en augmentant les voies de survie par activation du facteur de transcription NF κ B ou de la voie de survie AP-1 par des mécanismes non encore élucidés. Les IAPs sont elles-mêmes régulées par des protéines mitochondriales Smac/DIABLO (Smac : second mitochondria-derived activator of caspases ; DIABLO : Direct IAP Binding protein with low pI) et Omi/HtrA2 dont la liaison empêche l'interaction entre IAPs et caspases, et par conséquent promeuvent l'apoptose (Du & al, 2000).

Outre leur rôle d'inhibiteurs des caspases, les IAPs exercent de nombreuses autres activités. Grâce aux expériences de délétion, notamment chez la drosophile, il a été montré que les IAPs sont d'importants régulateurs des voies de signalisation du TNF α et du TGF β , de l'activation de NF κ B, du développement et de la différenciation (Kuranaga & al, 2006), de la réponse immunitaire innée (Valanne & al, 2007 ; Leulier & al, 2006; Huh & al, 2007). En particulier,

NAIP stimule la voie NF κ B (activatrice de gènes codant les molécules pro-inflammatoires) ou active la caspase-1 *via* l'inflamosome (*Mariathasan & al, 2007*). Les IAPs sont également des régulateurs de la prolifération cellulaire et de la division. C'est le cas de la survivine (pour revue *Altieri & al, 2008*) ou de cIAP-1. cIAP-1 peut interagir avec Mad1, un régulateur négatif de Myc, et le cible pour sa dégradation *via* la voie ubiquitine/protéasome (*Xu & al, 2007*). Avec c-myc, cIAP-1 favorise la prolifération cellulaire. Les effets de XIAP et cIAP-1 sur la prolifération cellulaire seraient aussi associés à leurs capacités à interagir avec Chk1, une sérine/thréonine-kinase qui participe à la transition de la phase S à M du cycle cellulaire (*Galvan & al, 2004*). Leur implication dans la mobilité cellulaire a également été démontrée (*Geisbrecht & al, 2004*). En effet, chez la drosophile, il a été découvert un rôle de DIAP1, homologue de cIAP-1, dans la mobilité cellulaire. Les mécanismes impliqués ne sont pas clairement élucidés, mais l'interaction directe de DIAP1 avec Rac (membre de la famille des Rho GTPases) et un de ses partenaires la profiline, *in vitro*, suggérerait que DIAP1 puisse intervenir dans la mobilité cellulaire en régulant le cytosquelette d'actine (*Geisbrecht & al, 2004*).

1.3- La cascade d'activation des caspases : les pro-caspases effectrices sont activées par des caspases initiatrices.

De manière générale, la maturation des pro-caspases pour obtenir des caspases actives pleinement fonctionnelles se fait par clivage protéolytique au niveau des résidus aspartate qui délimitent les trois domaines. Lorsque celle-ci a été réalisée, la cristallographie a permis de démontrer que la forme active des caspases correspond à un hétérotétramère comportant deux grandes et deux petites sous-unités avec deux sites actifs (*Liang & Fesik, 1997*). La présence de ces résidus au sein des sites de clivage des caspases explique la capacité des caspases à s'auto-activer ou à être activées par d'autres caspases en cascade (*Pop & Salvesen, 2009 ; Li & Yuan, 2008*). Les caspases effectrices sont activées de manière hiérarchique, en cascade, par d'autres caspases appelées caspases initiatrices (caspases -2, -8, -9, -10). Ainsi, le clivage protéolytique de la pro-caspase-3 survient sous l'effet direct des caspases-8 ou -9 activées. Plus rarement, l'activation protéolytique des caspases effectrices peut être secondaire à l'action d'autres protéases comme les granzymes B ou les cathepsines.

1.4- Les pro-caspases initiatrices sont capables de s'auto-activer.

Les pro-caspases initiatrices sont caractérisées par la présence d'un long pro-domaine (>10Kda) possédant des motifs peptidiques CARD ou DED impliqués dans des interactions

avec d'autres protéines possédant ces domaines d'homologie. Ces interactions protéine-protéine ont pour conséquence le recrutement et l'agrégation sur un même site d'un nombre suffisant de pro-caspases initiatrices capables de déclencher leur auto-activation. Ainsi, à l'origine de la réponse apoptotique réside l'auto-activation des pro-caspases initiatrices. C'est par exemple le cas de l'activation des pro-caspases-8 (ou des pro-caspases-10) agrégées par leur interaction avec les molécules adaptatrices FADD (pour Fas-Associated Death Domain) dans les voies mettant en jeu l'oligomérisation des récepteurs de mort. Plus récemment, un complexe multimoléculaire responsable de l'activation de la caspase-2 appelé PIDDosome a également été décrit dans l'apoptose induite par les génotoxiques (*Tinel & al, 2004*). Le PIDDosome résulte de l'interaction de la protéine adaptatrice RAIDD (pour Receptor Interacting Protein (RIP)-Associated ICH1/CED-3-homologous Protein with Death Domain) avec le domaine CARD de la caspase-2 et le domaine de mort (death domain ou DD) de PIDD (pour p53-induced protein with death domain). PIDD exerce un double rôle pouvant induire l'apoptose par activation de la caspase-2 ou la survie en favorisant la voie de NFκB (*Janssens & al, 2005 ; Tinel & al, 2007*). L'activation de la caspase-2 par le PIDDosome dépend de p53 (*Baptise-Okoh & al, 2008*). Récemment les travaux d'Olsson ont mis en évidence que la caspase-2 peut également utiliser le complexe DISC (pour Death-inducing Signaling Complex) comme plateforme d'activation (*Olsson & al, 2009*). Le recrutement de la caspase-8 au sein de ce complexe est capital pour l'activation de la caspase-2 en réponse aux dommages de l'ADN générés par des agents génotoxiques comme le 5-FU ou l'étoposide. Le lien fonctionnel de ces caspases-2 et -8 dans le complexe DISC constitue un mécanisme alternatif au PIDDosome pour l'activation de la caspase-2 apicale suite aux lésions génomiques (*Olsson & al, 2009*).

1.5- L'auto-activation des caspases initiatrices est secondaire à l'engagement des voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque.

La nature des caspases initiatrices activées est déterminée par l'engagement de voies apoptotiques spécifiques. On distingue ainsi une voie intrinsèque mitochondriale conduisant à l'activation de la pro-caspase-9 d'une part, et d'autre part, une voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort conduisant à l'activation des caspases-8 et -10.

1.5.1- La voie extrinsèque de l'apoptose passe par l'activation des récepteurs de mort.

Il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée : les **récepteurs de mort** (pour revue *Papenfuss & al, 2008*). Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation des caspases. Cette voie d'activation est impliquée notamment dans l'élimination des lymphocytes auto-réactifs. Les récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TNF-R) (*Nagata, 1997*). Les TNF-R peuvent promouvoir soit la survie, soit la mort, soit les deux. Les récepteurs CD27 (*Camerini & al, 1991*), CD30 (*Durkop & al, 1992*), CD40 (*Stamenkovic & al, 1989*), TNF-RII (*Smith & al, 1990*), O_x40 (*Mallett & al, 1990*), 4-1BB (*Kwon & Weissman, 1989*) et p75 NGFR (*Johnson & al, 1986*) sont impliqués dans la survie cellulaire. Parmi les membres de la famille impliqués dans la mort cellulaire, il convient de citer CD95 (Fas/APO-1, DR2) (*Itoh & al, 1991; Oehm & al, 1992*), DR1 ou TNF-R1 (*Loetscher & al, 1990; Schall & al, 1990*), DR3 (TRAMP, LARD, WSL-1, TNFRSF25) (*Chinnaiyan & al, 1996; Kitson & al, 1996*), DR4 ou TRAIL-R1 (*Chaudhary & al, 1997*) et DR5 ou TRAIL-R2 (*Chaudhary & al, 1997*) et DR6 ou TR-7 (*Pan & al, 1998*).

Les membres de la famille du TNF-R sont des protéines transmembranaires de type 1, possédant dans leur domaine extracellulaire de une à six régions riches en cystéine impliquées dans la liaison du ligand. Les récepteurs de mort possèdent dans leur partie intracellulaire une région conservée d'environ 80 acides aminés appelée domaine de mort cellulaire (DD) (*Chaudhary & al, 1997; Nagata, 1997*). Le DD a été conservé au cours de l'évolution. Le récepteur Fas (CD95/APO-1) représente le prototype des récepteurs de mort. Il est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires. De nombreuses études ont rapporté que des stress cellulaires mais également les agents anticancéreux pouvaient induire l'expression des ligands de mort tel que FasL et donc induire l'apoptose (*Kasibhatla & al, 1998*).

Ces récepteurs de mort déclenchent des événements moléculaires désormais bien connus qui présentent entre eux de nombreuses homologies. De manière générale, il s'agit d'une succession d'événements moléculaires qui peuvent se diviser de la manière suivante (figure 1) (pour revue *Elrod & Sun, 2008*) :

- **L'interaction** entre le ligand et les domaines extracellulaires des récepteurs de mort spécifiques à la surface de la cellule conduit à l'oligomérisation des récepteurs transmembranaires.

- L'**oligomérisation** des récepteurs permet ainsi le recrutement par leurs domaines intracellulaires d'un ou plusieurs types de protéines adaptatrices cytoplasmiques (FADD et/ou TRADD pour TNF Receptor Associated Death Domain) par l'intermédiaire de domaines de mort présents sur la partie intracellulaire des récepteurs de mort et sur les protéines adaptatrices.
- Les protéines adaptatrices vont à leur tour **recruter** certaines pro-caspases initiatrices comme les caspases-8 et -10, par l'intermédiaire des domaines effecteurs de mort (ou DED pour Death Effector Domain) présents sur les protéines adaptatrices et sur les pro-caspases initiatrices.

Cet ensemble multi-protéique impliquant ligands-récepteurs-protéines adaptatrices et pro-caspases initiatrices porte le nom de **DISC** (pour Death-Inducing Signaling Complex). Il s'ensuit l'activation auto-catalytique des caspases initiatrices qui précipite la cellule vers une mort inéluctable (*vide supra*) (figure 1). Cependant, la mort cellulaire induite par les récepteurs de mort peut être régulée au niveau des caspases initiatrices les plus en amont du processus apoptotique par les molécules **FLIP** (FLICE-Inhibitory Proteins). Ces protéines découvertes à la fois chez les mammifères et chez les virus ont la capacité de rentrer en compétition avec les pro-caspases initiatrices (-8 et -10) lors de leur recrutement par les protéines adaptatrices des récepteurs de mort. Ces protéines sont alors recrutées à la place des pro-caspases initiatrices au niveau du DISC *via* leurs domaines DED. La conséquence de ce recrutement est l'absence d'auto-activation des pro-caspases et l'arrêt de la propagation du signal en aval. La signalisation *via* FADD ne va pas exclusivement aboutir à la mort cellulaire mais va aussi conduire, selon les circonstances, à la survie et à la prolifération (*Newton & al, 1998 ; Zhang & al, 1998*).

TRADD pour sa part, se lie au DD de TNF-R1 et est capable d'induire aussi bien l'activation de NFκB que l'apoptose (*Hsu & al, 1995*). TRADD active ces différentes voies en recrutant une protéine adaptatrice supplémentaire TRAF2 ou FADD (*Hsu & al, 1996*). La liaison à TRAF2 aboutit à l'activation de NFκB et de SAPK (*Liu & al, 1996 ; Rothe & al, 1995*) alors que le recrutement de FADD enclenche l'activation des caspases (figure 1). TRADD peut aussi interagir avec le DD de RIP (*Hsu & al, 1996*), une serine/thréonine-kinase qui peut induire selon les circonstances soit l'activation de NFκB soit l'apoptose (*Stanger & al, 1995 ; Hsu & al, 1996*). RIP est également associé à Fas (*Hsu & al, 1996*). RIP interagit avec RAIDD (*Duan & Dixit, 1997*) /CRADD (*Ahmad & al, 1997*) qui lui-même lie directement la

caspase-2, mais pas avec les caspases-1, -3, -4,-6, -7 ou -9 (Ahmad & al, 1997 ; Duan & Dixit, 1997).

En résumé, les complexes moléculaires associés aux récepteurs de mort induisent l'activation des caspases par l'intermédiaire des DDs, DEDs ou CARDs dans des interactions du type FADD/caspase-8 ou -10 ; TRADD/FADD/caspase-8 ou -10 et TRADD/RIP/RAIDD/caspase-2 (figure 1).

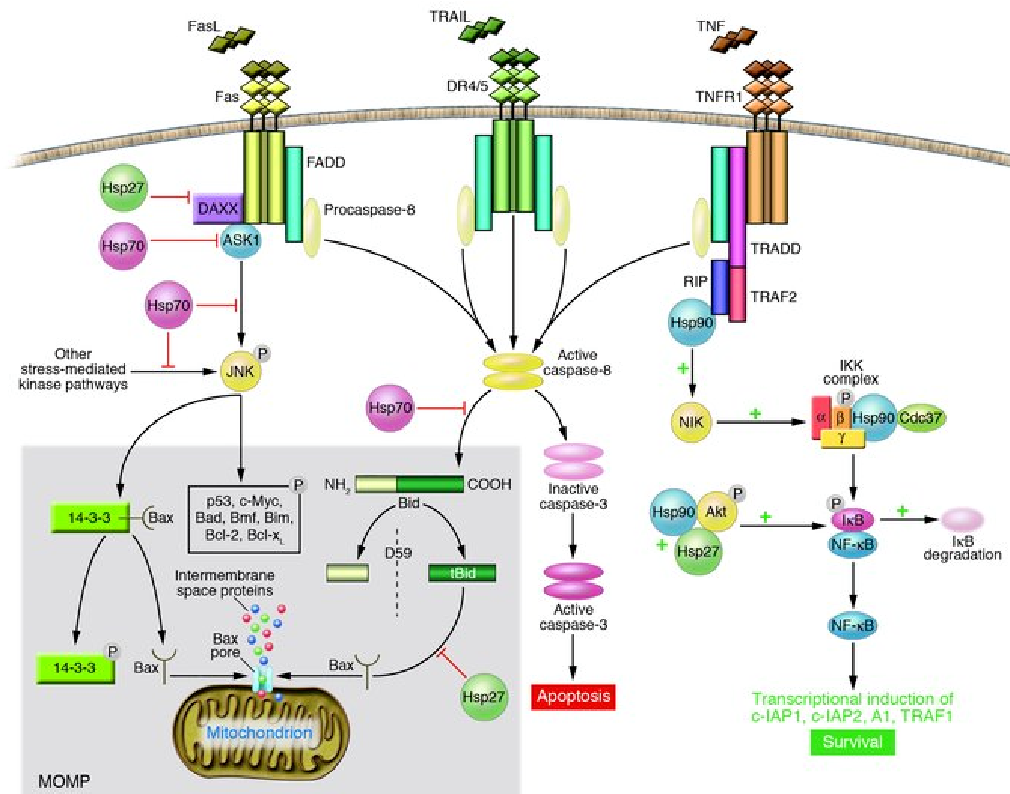


Figure 1 : les récepteurs de mort et leurs cascades de signalisation en réponse à leur activation. (Voir texte pour détails) (D'après Beere, 2005).

Plusieurs autres protéines sont directement associées à Fas ou influencent son activation. Par exemple, DAXX (Torii & al, 1999), FLASH (Imai & al, 1999) ou Toso (Hitoshi & al, 1998) jouent un rôle dans la régulation de l'apoptose induite par les récepteurs de mort. Toso est un membre de la super-famille des immunoglobulines. Il est capable de bloquer spécifiquement l'apoptose induite par les TNF-R, dont Fas notamment, et joue probablement un rôle dans le devenir des cellules T (Hitoshi & al, 1998 ; Pallasch & Wendtner, 2009). FLASH fait partie intégrante du complexe moléculaire associé au récepteur Fas (complexe DISC). Les auteurs ont montré qu'il était nécessaire à l'activation de la caspase-8 suite à une stimulation du récepteur (Imai & al, 1999).

1.5.2- La voie intrinsèque mitochondriale.

Une autre voie moléculaire conduisant à l'activation des pro-caspases initiatrices a été décrite, il s'agit de la voie intrinsèque. Elle s'appelle ainsi car les stimuli initiaux à l'origine du déclenchement de celle-ci sont « intrinsèques », *i.e.* à l'intérieur de la cellule, par opposition aux récepteurs de mort situés à la surface de la cellule qui déclenchent la voie extrinsèque. Dans la voie intrinsèque, les pro-caspases-9 s'auto-activent après agrégation au sein d'un complexe cytosolique multimoléculaire appelé **apoptosome** (pour revues *Riedl & Salvesen, 2007 ; d'Amelio & al, 2008*). Le cœur de la structure de l'apoptosome est une protéine cytoplasmique Apaf-1 (pour Apoptosis Protease-Activating Factor-1), homologue humain de Ced-4, qui change de conformation après interaction entre son domaine C-terminal riche en séquences répétées WD40, et le cytochrome-c en présence d'ATP ou plus efficacement de déoxyATP. Ce changement conformationnel permet aux oligomères (heptamères) d'Apaf-1, par l'intermédiaire de leurs domaines CARD N-terminaux, de recruter et d'auto-activer sept dimères de pro-caspase-9 (figure 2) (*Malladi & al, 2009*).

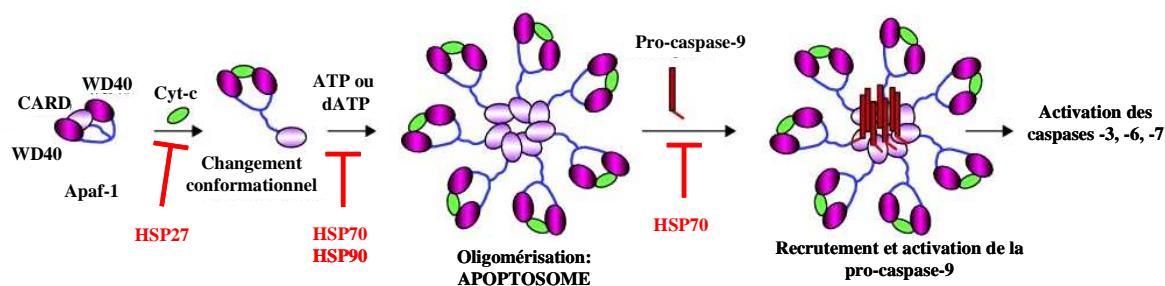


Figure 2 : Formation de l'apoptosome et recrutement et activation de la pro-caspase-9. (D'après Segal-Berdirdjian, 2005).

Ces événements sont étroitement régulés par plusieurs protéines de choc thermique dites HSP (ou Heat Shock Proteins) comme HSP27 ou HSP70 (figure 2) (pour revue *Lanneau & al, 2008*). Tout comme pour la pro-caspase-8, la faible activité protéolytique des pro-caspases-9 est suffisante pour leur auto-activation. Les caspases-9 actives vont pouvoir activer à leur tour les caspases effectrices. La formation de l'apoptosome est secondaire à la relocalisation du cytochrome-c, normalement situé dans l'espace intermembranaire mitochondrial (EIM) vers le cytosol. Celle-ci est déclenchée par une perméabilisation accrue de la membrane mitochondriale externe (MME) lors de l'apoptose, phénomène modulé par les membres anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Ainsi, la différence majeure entre les voies extrinsèque et intrinsèque réside dans le fait que cette dernière met en jeu un acteur majeur de la phase effectrice de l'apoptose, la **mitochondrie**.

La mitochondrie est au centre du processus apoptotique. Sa participation active à la mort cellulaire est secondaire à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME) sous la dépendance des membres de la famille Bcl-2 modulant la perméabilité de la MME, et consécutivement la libération de facteurs pro-apoptotiques résidant habituellement dans l'espace intermembranaire mitochondrial (EIM), vers le cytosol.

a) La famille Bcl-2.

Plus d'une quinzaine de protéines de la famille Bcl-2 sont décrites dans les cellules de mammifères (*Chao & Korsmeyer, 1998 ; Gupta S, 2009*). Elles ont toutes 1 à 4 domaines homologues connus comme « bcl-2 homology domain » (BH1 à BH4). Le domaine BH4 a un effet anti-apoptotique. Les domaines BH1, BH2 et BH3 sont nécessaires à la dimérisation avec d'autres protéines de la famille Bcl-2. La plupart des membres de Bcl-2 possèdent une région transmembranaire qui leur permet de s'insérer dans les membranes intracellulaires telles que la membrane nucléaire, la membrane du réticulum et également la membrane mitochondriale externe (pour revue *Youle & Strasser, 2008*). Sur la base des caractéristiques fonctionnelles et structurales, la famille Bcl-2 est habituellement divisée en 3 sous-groupes (figure 3) (pour revue *Danial, 2007*). Le premier regroupe les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 lui-même, Bcl-x_L, ou Mcl-1 qui possèdent les régions d'homologie BH1, BH2, BH3 et BH4. Le second regroupe les protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bok, et Bcl-Rambo caractérisées par la présence de plusieurs régions d'homologie BH1, BH2 et BH3, à l'exception notable de BH4. Bax et Bak sont essentiels pour l'induction de l'apoptose puisque les cellules déficientes à la fois en Bax et en Bak sont résistantes à la perméabilisation de la MME induite par de nombreux stimuli pro-apoptotiques (*Wei & al, 2001*). Enfin, le dernier sous-groupe appelé le groupe des protéines «BH3-only» est constitué d'un nombre croissant de protéines comme Bad, Bid, Bik, Bim, HRK (Harakiri), Noxa, Puma, Bmf, Bcl-G... composées d'une unique région d'homologie BH3.

Ces protéines modulent indirectement l'apoptose en contribuant à l'oligomérisation pro-apoptotique de Bax et/ou de Bak, puisque leur surexpression ne restaure pas la perméabilisation de la MME et l'apoptose des cellules déficientes en Bax et Bak (*Cheng & al,*

2001). A l'inverse, la surexpression de Bcl-2 ou Bcl-X_L est capable de bloquer la perméabilisation de la MME induite par la surexpression des protéines BH3-only en présence de Bax et de Bak (Tsujiimoto, 2003).

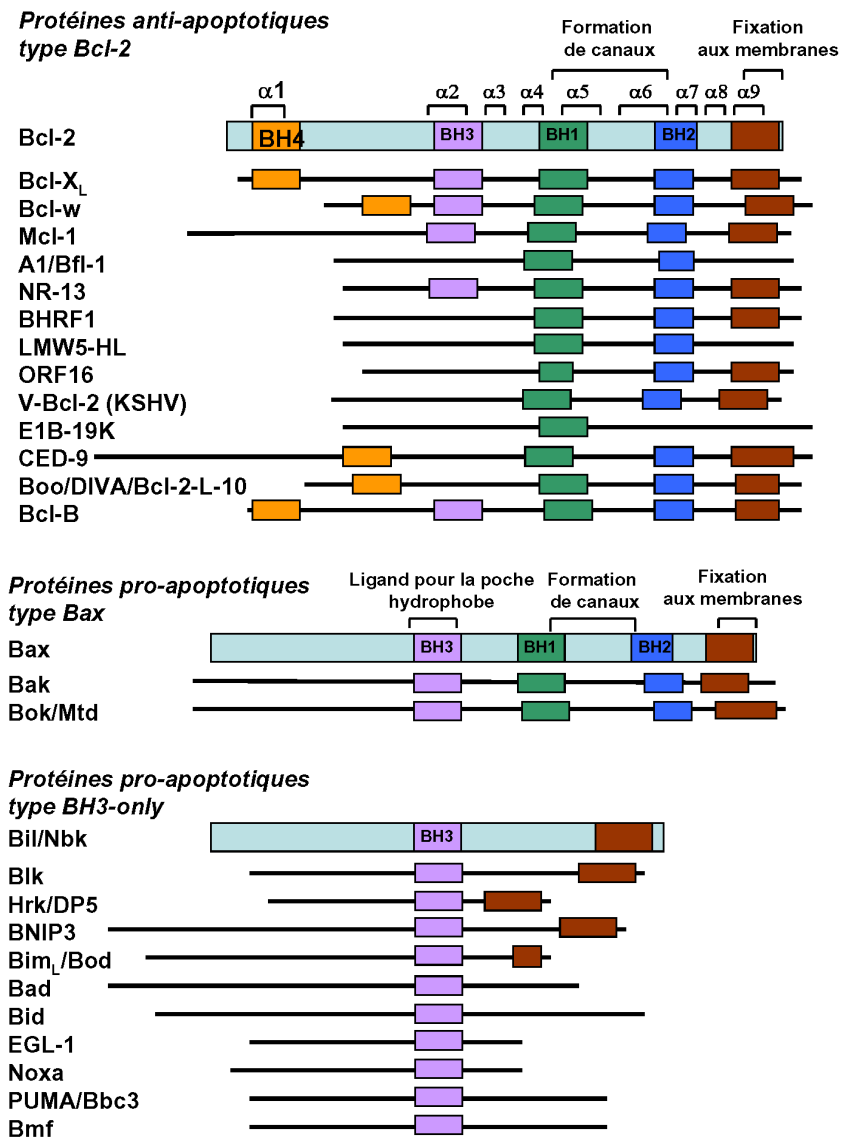


Figure 3. Classification des protéines de la famille Bcl-2 : Les protéines de la famille Bcl-2 sont constituées de 1 à 4 domaines BH (pour Bcl-2 homology) et divisées en 3 sous-familles: les facteurs de survie ou protéines anti-apoptotiques type Bcl-2 possédant les régions d'homologie BH1, BH2, BH3 ou BH4; les facteurs de mort ou protéines pro-apoptotiques type Bax possédant BH1, BH2 ou BH3 mais rarement BH4 ou de la sous-famille « BH3-only », caractérisées par la seule présence de BH3. L'extrémité C-terminale de plusieurs protéines est une hélice hydrophobe (marron) qui permet l'ancrage dans les membranes lipidiques.

En d'autres termes, la combinaison de différentes protéines de la famille Bcl-2 est cruciale pour la détermination de l'engagement ultime des mitochondries dans l'apoptose. Ainsi, la décision cellulaire de mourir serait centrée sur l'inclinaison de la balance d'expression totale des membres de la famille Bcl-2, d'une position anti-apoptotique (pro-survie) vers une position pro-apoptotique (figure 4) : c'est le modèle du rhéostat (Chipuk JE & Green DR, 2008).

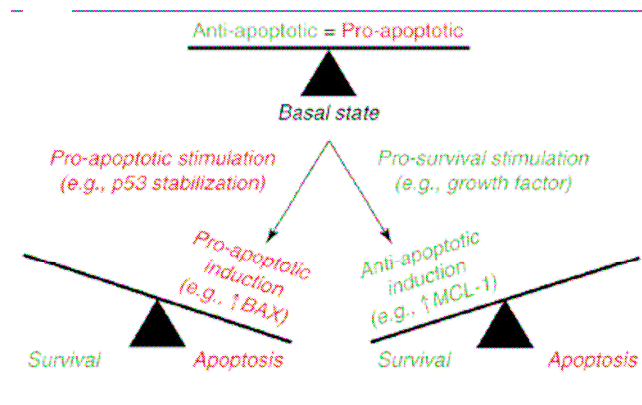


Figure 4 : La balance des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dicte le devenir cellulaire (d'après Chipuk & Green, 2008).

Le modèle du rhéostat postule que dans un état basal hypothétique, le nombre de molécules anti-apoptotiques et pro-apoptotiques est égal, et l'inclinaison de cette balance dicte le devenir cellulaire. Lors d'un stress (par exemple, des dommages de l'ADN), l'induction des molécules pro-apoptotiques délivre le signal pour enclencher la perméabilisation de la MME. A l'inverse, l'ajout de facteurs de croissance ou tout signal favorable, encourage la survie cellulaire en augmentant le taux des protéines anti-apoptotiques. Bien que ce modèle du rhéostat soit le fondement des connaissances acquises sur les fonctions des membres de la famille Bcl-2, il n'explique pas les complexités plus récemment découvertes dans la famille Bcl-2. La manière dont la cellule tolère des taux relativement élevés de Bax et/ou Bak sans que ces protéines ne soient constitutivement liées aux membres anti-apoptotiques, ne trouve aucune explication dans le modèle du rhéostat. Il en est de même sur comment certaines protéines BH3-only et pas d'autres activent Bax et/ou Bak et provoquent la perméabilisation de la MME. Ainsi un nouveau débat est lancé sur la manière dont les protéines de la famille Bcl-2 déclenchent la mort cellulaire mitochondriale (Chipuk & Green, 2008).

b) Les mécanismes de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe lors de l'apoptose.

Il existe actuellement au moins deux mécanismes principaux probablement non mutuellement exclusifs pouvant expliquer la perméabilisation de la MME lors de l'apoptose. Ils diffèrent par l'implication ou non de modifications fonctionnelles de la membrane mitochondriale interne (MMI) associées aux altérations de la MME.

▪ **Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe avec respect de la membrane mitochondriale interne.**

L'augmentation de perméabilité de la MME lors de l'apoptose peut s'expliquer par un mécanisme qui implique directement les membres de la famille Bcl-2 indépendamment d'altérations de la membrane interne. En conséquence, la mise en jeu de ce mécanisme a lieu en l'absence de chute du potentiel de membrane mitochondriale. Lors d'un stimulus apoptotique, les protéines pro-apoptotiques telles que Bax et/ou Bak sont transloquées vers la mitochondrie, changent de conformation et s'oligomérisent au niveau de la MME pour former un canal capable de déverser des protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial, dont le cytochrome-c. A l'appui de cette hypothèse, Bcl-2, Bcl-X_L et Bax partagent des similitudes structurales avec le domaine responsable de la formation de pores de certaines toxines bactériennes (*Suzuki & al, 2000*). En outre, les oligomères de Bax seuls ou avec la protéine BH3-only tBID sont capables de former, dans les liposomes, des ouvertures permettant le passage de molécules de dextran de grande taille, jusqu'à 2MDa (*Kuwana & al, 2002*).

L'activation de Bax et/ou de Bak peut être favorisée par la synthèse accrue et/ou certaines modifications post-traductionnelles favorisant la translocation mitochondriale des protéines « BH3-only » considérées comme de véritables émissaires de mort (*Gupta, 2009*).

Bim et Bid sont capables d'activer Bax de manière directe tandis que les autres protéines BH3-only (par exemple Noxa, Puma, Bad) agissent indirectement en séquestrant les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*Kuwana & al, 2002*). L'activation du groupe de protéines BH3-only peut survenir suite à différents stress cellulaires (sevrage en facteurs de croissance, dommages microtubulaires ou nucléaires) décrivant alors la voie apoptotique dite intrinsèque.

La voie extrinsèque, celle des récepteurs de mort, peut également, dans certains modèles cellulaires, posséder un relai mitochondrial impliquant l'activation de membres de la famille

Bcl-2. Une protéine du groupe « BH3-only », Bid, est considérée comme le lien le plus important entre les voies extrinsèque et intrinsèque mitochondriale. En effet, après l'engagement des récepteurs de mort et la formation du DISC, la caspase-8 active peut, dans certaines cellules, activer par protéolyse Bid (figure 5).

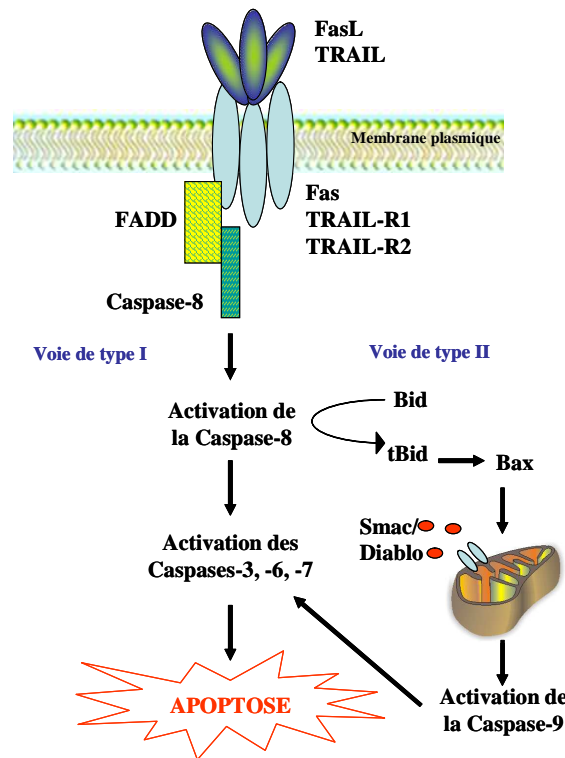


Figure 5 : les voies apoptotiques extrinsèques de type I (dite classique) et de type II (impliquant Bid et la mitochondrie)

Après clivage, le fragment C-terminal de Bid résultant, encore appelé forme tronquée de Bid ou tBid, va s'insérer dans la MME afin de provoquer la libération de cytochrome-c (Cyt-c) selon un mécanisme non totalement caractérisé (Nagata, 1999). En outre, la forme native non clivée de Bid pourrait également s'insérer au sein des membranes mitochondriales et fonctionner comme une transférase de lipides entre la mitochondrie et d'autres membranes intracellulaires (Esposti & al, 2003). Les protéines Bax ou Bak sont ensuite activées par Bid pour permettre la perméabilisation de la MME et également le remodelage des crêtes mitochondriales (Scorrano & al, 2002) permettant la libération maximale de Cyt-c. En effet, la reconstruction tridimensionnelle des membranes mitochondriales indique que l'espace entre les crêtes qui contient le plus de Cyt-c (Bernardi & Azzone, 1981) est séparé de l'espace intermembranaire par des ouvertures dont la taille ne permet pas, dans des circonstances normales, le passage du Cyt-c. Par contre, lors du remodelage des crêtes, la profonde

réorganisation de la membrane mitochondriale interne (MMI) pourrait favoriser l'augmentation de taille des ouvertures permettant ensuite l'accès du Cyt-c à l'EIM (*Scorrano & al, 2002*). D'autres événements viennent favoriser l'effet mitochondrial pro-apoptotique de tBid. Parmi ceux-ci, la translocation des cardiolipines de la MMI à la MME au travers des sites de contact entre ces deux membranes, pourrait représenter un événement important nécessaire à l'effet mitochondrial de tBid. En effet, non seulement tBid s'associe préférentiellement aux liposomes qui contiennent des cardiolipines, mais leur présence est une nécessité absolue pour la liaison de tBid, comme le suggère les études sur des souches de levures déficientes en cardiolipines (*Gonzalvez & al, 2005*).

La voie déclenchée par les récepteurs de mort impliquant Bid et la mitochondrie est appelée voie de type II, en opposition à la voie extrinsèque classique indépendante des mitochondries dite de type I (figure 5). Celle-ci est activée dans certains types cellulaires lorsque l'expression des IAPs empêche l'activation directe de la cascade des caspases. Dans ces conditions, la voie de type II permet la mort non pas par libération mitochondriale de Cyt-c, mais par la libération mitochondriale d'inhibiteurs des IAPs comme Smac/DIABLO (voir plus loin).

Ce processus de perméabilisation de la MME est régulé par les autres membres de la famille Bcl-2. La séquestration des protéines pro-apoptotiques par les protéines anti-apoptotiques empêche celles-ci de perméabiliser la mitochondrie (*Cheng & al, 2001*). Ainsi, la protéine Bcl-2 se lie aux protéines pro-apoptotiques à travers l'interaction du domaine BH3 des protéines anti-apoptotiques avec une poche hydrophobe formée par les protéines pro-apoptotiques. En conséquence, le ratio entre les protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 a été décrit comme le rhéostat de la vie et de la mort cellulaire.

▪ **Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe associée à des altérations fonctionnelles de la membrane mitochondriale interne, définissant la transition de perméabilité mitochondriale.**

Les modifications de la perméabilité membranaire mitochondriale ont été initialement observées en mesurant le potentiel électrique de la MMI ($\Delta\Psi_m$) par cytométrie de flux en utilisant des sondes fluorescentes cationiques (pour revue *Ly & al, 2003*). Ce potentiel est la résultante de la distribution asymétrique des charges entre les faces interne et externe de la MMI. Ce gradient est maintenu par l'imperméabilité de la MMI aux ions et par le

fonctionnement d'au moins trois complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire qui pompent des protons hors de la matrice. Le $\Delta\Psi_m$ est nécessaire au bon fonctionnement de l'ATP synthase. L'entrée d'un proton au travers de cette enzyme, du cytosol vers la matrice mitochondriale, permettra la rotation de ce véritable moteur moléculaire et de manière concomitante la synthèse d'ATP. Dans beaucoup de modèles cellulaires, au cours de l'induction de l'apoptose, le $\Delta\Psi_m$ chute précocement (*Kroemer & al, 1995*), suggérant de profondes modifications de la perméabilité de la MMI.

Ainsi, à côté du mécanisme mentionné précédemment, il existe un phénomène appelé transition de perméabilité (TP) qui s'accompagne d'anomalies de la membrane mitochondriale interne, observée dans certains modèles d'apoptose comme de nécrose. La TP a été observée pour la première fois en 1970 par Hunter et Haworth (*1976 ; 1979*). Elle est caractérisée par une augmentation abrupte de la perméabilité de la MMI aux solutés de moins de 1500 Da. Le calcium, l'ion pyrophosphate et les composés oxydants favorisent l'initiation de la transition de perméabilité mitochondriale (MPT), alors que le Mg^{2+} , un pH faible ou un potentiel de membrane élevé s'opposent à son initiation. Dans les années 80, on découvre que l'agent immunosuppresseur Cyclosporine A, bloque l'initiation de la MPT (*Fournier & al, 1987 ; Crompton & al, 1988*), initiant les premières hypothèses selon lesquelles la transition de perméabilité impliquerait une protéine canal ou un pore, plutôt qu'une altération non spécifique des membranes. Faits confirmés par les techniques de patch-clamp qui identifient un pore sensible à la cyclosporine sur les membranes mitochondriales (*Szabo & al, 1991*). Il s'agit de l'ouverture d'un mégacanal mitochondrial ou pore de TP (MPTP), complexe multimoléculaire situé aux points de contacts entre les membranes mitochondriales externe et interne (*Green & Kroemer, 2004*). Aujourd'hui la constitution moléculaire de ce pore, bien qu'encore incertaine, devient de plus en plus précise (figure 6). Il se composerait d'une porine appelée VDAC pour « voltage-dependent anion channel », de l'hexokinase II (HX), du récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), de la créatine kinase (CK), de l'« adénine nucleotide translocator » (ANT), de la cyclophiline-D (CyD) et de certains membres de la famille Bcl-2 comme Bax ou même Bcl-2. VDAC, PBR, HX se situent au niveau de la membrane mitochondriale externe, la CK dans l'espace intermembranaire, l'ANT est enchâssé dans la membrane interne (où il intervient dans l'échange entre l'ATP matriciel et l'ADP cytosolique), et la CyD localisée dans la matrice (figure 6). La MME grâce au VDAC est perméable aux solutés ayant un poids moléculaire inférieur à 5 kDa, tandis que la membrane interne, riche en cardiolipines, n'est perméable qu'à l'oxygène et au dioxyde de

carbone mais reste imperméable aux ions H^+ . Cette imperméabilité de la MMI assure le maintien du gradient électrochimique $\Delta\Psi_m$ généré par la chaîne respiratoire et impliqué dans la phosphorylation oxydative. Cependant de nouveaux résultats basés sur l'inactivation génétique de molécules putatives du pore de TP ont contribué à jeter le trouble sur le rôle primordial de la MPT lors de la mort apoptotique (pour revue *Bernardi & al, 2006*). Il en résulte que l'ANT comme la CyD ne sont probablement pas des molécules indispensables à la MPT et consécutivement à l'apoptose (*Baines & al, 2005 ; Kokoszka & al, 2004 ; Nakagawa & al, 2005*). A l'inverse, certaines voies aboutissant à la nécrose sont clairement contrôlées par la CyD (*Nakagawa & al, 2005*).

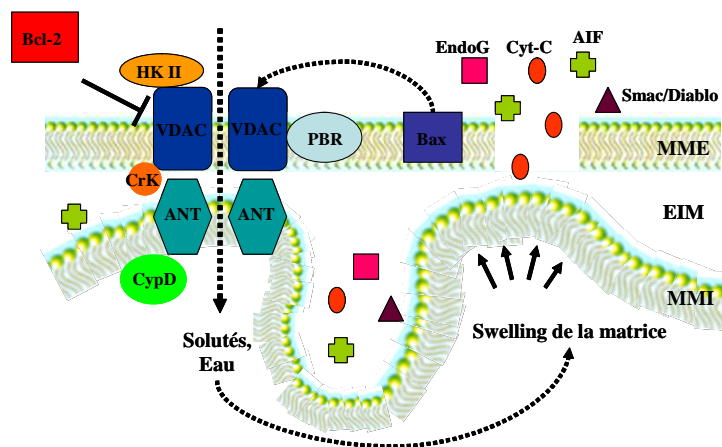


Figure 6 : Modèle du pore de transition de perméabilité mitochondriale. L'ouverture du méga-canal voltage-dépendant conduit au gonflement de la matrice mitochondriale entraînant la rupture de la MME. L'ouverture et la fermeture de ce pore est régulée par un certain nombre de facteurs, dont les membres de la famille de Bcl-2. (d'après Fulda)

L'ouverture du mégacanal mitochondrial conduit d'abord à une perméabilisation des membranes mitochondriales à l'eau comme aux solutés inférieurs à 1500 Da. Il s'en suit un gonflement colloïdosmotique de la matrice mitochondriale avec pour conséquence une distension de la MMI. Etant donné que la surface de celle-ci est beaucoup plus importante que celle de la MME, dans un second temps, la force exercée par la MMI ainsi étirée provoque des points de rupture au niveau de la MME, à l'origine de la perméabilisation de la MME. La TP se traduit par des altérations de perméabilité de la MMI, à l'origine d'altérations fonctionnelles mitochondriales telles qu'une réduction du $\Delta\Psi_m$ à l'origine d'un découplage de la chaîne respiratoire et de la production d'anions superoxydes, suivies d'une diminution de la production d'ATP. Ce processus est habituellement défini par son inhibition transitoire par la cyclosporine A ou ses dérivés non immunosuppresseurs, et également favorisé par l'accumulation de Ca^{2+} au sein de la matrice mitochondriale. Ainsi dans ce modèle, la

participation de la mitochondrie dans l'apoptose implique une altération morphologique (gonflement ou swelling, rupture de la MME) et fonctionnelle (altération de la chaîne respiratoire, chute du potentiel de membrane mitochondriale, production de radicaux libres et réduction de synthèse d'ATP). Ces deux effets, perméabilité de la MME et altérations fonctionnelles mitochondriales, participent activement à la mort cellulaire.

L'ouverture du pore de TP est également régulée par la famille Bcl-2. Ainsi, la protéine pro-apoptotique Bax est capable d'interagir avec certains membres du pore comme le VDAC ou porine et/ou l'ANT (Brenner & Kroemer, 2000) pour favoriser la TP, tandis que Bcl-2 prévient l'ouverture du pore. Ce modèle de perméabilisation de la membrane externe par TP est particulièrement pertinent dans l'apoptose induite par ischémie-reperfusion ou en réponse à un stress cellulaire inducteur de seconds messagers comme le calcium, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), de céramides ou du monoxyde d'azote capables d'ouvrir le pore de TP (figure 7) (Lemasters, 1999). Les éléments moléculaires qui composent ce pore peuvent être la cible d'agents pharmacologiques capables de provoquer son ouverture et en conséquence pourraient constituer des cibles potentielles pour induire la mort cellulaire.

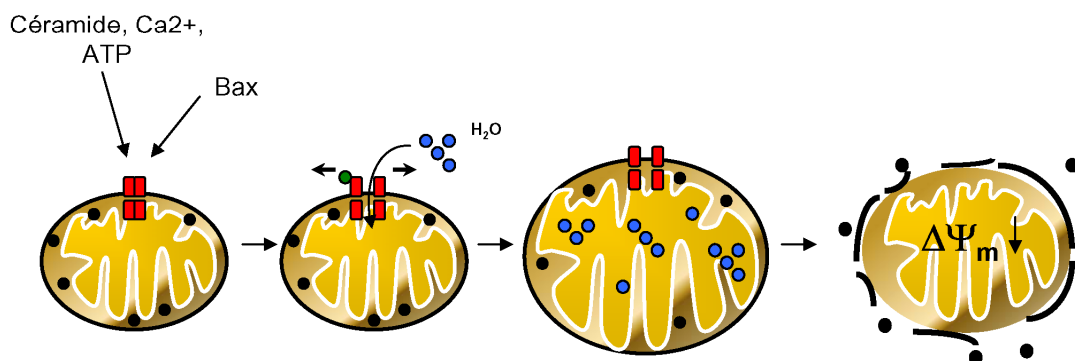


Figure 7. Modèle de la transition de perméabilité : (a) A l'état physiologique, la perméabilité du pore de MTP (MPTP) est réduite (b) Sous l'action d'inducteur, le MPTP s'ouvre : l'eau et les solutés entrent alors dans la matrice mitochondriale. (c) L'expansion de la membrane interne provoque des ruptures locales au niveau de la membrane externe, permettant la libération des facteurs pro-apoptotiques et la chute de $\Delta\Psi_m$.

▪ **La fission mitochondriale : un autre modèle de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe ?**

Les mitochondries sont des organites dynamiques dont l'équilibre est, normalement, maintenu par la balance entre fusion et fission ou division. Ces deux phénomènes sont sujets à une régulation complexe impliquant de nombreuses protéines qui maintiennent l'intégrité des compartiments mitochondriaux lors de ces processus. Récemment, il a été émis l'hypothèse

selon laquelle la perméabilité accrue de la MME pourrait dépendre de la machinerie moléculaire impliquée dans la fission mitochondriale (Jourdain, 2009). Cette hypothèse repose sur les arguments suivants :

- Le réseau mitochondrial est fragmenté lors de l'apoptose (Jourdain, 2009).
- Les changements morphologiques des membranes mitochondriales qui précèdent la libération de cytochrome-c ressemblent à ceux observés lors de la fission (Perfettini & al, 2005).
- Bax interagit avec l'endophiline-1, une protéine régulatrice des divisions mitochondriales (Karbowski & al, 2004). Ainsi Bax pourrait favoriser la fission mitochondriale qui à son tour permettrait la perméabilisation de la MME.
- Chez la levure, les protéines qui régulent la fission mitochondriale contrôlent la mort cellulaire (Fannjiang & al, 2004).

Cette hypothèse séduisante n'a cependant pas encore totalement été validée chez les cellules de mammifères.

c) Les conséquences de la perméabilisation accrue de la membrane mitochondriale externe lors de l'apoptose : libération dans le cytosol d'une multitude de facteurs pro-apoptotiques.

Par une approche protéomique, plus de 30 protéines différentes libérées par les mitochondries au cours de l'apoptose ont été mises en évidence (Patterson & al, 2000). Parmi celles-ci, plusieurs sont impliquées dans une signalisation pro-apoptotique plus ou moins bien caractérisée (Tableau II). Ainsi, outre le cytochrome-c, d'autres protéines peuvent être nécessaires à l'activation des caspases. En effet, la libération de cytochrome-c par elle-même peut s'avérer insuffisante pour induire l'apoptose, du fait d'un blocage des caspases en aval par l'expression soutenue des IAPs. L'existence d'un second facteur mitochondrial activateur d'apoptose, libéré par la mitochondrie, est ainsi nécessaire pour tuer la cellule. C'est le cas de la protéine mitochondriale appelée Smac (Second mitochondrial activator of caspases) ou DIABLO (Direct IAP Binding protein with Low pI), qui est capable dans le cytosol de lever l'inhibition des caspases en neutralisant les IAPs après interaction directe par sa partie N-terminale (Du & al, 2000). De la même manière que Smac/DIABLO, le facteur mitochondrial Omi/HtrA2 est capable d'augmenter l'activité des caspases puisqu'il possède également un domaine N-terminal capable de se lier aux IAPs (Suzuki & al, 2001 ; Verhagen & al, 2002). Il possède en outre une activité sérine-protéase qui lui permet de promouvoir l'apoptose de façon indépendante des caspases.

En fonction du type cellulaire, des pro-caspases (*Mancini & al, 1998 ; Susin & al, 1999*) ont été identifiées dans l'EIM. L'activation protéolytique de ces pro-caspases, qui n'apparaît que lorsque celles-ci sont libérées dans le cytosol, est facilitée par la sortie concomitante de la mitochondrie d'Hsp-60 et -10, et nécessite la dénitrosylation du résidu cystéine présent dans le site actif (*Samali & al, 1999*).

A côté des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux activateurs de caspases détaillés précédemment, il existe d'autres facteurs pro-apoptotiques libérés par la mitochondrie lors de l'apoptose, impliqués dans une voie de signalisation apoptotique indépendante des caspases. Parmi les facteurs indépendants des caspases, AIF (Apoptosis Inducing Factor) fut le premier caractérisé en 1996 (*Susin & al, 1996*). A côté d'AIF, l'endonucléase G (EndoG), une nucléase spécifique de la mitochondrie, est libérée dans le cytosol pour induire la fragmentation nucléosomale de l'ADN indépendamment des caspases et de DFF40/CAD (*Li & al, 2001*). En présence de co-activateurs (tel FEN1 pour Flap endonuclease 1), l'EndoG clive l'ADN simple et double brin mais également l'ARN. Ces clivages de l'ADN se font au niveau des liaisons internucléosomiques et des boucles de chromatine mais il existe également un clivage internucléosomal de 10,4pb de période (*Widlak & al, 2003 ; Widlak & Gerrard, 2005*). Il est possible que les deux facteurs indépendants des caspases, AIF et EndoG, puissent agir de concert puisque, chez *C. elegans*, WAH-1, l'homologue d'AIF, s'associe et coopère avec CSP6, l'homologue de l'endonucléase G, pour induire la dégradation de l'ADN et l'apoptose (*Wang & al, 2002*).

Une polémique persiste sur la cinétique de libération des protéines pro-apoptotiques à partir de l'EIM : les protéines pro-apoptotiques sont-elles libérées toutes au même instant ou leur libération est-elle séquentielle dans le temps ? Dans certains modèles cellulaires, la mobilisation du cytochrome-c est un événement qui précède la libération des autres protéines de l'EIM (*Arnoult & al, 2003*). Ceci peut être la conséquence de l'observation selon laquelle la libération d'AIF peut nécessiter des étapes de maturation préalables (*Otera & al, 2005*) impliquant un clivage dépendant des calpaïnes (*Polster & al, 2005*). A l'inverse, dans d'autres modèles cellulaires, AIF est libéré avant le cytochrome-c, et dès lors qu'il se trouve dans le cytosol, AIF favorise par lui-même la libération mitochondriale de cytochrome-c (*Cregan & al, 2002 ; Susin & al, 1999*). Cela peut être consécutif au fait que le cytochrome-c étant fortement lié à la MMI par des forces électrostatiques et hydrophobes, sa cinétique de

libération est retardée par rapport aux autres facteurs, tels qu'AIF ou Smac/Diablo (*Uren & al, 2005*).

En outre, le rôle des caspases dans la perméabilisation mitochondriale reste complexe. L'incubation de mitochondries isolées provoque la libération de cytochrome-c et de Smac/DIABLO dans le cytosol (pour revue *Marzo & al, 1998*). La pro-caspase-2 peut s'insérer dans la membrane mitochondriale et favoriser le détachement du cytochrome-c des cardiolipines (*Enoksson & al, 2004*). La caspase-3 active peut, semble-t-il, entrer dans la mitochondrie pour cliver un composant du complexe I de la chaîne respiratoire et provoquer une réduction drastique de transport d'électrons (*Ricci & al, 2004*). D'autres études sur cellules intactes comme sur mitochondries isolées ont démontré que l'inhibiteur de caspases à large spectre z-VAD.fmk est capable d'inhiber la libération de la plupart des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux à l'exception du cytochrome-c (*Arnoult & al, 2003*). De manière étonnante, les cellules issues de souris déficientes en caspase-3 et -7 sont non seulement résistantes à la mort mais présentent également un retard important de la fuite mitochondriale de cytochrome-c et de translocation de Bax, quelque soit l'inducteur utilisé (*Lakhani & al, 2006*). Ces résultats suggèrent que les caspases dites effectrices sont également des médiateurs importants de la survenue des événements mitochondriaux apoptotiques selon des mécanismes qui restent à démontrer.

Tableau II : Caractéristiques fonctionnelles des protéines mitochondriales libérées lors de l'apoptose

Protéines	Fonction dans l'EIM	Fonction après libération mitochondriale
Cytochrome-c	Navette entre complexes III et IV de la chaîne respiratoire	Activation cytosolique de l'apoptosome - voie dépendante des caspase
AIF	Flavoprotéine (activité NADH oxydase)	Dégradation nucléaire indépendante des caspases (fragments de 50 kpb)
AMID	Flavoprotéine homologue d'AIF	n.d.
Endonucléase G		Dégradation nucléaire indépendante des caspases
Smac/DIABLO	n.d.	Inhibiteur des IAPs
HtrA2/OMI	n.d.	Inhibiteur de XIAP, sérine protéase
ARTS ^a	n.d.	Inhibiteur de XIAP
Pro-caspases -2, -3, -8, -9	n.d.	Voie dépendante des caspases
Hsp 60, Hsp10	chaperonne	Maturation des caspases ?
Adenylate kinase 2, Sulfite oxydase, Acyl-CoA binding protein, Fatty-acid binding protein 1, polypyrimidine tract-binding protein	métaboliques	n.d.

n.d.: non déterminé, ^a appartient à la famille des septines

II- Les voies apoptotiques alternatives indépendantes des caspases.

Plusieurs constatations indiquent que l'apoptose n'est pas synonyme d'activation des caspases :

(i) Certaines manifestations apoptotiques sont indépendantes des caspases. C'est le cas du rétrécissement cellulaire, de la condensation nucléaire périphérique et parfois du blebbing (*Hirscht & al, 1998*).

(ii) Certains modèles d'apoptose surviennent sans activation des caspases. Par exemple, la surexpression de Bax induit la mort des cellules indépendamment des caspases. Autre exemple, l'activation du récepteur CD2 à la surface des thymocytes conduit à l'apoptose indépendamment des caspases.

(iii) Enfin, l'inhibition des caspases *in vitro*, bien qu'empêchant l'apparition du phénotype apoptotique, n'est pas capable d'éviter la mort cellulaire (*Gallego & al, 2004*).

L'ensemble de ces données indique qu'il peut exister à côté des caspases d'autres effecteurs de l'apoptose (*Jäättelä, 2002 ; Galluzi & al, 2008*).

2.1- La voie dépendante d'AIF.

Le Facteur Inducteur d'apoptose AIF (pour Apoptosis Inducing Factor) est une flavoprotéine mitochondriale impliquée dans la chaîne respiratoire mais également un des principaux effecteurs de la mort cellulaire indépendante des caspases (*Susin & al, 2000 ; Candé & al, 2002 ; Cregan & al, 2004 ; Kroemer & Martin, 2005*). Le gène de l'AIF est localisé sur le chromosome X et code pour une protéine de 57kDa. L'AIF humain est une protéine de 613 acides aminés (AA) divisée en 3 domaines : un domaine N-terminal de 100 AA contenant la séquence d'insertion mitochondriale (MLS), 3 domaines centraux contenant des domaines de liaison à FADH et NADH et un domaine C-terminal de 127 AA.

Le précurseur de l'AIF (67kDa) est synthétisé dans le cytoplasme puis importé jusqu'à l'EIM, lié à la membrane interne (*Otera & al, 2005*). L'AIF y a tout d'abord un rôle physiologique. Il est nécessaire à la stabilité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (*Vahsen & al, 2004*), peut oxyder le NADH et le NADPH *in vitro* (*Miramar & al, 2001*), participe à la détoxification des ROS (*Klein & al, 2002*) ou au maintien des niveaux de glutathion (*Candé & al, 2004*). L'AIF est donc bien plus qu'un simple facteur inducteur d'apoptose (*Joza, 2009*). Les analyses biochimiques indiquent que les fonctions apoptotiques et redox d'AIF sont portées par des régions distinctes de la protéine. Il est à noter que le cytochrome-c comme AIF sont donc tous les deux des protéines bi-fonctionnelles, i.e. indispensables à la vie et probablement aussi à la mort cellulaire.

Lors de l'apoptose, AIF est détaché de son ancrage intermembranaire mitochondrial par des cystéines protéases, les calpaïnes et/ou les cathepsines. Une fois libéré de la mitochondrie, AIF ne réside pas dans le cytosol mais va transloquer vers le noyau pour induire la condensation et une fragmentation de l'ADN nucléaire en fragments de haut poids moléculaire (*Susin & al, 1999*) indépendamment des caspases. La structure cristallographique de la protéine AIF démontre la présence à sa surface d'acides aminés chargés positivement donc capables d'établir des liaisons électrostatiques avec l'ADN. Néanmoins, des travaux *in vitro* ont montré qu'un AIF recombinant pouvait se lier indifféremment à l'ADN et à l'ARN. De plus, AIF se lie préférentiellement à l'ADN simple brin plutôt qu'à l'ADN double brin (*Vahsen & al, 2006*). La liaison à l'ADN et la condensation chromatiniennne par l'AIF nécessitent la présence de Mg^{2+} et sont stimulées par l'addition de $NADP^+$. Des études réalisées sur *C. elegans* ont montré qu'AIF, après son entrée dans le noyau, pouvait interagir avec une série d'exo- et d'endo-nucléases formant une structure appelée le « **dégradosome** » (*Modjtahedi & al, 2006*). Dans les cellules humaines, AIF pourrait coopérer avec la

Cyclophyline-A pour induire ses effets nucléaires (Candé, 2004 ; Zhu & al, 2007). L'AIF cytosolique est inhibé par la protéine chaperonne Hsp70 (Ravagnan & al, 2001), comme en témoigne la surexpression de Hsp70 *in vitro* sur la condensation chromatinienne et *in vivo* au niveau nucléaire et mitochondrial. L'action anti-apoptotique des Hsp70 a d'abord été décrite comme altérant les voies dépendantes des caspases par inhibition de la formation de l'apoptosome puisque Hsp70 peut se fixer à la protéine Apaf-1. Mais une surexpression de Hsp70 dans des cellules n'exprimant pas de caspases prévient aussi de la mort cellulaire, suggérant que les Hsp70 peuvent également interférer avec les voies caspases indépendantes comme l'AIF. La liaison de Hsp70 à Apaf-1 ou à AIF semble se faire par le domaine de liaison à l'ATP présent sur Hsp70, sans intervention de l'activité chaperonne de Hsp70.

L'inactivation génétique d'AIF rend les cellules souches embryonnaires de souris résistantes à la mort cellulaire induite par l'absence de sérum. L'AIF est également indispensable à la première vague de mort cellulaire développementale qui conduit à la formation des corps embryonnaires chez la souris (Joza & al, 2001; Brown D, 2006). De plus l'activation de la protéine de réparation PARP-1, induite par ischémie-reperfusion, excitotoxicité et divers processus inflammatoires, provoque la libération d'AIF et tue la cellule de manière indépendante des caspases (Yu & al, 2002-2003; van Wijk & Hageman, 2005). Pour expliquer le rôle du cytochrome-c et de l'AIF dans l'apoptose, une hypothèse a été émise (Susin & al, 2000). L'AIF libéré provoque des altérations nucléaires dites de stade I, caractérisées par une condensation nucléaire et une fragmentation de grande taille tandis que les caspases activées après libération de cytochrome-c induisent la fragmentation oligonucléosomale (stade II). La contribution respective des voies dépendantes d'AIF et celles dépendantes du cytochrome-c peut alors se concevoir de manière séquentielle où les événements nucléaires de stade I pourraient être préparatoires à l'apparition des anomalies de stade II (Susin & al, 2000). Si l'implication d'AIF a été décrite suite à l'induction de l'apoptose par de nombreux stimuli (Candé & al, 2004), il n'en reste pas moins qu'AIF n'est pas toujours indispensable à la machinerie apoptotique (Joza & al, 2001). AIF peut représenter une voie de secours quand la voie « classique » dépendante des caspases effectrices est déficiente (Joseph & al, 2002, Gallego & al, 2004). AIF peut également être nécessaire dans certains modèles spécifiques de mort cellulaire. Par exemple, les souris mâles Harlequin qui portent une insertion rétrovirale dans le gène AIF situé sur le chromosome X et sont donc déficientes en AIF, sont résistantes à l'apoptose neuronale induite par ischémie ou excitotoxicité (Zhu & al, 2007).

2.2- Les voies dépendantes de molécules homologues d'AIF.

AMID (AIF-homologous Mitochondrion associated Inducer of Death), encore connue sous le nom de AIFM2 ou PRG3 (p53-responsive gene 3) est une flavoprotéine homologue d'AIF induisant la mort cellulaire apoptotique indépendante des caspases en provoquant la condensation périphérique de la chromatine (*Wu & al, 2002*). AMID est un gène cible de p53 (*Wu & al, 2004*). Elle possède une activité NAD(P)H-oxydase et catalyse la réduction NAD(P)H-dépendante du cytochrome-c et d'autres accepteurs d'électrons tel que l'oxygène moléculaire (*Marshall & al, 2005*). Bien qu'AMID possède une forte homologie de structure avec AIF, cette protéine ne possède pas de domaine MLS N-terminal et est largement distribuée dans le cytoplasme (*Ohiro & al, 2002*). Néanmoins, AMID s'incorpore dans les membranes cellulaires dont la MME (*Wu & al, 2002 ; Varecha & al, 2009*), bien que sa localisation soit encore fortement questionnée (*Varecha & al, 2009*). Tout comme pour AIF, l'apoptose induite par AMID n'est pas inhibée par le z-VAD.fmk mais ne l'est pas non plus par Bcl-2 (*Wu & al, 2002*). AMID est une protéine pouvant se lier à l'ADN et le complexe AMID-ADN entraîne un important changement conformationnel de la protéine, lequel est prévenu en présence de coenzyme nicotinamide (*Marshall & al, 2006*). Cependant, de récentes données montrent que la séquence d'homologie entre AIF et AMID est restreinte au domaine Ndh correspondant à la fonction oxydoréductase et non à la fonction apoptotique d'AIF, suggérant qu'il est fortement improbable qu'AMID fonctionne comme AIF durant l'apoptose (*Varecha & al, 2009*). Par ailleurs, il a été suggéré qu'AMID n'est pas transloqué au noyau durant l'apoptose (*Bilyy & al, 2008*). Ainsi, le mécanisme de translocation de AMID/PRG3 comme sa capacité à induire l'apoptose sont à ce jour mal compris. L'implication des homologues d'AIF dans le déroulement de l'apoptose reste cependant à confirmer.

2.3- Les voies apoptotiques impliquant d'autres protéases que les caspases.

Les cathepsines sont impliquées dans la mort cellulaire dépendante et indépendante des caspases (*Leist & al, 2001*).

Les calpaïnes (μ et m) sont des cystéine-protéases présentes sous forme inactive dans le cytosol (*Johnson & al, 2000 ; Wang & al, 2000*). La forme active de l'enzyme est composée d'une sous-unité variable de 80kDa et d'une sous-unité conservée de 30kDa. Cette activation est dépendante de l'élévation de la concentration intracellulaire en calcium (*Choi & al, 2001 ; Daniel & al, 2003*). Les calpaïnes sont régulées par la calpastatine, inhibiteur pouvant être inactivé par les calpaïnes elles-mêmes ou clivé par l'intermédiaire des caspases (*Nakagawa &*

al, 2001). Les calpaïnes sont activées par de nombreux stimuli comme les irradiations et participent à l'apoptose en amont et en aval des caspases (*Wood & Newcomb, 1998 ; Varghese & al, 2001*) ou indépendamment des caspases (*Waterhouse & al, 1998 ; Liu & al, 2009*). Comme précédemment mentionné, les calpaïnes sont capables de favoriser la maturation d'AIF en clivant sa fixation à la MMI (*Polster & al, 2005 ; Norberg & al, 2008*). Toutefois, bien que la localisation dans l'EIM de la calpaïne ait suggéré sa possible implication dans l'activation d'AIF, une récente étude propose qu'un tel rôle est insaisissable (*Joshi & al, 2009*).

La famille des cathepsines comprend des cystéine-, aspartate- et sérine-protéases (*Johnson & al, 2000 ; Turk & al, 2001 ; Stoka & al, 2005*). Les cathepsines-B, -L (cystéine-protéases) et -D (aspartate-protéases) sont les plus décrites comme liées à l'apoptose. Les cathepsines se trouvent sous forme inactive dans le compartiment endosome/lysosome. Elles s'activent par protéolyse ou auto-protéolyse. De plus, la cathepsine-D peut être activée par les médiateurs lipidiques appelés céramides (*Heinrich & al, 1999*). Les cathepsines participent à l'apoptose dépendante (*Droga-Mozavec & al, 2008*) et indépendante des caspases et elles se relocalisent des lysosomes vers le cytosol ou le noyau. (*Stoka & al, 2007 ; pour revue Turk, 2009*).

Les sérine-protéases peuvent être impliquées directement ou indirectement dans la fragmentation de l'ADN sans l'activation de caspase. Parmi les sérine-protéases, les granzymes A et B sont localisés dans les granules cytotoxiques des cellules T (*Johnson & al, 2000 ; Trapani & al, 2000*). Après activation, ces cellules libèrent les granzymes pénétrant dans les cellules cibles par endocytose ou par des pores générés par les perforines (*Johnson & al, 2000*). Le granzyme B clive ses substrats après un aspartate et ceux-ci sont capables d'activer les caspases (*Lord & al, 2003*). Le granzyme A clive ses substrats après une lysine ou une arginine et est responsable de la fragmentation simple brin de l'ADN (*Beresford & al, 2001*).

HtrA2/Omi et AP24 représentent d'autres sérine-protéases impliquées dans la mort cellulaire programmée. HtrA2/Omi est libéré de la mitochondrie vers le cytosol et peut soit induire une mort cellulaire indépendante des caspases grâce à son activité sérine-protéase, soit contribuer à l'activation des caspases en interagissant avec les XIAP (*Suzuki & al, 2001*). AP24 induit la fragmentation de l'ADN suite à l'action de différents stimuli comme les chimiothérapies ou

les UV (*Wright & al, 1998*). Les sérine-protéases sont régulées par les serpins qui inhibent leur activité (*Moffitt & al, 2007*).

En résumé, les voies indépendantes des caspases peuvent se situer :

➤ en amont de la mitochondrie : les calpaïnes, cathepsines et granzymes peuvent induire la perméabilisation de la MME (*Ferri & al, 2001*). Par exemple, les calpaïnes sont capables d'activer Bax et les granzymes B Bid. D'autre part, un certain nombre de seconds messagers cellulaires, comme les ROS, le Ca^{2+} , l'oxyde nitrique, l'acide arachidonique ou certains gangliosides peuvent également provoquer la perméabilité membranaire mitochondriale.

➤ en aval de la perméabilisation mitochondriale : l'activation d'une voie indépendante des caspases semble prépondérante dans des lignées cellulaires présentant un arrêt de l'activation des caspases. Cet arrêt peut être secondaire à une baisse du taux d'ATP, à la protéolyse Ca^{2+} -dépendante d'Apaf-1 ou à l'inactivation par les calpaïnes de la caspase-9 (*Reimertz & al, 2001*).

Bien souvent déroulé sur un mode linéaire très hiérarchisé, le processus apoptotique révèle des voies de rétrocontrôle impliquant les caspases (telles les caspases-2 et -9) activées à un stade post-mitochondrial, sur la mitochondrie (*Susin & al, 1999*). Ainsi, après la libération mitochondriale de cytochrome-c, l'activation de la caspase-3 provoque en retour des dommages fonctionnels mitochondriaux par dégradation du complexe I de la chaîne respiratoire (*Ricci & al, 2004*). Des boucles d'amplification du signal apoptotique (mitochondrie ↔ caspases) rendent à partir d'un certain seuil le processus apoptotique irréversible, avec l'engagement de la cellule dans la phase de dégradation (*Marchetti, 2005*). Par ailleurs, les deux voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque communiquent, convergeant au final à la mitochondrie où s'en suit l'activation des caspases effectrices (caspases-3, -6, -7) qui sont les principales protéases impliquées dans la dégradation de la cellule. Leur activité reste sous contrôle des IAPs elles-mêmes inhibées par Smac/Diablo et Omi/HtrA2. Ces protéines sont libérées hors de l'EIM durant la perméabilisation de la MME, de manière à neutraliser le signal d'inhibition et rehausser le signal apoptotique. Le dialogue entre ces deux chemins est important et plusieurs signaux d'activation différents peuvent converger pour propulser la cellule au niveau du seuil apoptotique au-delà duquel la mort cellulaire par apoptose devient inévitable. La communication entre les voies extrinsèque et intrinsèque, les voies indépendantes des caspases, les boucles d'auto-amplification

rétroactives des caspases effectrices vers la mitochondrie dépendent de la mise en place orchestrée du puzzle apoptotique et témoignent de l'extrême complexité du processus apoptotique (résumé de la complexité des voies apoptotiques à la figure 8).

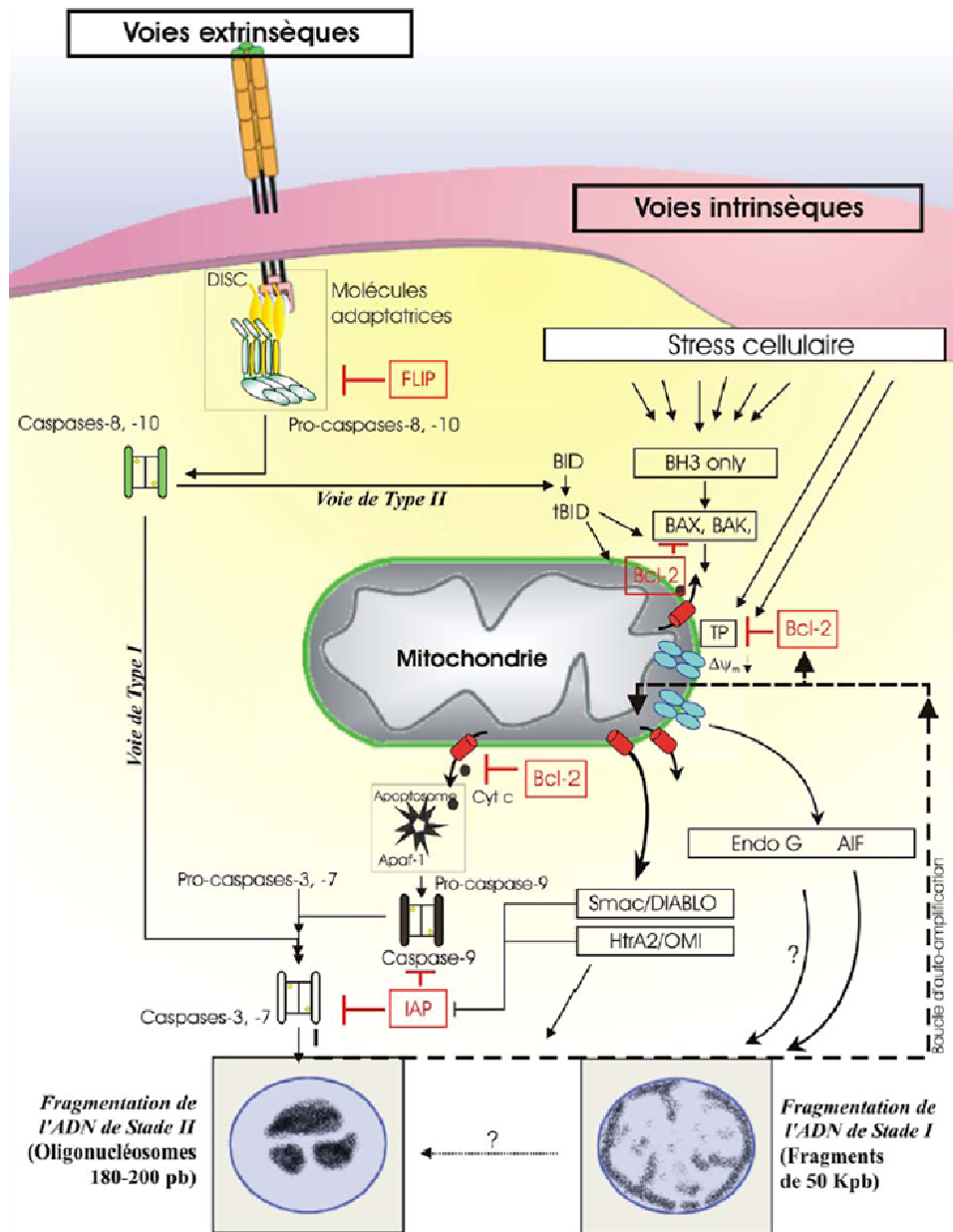


Figure 8 : La complexité du processus apoptotique (Marchetti, 2005). Voir texte pour détails.

Partie II : Les chimiothérapies conventionnelles induisent l'apoptose des cellules tumorales.

La panoplie des médicaments actuellement utilisés en thérapie antitumorale se compose encore majoritairement de molécules « anciennes » (dites classiques ou conventionnelles) cytotoxiques mais peu sélectives vis-à-vis des cellules tumorales. Malgré de bonnes connaissances moléculaires concernant les cibles cellulaires des chimiothérapies anciennes, principalement de localisation nucléaire, les mécanismes responsables de leur cytotoxicité sont restés méconnus. En effet, ces drogues ont longtemps été reconnues pour leur effet antiprolifératif (bloquant la division cellulaire) sans que l'on se préoccupe du sort létal de la cellule. De manière réductrice, il a pu être postulé que les dommages créés par la drogue sur sa cible cellulaire étaient suffisants pour annihiler la multiplication de la cellule qui ensuite, passivement, disparaissait. Aujourd'hui, de nombreux arguments indiquent que les mécanismes responsables de la cytotoxicité chimio-induite sont plus complexes et impliquent une participation ACTIVE de la cellule à sa propre mort. En effet, dans la plupart des cas, les agents chimiothérapeutiques génèrent, en plusieurs étapes, des signaux complexes au sein de la cellule aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. De très nombreuses études ont démontré l'induction de l'apoptose par des agents de chimiothérapie sur des lignées tumorales en culture (pour revue *Kaufmann & Earnshaw, 2000*). Par ailleurs, des changements apoptotiques ont été décrits sur des tumeurs solides xénotreffées, après traitements des souris par différents agents anticancéreux (*Mesner & al, 1997*). Les mises en évidence de l'apoptose ont également été observées chez l'homme où des modifications apoptotiques sont présentes dans les cellules leucémiques provenant du sang périphérique ou de la moelle osseuse de patients traités par des inhibiteurs de topoisomérases, des antimétabolites ou des poisons du fuseau (*Li & al, 1994 ; Gorczyca & al, 1993 ; Halicka & al, 1997*).

I- Les effets pro-apoptotiques des chimiothérapies conventionnelles : un mécanisme en plusieurs étapes.

La plupart des traitements anticancéreux conventionnels ne provoquent pas directement l'apoptose des cellules tumorales, mais ceux-ci agissent au niveau de leur cible

puis activent de multiples voies biochimiques qui elles-mêmes peuvent converger pour provoquer la mort cellulaire par apoptose (Decaudin & al, 1998). Il est intrigant de constater que les cassures de l'ADN induites par des agents inhibiteurs de topoisomérases sont maximales en moins de 30 minutes après l'exposition, alors que la mort cellulaire ne survient qu'après quelques heures ou quelques jours. Ce laps de temps est probablement le délai nécessaire à la mise en service des voies et relais moléculaires successifs qui conduisent à l'apoptose. De manière schématique, on peut décomposer les effets cellulaires des chimiothérapies en plusieurs étapes (figure 9) : 1) les chimiothérapies endommagent leurs cibles cellulaires, majoritairement de localisation nucléaire ; puis 2) les dommages cellulaires primitifs sont détectés par la cellule activant ainsi une réponse cellulaire. Si dans la plupart des cas cette réponse cellulaire conduit à l'apoptose, d'autres issues sont possibles : la cellule peut réparer les dommages, la cellule peut rentrer en sénescence ou mourir selon des modalités différentes de l'apoptose (catastrophe mitotique, nécrose, ou autophagie). Le type de réponse est conditionné par l'amplitude des dommages subis. Si les dommages sont de faible intensité, les cellules vont mettre en marche une machinerie moléculaire afin de réparer les lésions survenues sur l'ADN, nécessitant un arrêt transitoire de la progression du cycle cellulaire afin de prévenir la réplication d'un ADN endommagé. Par contre, si les dégâts sont trop importants pour être réparés, les cellules endommagées vont se suicider *via* un processus apoptotique ou mourir selon d'autres modalités.

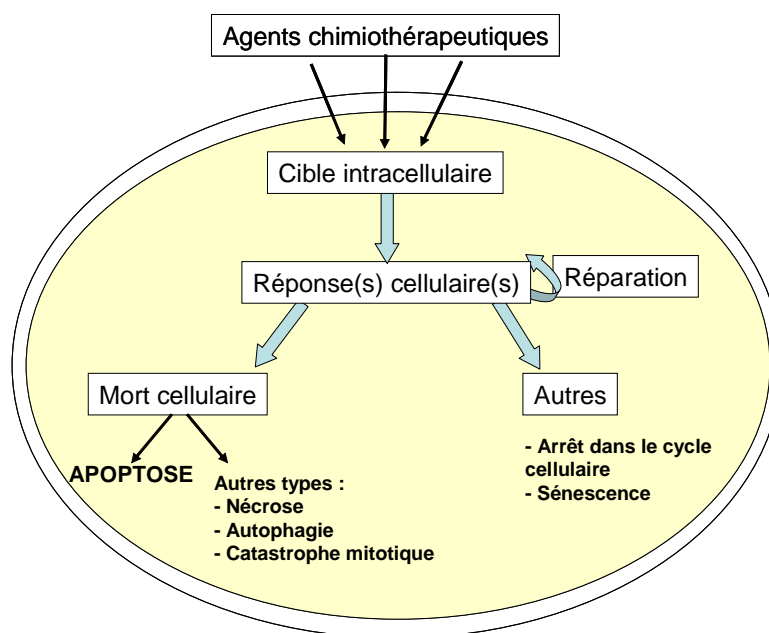


Figure 9 : Effets cellulaires des agents anticancéreux.

1.1- 1^{ère} étape : les chimiothérapies conventionnelles endommagent les cibles intracellulaires.

Les traitements anticancéreux conventionnels sont constitués de nombreuses molécules appartenant à 4 grandes familles :

- les médicaments empêchant / modifiant la biosynthèse de l'ADN nucléaire (antimétabolites, inhibiteurs enzymatiques),
- les médicaments altérant la structure de l'ADN (intercalants, alkylants),
- les médicaments inhibiteurs de topoisomérases nucléaires,
- les médicaments altérant la dynamique microtubulaire de la cellule.

Ainsi, la cible moléculaire la mieux connue des agents anticancéreux classiques est l'ADN nucléaire et les protéines nucléaires associées. Par exemple, les inhibiteurs de topoisomérases sont « des poisons » qui stabilisent les topoisomérases sur l'ADN formant un complexe dit « ternaire » ADN/Drug/Topoisomérase. Dans cette configuration particulière, l'ADN a déjà été clivé sur un ou deux brins par l'enzyme. Les machineries de réplication ou de transcription qui parcourent l'ADN finissent par entrer en collision avec les complexes ADN/Topo induisant alors des coupures doubles brins irréversibles (*Burden & al, 1998 ; Pommier & al, 1999*). Beaucoup d'inhibiteurs de la topoisomérase II sont aussi des agents intercalants, capables de s'insérer entre deux plateaux des bases de l'ADN. C'est le cas de la doxorubicine, la daunorubicine, le mitoxantrone. Cette propriété supplémentaire provoque des modifications de la courbure naturelle de l'ADN et interfère avec la réplication ou la transcription. Les agents alkylants possèdent un groupement chimique capable de former des liaisons covalentes avec les acides nucléiques de la cellule, au niveau du petit ou du grand sillon, ainsi qu'à l'extérieur de la double hélice. La plupart des alkylants utilisés en thérapeutique sont bi-fonctionnels, c'est-à-dire pouvant se lier à deux nucléotides adjacents. Ils forment alors des ponts intra- ou inter-brins rendant impossible la transcription ou la réplication de l'ADN. Ainsi les drogues qui ciblent le noyau sont appelées génotoxiques. Elles endommagent l'ADN nucléaire et interfèrent avec les fonctions cellulaires vitales (mitose, synthèse de l'ADN ou mécanismes de réparation de l'ADN) bloquant la prolifération cellulaire. Consécutivement, elles sont aussi capables d'activer des réponses cellulaires telles que la mort cellulaire par apoptose. Les principaux agents anticancéreux classiques, les dommages qu'ils engendrent sur leurs cibles et la réponse cellulaire activée sont résumés dans les tableaux suivants (Tableaux III).

Il est à noter que les agents génotoxiques non seulement ciblent et endommagent le noyau, mais ils peuvent également provoquer des lésions d'autres composants cellulaires extra-nucléaires (*Roos & al, 2006*). Par exemple, les ultraviolets comme les agents alkylants peuvent activer le récepteur à l'EGF, ce qui provoque des réponses cellulaires quasi-immédiates indépendantes des dommages nucléaires, notamment l'activation de la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinases) (*Tenzer & al, 2002*).

Tableau III : Principaux agents anticancéreux classiques, les dommages sur leur(s) cible(s) et la réponse cellulaire activée.

Agents anticancéreux	Cible	Dommages sur la cible	Réponse(s) cellulaire(s)
<p><u>Les antimétabolites</u></p> <p>-Antifolates : <i>Méthotrexate, Trimetrexate, Raltitrexed, Pemetrexed.</i> -Antipurines : <i>6-mercaptopurine, 6-thioguanine, Pentostatine, Cladribine, Fludarabine.</i> -Antipyrimidines : <i>5-Fluorouracile, Capécitabine, Ftorafur</i> -Autres : <i>Cytarabine, Gemcitabine, Hydroxyurée, Mitoguazone.</i></p>	ADN nucléaire	Incorporation dans la double hélice d'ADN à la place des bases puriques et pyrimidiques.	<p>- Inhibition de la voie de synthèse <i>de novo</i> des bases à l'origine des nucléotides et des acides nucléiques.</p> <p>-Activité cytotoxique exercée au cours de la phase S du cycle cellulaire.</p>
<p><u>Les agents alkylants</u></p> <p>-Moutardes azotées : <i>Chlorambucil, Estramustine, Melphalan, Cyclophosphamide, Isofosfamide.</i> -Méthane-sulfonates : <i>Busulfan</i> -Éthylène-imines : <i>Triéthylène thiophosphoramide, Héxaméthylmélamine</i> -Nitrosourées : <i>Carmustine (BCNU), Fotémustine, Streptozocine.</i> -Sels de platine : <i>Cisplatine, Carboplatine, Oxaliplatine, Satraplatine.</i> -Imidazotétrazinones : <i>Dacarbazine, Témzolomide.</i> -Mitomycine-C -Procarbazine</p>	ADN nucléaire	Formation de liaisons irréversibles avec les bases de l'ADN ou des adduits covalents.	<p>- Action pendant la division cellulaire, quelque soit la phase du cycle cellulaire.</p> <p>- Inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN.</p> <p>- En absence de mécanismes de réparation efficaces, induction de la mort cellulaire par apoptose.</p> <p>- Production de ROS.</p>
<p><u>Les intercalants :</u></p> <p>-Anthracyclines : <i>Doxorubicine, 4'-épirubicine, Daunorubicine, Zorubicine, Idarubicine</i> -Anthracènediones : <i>Mitoxantrone, Bisantène</i> -Amsacrine, Actinomycine-D, Acétate d'ellipticinium, Mithramycine</p>	ADN nucléaire	Intercalation entre les bases adjacentes à l'origine de la distorsion de la double hélice d'ADN du fait d'un encombrement stérique.	<p>- Inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN.</p> <p>- Production de ROS à l'origine de la cardiotoxicité des Anthracyclines.</p>

<p><u>Agents coupant l'ADN :</u></p> <p>Bléomycine</p>	<p>ADN nucléaire</p>	<p>Fixation un niveau du petit sillon (résidus de guanine) à l'origine de cassures mono- et bi-caténares.</p>	<p>- Inhibition de la synthèse d'ADN et de sa transcription. - Blocage des cellules en phase G2 du cycle cellulaire. - Production de ROS contribuant à sa toxicité pulmonaire</p>
<p><u>Inhibiteurs des topoisomérases nucléaires</u></p> <p>- <u>Topoisomérase I :</u> Les Camptothécines : <i>Camptothécine, Topotécan, Irinotécan, Silatécan, Gimatécan, Homo-camptothécines</i></p> <p>La Rébécamycine</p> <hr/> <p>- <u>Topoisomérase II :</u> Les Anthracyclines : <i>Doxorubicine, 4'-épirubicine, Daunorubicine, Zorubicine, Idarubicine</i></p> <p>Les Epipodophyllotoxines : <i>Etoposide, Téniposide</i></p>	<p>Topoisomérase-I nucléaire</p> <hr/> <p>Topoisomérase-II nucléaire</p>	<p>Liaison à l'interface des complexes ADN-topoisomérase I</p> <hr/> <p>Liaison à l'interface des complexes ADN-topoisomérase II</p>	<p>-Blocage des complexes de clivage.</p> <p>-Génération de cassures simples brins de (Topo I) ou doubles brins (Topo II) de l'ADN initiant un arrêt du cycle cellulaire suivi de la réparation de l'ADN et/ou de l'apoptose.</p> <p>Les épipodophyllotoxines</p> <p>- Blocage des topoisomérases en empêchant l'entrée en prophase, - Génération de cassures de l'ADN. - Blocage des cellules en phase S tardive ou G2 précoce du cycle cellulaire. - Production de ROS contribuant en leur cytotoxicité.</p>
<p><u>Poisons du fuseau mitotique :</u></p> <hr/> <p>Alcaloïdes du Vinca : <i>Vinblastine, Vindésine, Vincristine, Vinorelbine, Vinflunine</i></p> <p>Halichondrine-B</p> <hr/> <p>Taxanes : <i>Paclitaxel, Docétaxel</i></p> <p>Epothilones : <i>Ixabépilone, Patupilone</i></p>	<p>Microtubules</p>	<p>Prévention de la dynamique microtubulaire.</p> <hr/> <p>Inhibiteurs de la polymérisation</p> <hr/> <p>Inhibiteurs de la dépolymérisation et stabilisation des microtubules</p>	<p>Perturbations des réseaux mitotiques et interphasiques</p> <hr/> <p>- Blocage en mitose et induction de l'apoptose. - Résistance croisée avec les Anthracyclines et les Epipodophyllotoxines.</p> <hr/> <p>Blocage des cellules en phase G2/M et induction de l'apoptose</p>

1.2- 2^{ème} étape : les dommages de l'ADN sont détectés par la cellule.

Les agents génotoxiques provoquent des dommages de l'ADN nucléaire qui, après détection, génèrent des signaux de stress activant un programme de mort cellulaire par apoptose. Les protéines qui détectent et/ou réparent l'ADN lésé sont souvent celles qui sont à l'origine du stimulus apoptotique. Dans la majorité des cas, suite aux dommages de l'ADN, plusieurs sérine/thréonine-kinases sont activées. Elles appartiennent aux kinases de la famille PIKK ou phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases (Hurley & Bunz, 2007 ; Liang & al, 2009). C'est par exemple le cas de :

- *La protéine ATM* (Ataxia telangiectasia mutated). Cette protéine a été découverte suite aux études génétiques provenant de patients atteints d'ataxie-telangiectasie qui n'expriment pas la protéine ATM. Les cellules ATM^{-/-} présentent une hypersensibilité à l'irradiation γ , une instabilité chromosomique et des déficiences dans le contrôle du cycle cellulaire au cours des transitions G1/S, G2/M et de la phase S (Barlow & al, 1996). La fixation d'ATM sur l'ADN induit son activité kinase (Banin & al, 1998). Dès l'apparition des cassures doubles brins de l'ADN (DSB), la protéine ATM est activée et phosphoryle divers substrats parmi lesquels la protéine adaptatrice la nitrine ou NBS1, des régulateurs du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN, tels que p53, Mdm2, Chk1, Chk2, H2AX, Brca1, c-Abl (Matsuoka & al, 2007).

- *La protéine ATR* (ATM-Rad3-related). Il s'agit d'une protéine homologue de la kinase ATM, qui est activée précocement en réponse à des coupures de l'ADN, en particulier les cassures simples brins. ATM et ATR répondent à des stimuli très différents. Ces kinases sont considérées comme des composantes proximales, structurellement proches, mais non impliquées dans les mêmes voies de réparation. Cependant de récentes données montrent que ATR répond aux cassures doubles brins et que cette réponse dépend d'ATM (Jazayeri & al, 2006 ; Myers & al, 2006). En effet, ATM peut recruter ATR aux sites de coupures doubles brins. Elle peut également causer indirectement l'activation d'ATR. Les voies ATM et ATR peuvent agir de concert pour activer les kinases en aval telles que Chk1 (Stiff & al, 2006 ; Hurley & Bunz, 2007). ATR et ATM sont impliquées dans la détection et la réparation des dommages de l'ADN, dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire et dans la signalisation de l'apoptose *via* p53. Bien que répondant à des stimuli différents et activant des voies de signalisation distinctes, ATM et ATR partagent de nombreux substrats en commun parmi lesquels les suppresseurs de tumeur p53 et BRCA1, l'histone H2AX, la kinase Chk1.

- *La protéine BRCA1*. BRCA1, connue comme suppresseur de tumeur dans les cancers du sein, est phosphorylée suite aux cassures de l'ADN (Cortez & al, 1999). Sous sa forme phosphorylée, elle recrute des protéines impliquées dans la réparation, la recombinaison homologue et dans l'arrêt du cycle cellulaire (Yun & Hiom, 2009 ; Yamane & al, 2007 ; Ouchi, 2006).

- *L'histone H2AX*. Certainement la mieux connue des modifications des histones associées à la réponse aux dommages de l'ADN, la phosphorylation de H2AX sur un résidu de sérine (ser139 chez l'homme) (Rogakou & al, 1998) est un marqueur des cassures doubles brins de l'ADN (Banath & al, 2003 ; Zhou & al, 2006). Dans les quelques minutes qui suivent l'induction des DSB de l'ADN, elle est phosphorylée par les kinases ATM, ATR et DNA-PK (Stiff & al, 2004) et H2AX γ (état phosphorylé) apparaît sous forme de foci nucléaires en chaque site de coupure de l'ADN (Unal & al, 2004). La phosphorylation de l'histone H2AX est au cœur de nombreuses voies de signalisation contribuant à la réponse aux dommages à l'ADN induits directement ou indirectement par les agents anticancéreux conventionnels (camptothécine, étoposide, doxorubicine, cisplatine, radiations ionisantes, etc.), par les ROS, ou suite à la mutation des protéines de la machinerie de réparation (pour revue Bonner & al, 2008).

- *La DNA-PK* (DNA-dependent protein kinase). Cette sérine/thréonine-kinase est un complexe protéique constitué d'une sous-unité catalytique à activité kinase DNA-PK appartenant à la famille des PIKK, et d'une sous-unité régulatrice composée de l'hétérodimère Ku70/Ku80. Le complexe Ku70/Ku80 agit comme un détecteur de dommages qui se lie aux extrémités libres de l'ADN aux sites de cassures, puis recrute, active et stabilise la fixation de la DNA-PK à l'ADN (Durocher & Jackson, 2001 ; Chan & al, 2002). Bien que son activation nécessite son association à Ku lié à l'ADN, la DNA-PK peut aussi se lier et être directement activée par les extrémités libres de l'ADN en l'absence de Ku (Hammarsten & al, 2000). La DNA-PK est un «détecteur» moléculaire des dommages de l'ADN qui potentialise le signal via la phosphorylation de nombreuses cibles en aval. Elle est spécifiquement recrutée lors du processus de réparation NHEJ (non-homologous end joining), voie prédominante de réparation des DSB de l'ADN. Du fait de son interaction avec des protéines du processus NHEJ et celles des processus non-NHEJ, elle pourrait aider au positionnement des protéines de réparation de l'ADN sur le site endommagé. La manière dont la DNA-PK contribue à la transduction du signal en réponse aux dommages de l'ADN n'est pas totalement élucidée

mais impliquerait son autophosphorylation et la phosphorylation de nombreux substrats comme p53, l'histone H2AX, Ku70 et Ku80, c-Abl, Hsp90, la caspase-3, c-Abl (*Collis & al, 2005*). Par ailleurs, Ku peut agir individuellement en séquestrant Bax et en empêchant sa translocation à la mitochondrie prévenant ainsi son action pro-apoptotique (*Sawada & al, 2003*). Le mécanisme moléculaire sous-jacent l'inhibition de Bax dépendante de Ku n'est pas clairement défini mais ce facteur régulerait l'apoptose en ciblant la déubiquitylation de Bax (*Amsel & al, 2008*).

1.3- 3^{ème} étape : la réponse cellulaire apoptotique.

Après détection des dommages de l'ADN, plusieurs voies de signalisation vont s'enclencher pour activer l'apoptose. L'entrée dans le processus apoptotique suite aux dommages nucléaires induits par les chimiothérapies conventionnelles peut se faire à deux niveaux : soit à travers l'activation des récepteurs de mort et de leurs ligands (activation de la voie apoptotique extrinsèque), soit par activation des mitochondries (activation de la voie apoptotique intrinsèque).

1.3.1- Activation de l'apoptose à travers les récepteurs de mort.

En général, l'induction de l'apoptose à travers l'activation des récepteurs de mort implique une voie transcriptionnelle dépendante de p53. La protéine p53, célèbre suppresseur de tumeur, est très rapidement phosphorylée et stabilisée par les kinases ATM, ATR et DNA-PK, en réponse aux altérations de l'ADN induites par les génotoxiques (*Voudsen & Lu, 2002*). P53 peut aussi être phosphorylée par Chk2 (*Lanvin & Gueven, 2006*). Cette stabilité est également due à la diminution de l'interaction de p53 avec Mdm2. Cette ubiquitine ligase cible p53 en vue de sa dégradation par le protéasome, exerce une boucle de rétrocontrôle négatif (*Marston & al, 1995*), et peut bloquer la transcription p53-dépendante d'autres gènes cibles. Plusieurs autres stimuli comme l'activation d'oncogènes, l'hypoxie, la déplétion en facteurs de croissance ou les chocs thermiques, entraînent l'activation de p53 en augmentant le taux de transcription du messager ou en augmentant la durée de sa demi-vie (*Mosner & al, 1995*).

P53 va répondre aux dommages de l'ADN par deux mécanismes indépendants. Le premier vise à arrêter la progression du cycle cellulaire et par conséquent la réplication de l'ADN, afin de permettre aux systèmes de réparation d'accéder et de réparer l'ADN. Le gène cible le mieux connu de p53 est p21^{waf/cip1}, un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (Cdk). Lorsque ces systèmes s'avèrent dépassés, p53 *via* un second mécanisme peut induire

l'apoptose. Ces mécanismes sont alors régis par l'activation ou la répression de la transcription de nombreux gènes régulateurs de l'apoptose y compris les récepteurs Fas et DR5 (Tableau IV). P53 peut ainsi activer cette voie apoptotique extrinsèque *via* l'activation transcriptionnelle de Fas/CD95 (Li & al, 2003), et ce notamment en conditions hypoxiques (Liu & al, 2007). Par exemple, le rétinoïde de synthèse CD437 induit l'apoptose des cellules NSCLC H460 *via* l'augmentation du taux d'expression de l'ARNm de Fas par un mécanisme dépendant de p53 (Sun & al, 2000). Cette activation/répression est assurée par une interaction directe de p53 avec des éléments de réponse spécifiques d'une séquence d'ADN, localisés dans des régions régulatrices des promoteurs de ces gènes cibles.

Le rôle de p53 dans la transactivation et la transrépression des gènes est bien établi, et par conséquent les mécanismes par lesquels p53 régule l'expression génique ont été détaillés en analysant l'effet de diverses mutations sur l'action de p53. Par exemple, le domaine de transactivation dans l'extrémité N-terminale de p53 comprenant les résidus Leu22/Trp23 (humain) ou Leu25/Trp26 (souris) est indispensable à l'activité transcriptionnelle de p53 (Lin & al, 1994). Ainsi, quand les résidus Leu22/Trp23 ou Leu25/Trp26 sont remplacés par Gln22/Ser23 ou Gln25/Ser26, les mutants obtenus perdent complètement leur capacité à activer ou réprimer l'expression des gènes cibles de p53 (Chao & al, 2000). De même, les thymocytes et fibroblastes embryonnaires dérivés de souris p53 KO (Gln25/Ser26) sont résistants aux dommages de l'ADN induits en dépit du fait que ce mutant de p53 maintienne sa capacité à se lier à l'ADN (Chao & al, 2000). Ceci suggère que le rôle de p53 en tant que facteur de transcription est essentiel dans l'induction de l'apoptose et l'inhibition du développement de tumeurs.

1.3.2- Activation de la voie intrinsèque de l'apoptose : la communication noyau - mitochondrie.

Plusieurs modalités ont été décrites :

a- Activation d'une voie dépendante de p53.

En réponse aux dommages de l'ADN induits par les génotoxiques, le processus apoptotique dépendant de p53 est déclenché et classiquement les cellules s'engagent dans la voie intrinsèque mitochondriale de ce programme (Chipuk & Green, 2006). Dans ce cas, p53 active transcriptionnellement plusieurs gènes cruciaux pour l'exécution de la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose. En particulier p53 peut naturellement augmenter l'expression de

gènes pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui agissent au niveau mitochondrial pour induire l'apoptose (Voulsen & Lu, 2002) (Tableau IV). Par exemple, Bax, Puma, Noxa et p53AIP1 se relocalisent aux mitochondries et favorisent la chute du potentiel de membrane mitochondriale et la libération du cytochrome-c (Oda & al, 2000 ; Nakano & Voulsen, 2001 ; Matsuda & al, 2002). La transactivation de Puma et Noxa par p53 est fondamentale pour le processus apoptotique comme le démontre l'absence de réponse apoptotique induite par les radiations sur des fibroblastes de souris embryonnaires déficientes en ces gènes (Jeffers & al, 2003 ; Shibue & al, 2006 ; Villunger & al, 2003). En outre, d'autres voies dépendantes de l'activité de p53 vont influencer la perméabilité membranaire mitochondriale : p53 est aussi capable de réprimer l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Les ROS produits par les PIGs (p53 Inducible Genes) causent des dommages aux mitochondries et initient l'apoptose (Polyak & al, 1997). De plus, p53 peut également induire l'apoptose par l'intermédiaire d'un mécanisme dépendant du réticulum endoplasmique (RE) impliquant la surexpression de la Scotine, une protéine située dans le RE et à la membrane nucléaire (Bourdon & al, 2002). En outre, l'expression du gène AIF est soumise à une régulation transcriptionnelle positive par p53 (Stambolsky & al, 2006). Cette activation dépend non pas de la surexpression de p53 mais du taux basal d'expression de la protéine. De plus, cette voie apoptotique caspase-indépendante serait compromise dans les lignées cellulaires n'exprimant pas p53 (Stambolsky & al, 2006). Néanmoins, en l'absence de stimulus apoptotique, l'induction d'AIF dépendante de p53 permet le maintien de ses fonctions mitochondriales.

Ainsi, de nombreuses lignées cellulaires tumorales sont plus sensibles à l'apoptose induite par les traitements génotoxiques si elles expriment la protéine p53 wild-type. Par exemple, les cellules de glioblastomes présentent une meilleure réponse au traitement par le témozolomide (agent méthylant l'ADN) lorsque p53 n'est pas muté (Roos & al, 2007). Toutefois, des cellules p53-mutées ne perdent pas leur capacité à subir un processus apoptotique complet. Certains dommages à l'ADN (tels les O⁶MeG) peuvent en effet activer l'apoptose indépendamment de p53 grâce à des systèmes backup. L'apoptose dépendante de p53 peut donc avoir lieu indépendamment de son activité transcriptionnelle et de la synthèse de nouvelles protéines (Caelles & al, 1994 ; pour revue, Moll & al, 2005).

Tableau IV : Principaux gènes activés ou réprimés suite à l'activation de p53.

Gène	Activation (+) Répression (-)	Fonction
Pro-apoptotique		
Bax	+	Protéine de la famille Bcl-2 sous-type Bax
Noxa	+	Protéine de la famille Bcl-2 BH3-only
Puma	+	Protéine de la famille Bcl-2 BH3-only
Bid	+	Protéine de la famille Bcl-2 BH3-only
Fas	+	Ligand des récepteurs de mort
DR5	+	Ligand des récepteurs de mort
Apaf-1	+	Formation de l'apoptosome
Anti-apoptotique		
Survivine	-	Famille des IAPs, inhibition des caspases
Bcl-2	-	Protéine de la famille Bcl-2 sous-type Bcl-2
Autres		
p21 ^{cip1}	+	Arrêt du cycle cellulaire
Gadd45	+	Arrêt du cycle cellulaire
Mdm2	+	Blocage de l'activité transcriptionnelle de p53
Cycline G	+	Blocage de l'activité transcriptionnelle de p53 en agissant sur Mdm2
p85	+	Sous-unité régulatrice des PI(3)kinases
PTEN	+	Phosphatase prévenant l'activation de PI(3)K
PIG3	+	Régulation rédox
NFκB	+	Facteurs de transcription.

Depuis quelques années, il apparaît clairement que des mécanismes indépendants de l'activité transcriptionnelle de p53 fonctionnent également pour induire l'apoptose dans la cellule, sur la base des arguments suivants : 1) l'apoptose induite par p53 peut exister même en présence d'inhibiteurs de la transcription (*Caelles & al, 1994*). 2) Une protéine p53 mutée incapable de se relocaliser au noyau ou ayant une activité de transactivation altérée, est encore capable d'induire l'apoptose (*Marchenko & al, 2000 ; Moll & Zaika, 2001*). 3) Une forme mutée de p53 ciblant la mitochondrie présente la même efficacité à induire l'apoptose que la forme sauvage de p53, et provoque l'oligomérisation de Bak et la libération du cytochrome-c suite à l'atténuation des effets de Bcl-2 et/ou de Bcl-x_L (*Mihara & al, 2003*).

Quand p53 s'accumule dans le cytosol, il peut fonctionner de façon analogue au sous-ensemble de protéines BH3-only de la famille Bcl-2, c'est-à-dire activer Bax et déclencher le processus apoptotique. L'actinomycine-D, un inhibiteur de transcription, non seulement augmente le taux d'expression de p53 mais potentialise également l'apoptose induite par p53, impliquant que l'activité transcriptionnelle de p53 peut être découplée de sa fonction apoptotique (*Caelles & al, 1994*).

Plusieurs études démontrent qu'en réponse à un stress génotoxiques (dommages de l'ADN chimio-induits, hypoxie, activation d'oncogènes), p53 est rapidement transloqué à la

mitochondrie (Marchenko & al, 2000 ; Mihara & al, 2003 ; Sansome & al, 2001, Nemajerova & al, 2005). Cette translocation mitochondriale précède la perte du $\Delta\Psi_m$ et l'activation des caspases, suggérant que p53 peut déclencher des mécanismes à la mitochondrie qui au stade ultime induisent l'apoptose (Marchenko & al, 2000). P53 peut donc interagir directement au niveau de la membrane mitochondriale avec les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-x_L, et Mcl-1, via l'interaction avec son domaine de liaison à l'ADN (Moll & Zaika, 2001 ; Sansome & al, 2001 ; Mihara & al, 2003 ; Wolff & al, 2008). La liaison de ces facteurs anti-apoptotiques à p53 compromet leur capacité à stabiliser la membrane mitochondriale, ce qui conduit à des changements de perméabilité de la membrane mitochondriale et à la libération du cytochrome-c. P53 peut aussi activer Bak et induire directement le relargage de cytochrome-c hors de la mitochondrie. Des expériences d'immuno-précipitation indiquent que les complexes p53-Bak résultent d'une diminution de l'association entre Bak et Mcl-1 (Leu & al, 2004). Par ailleurs, il a été démontré que, dans des organes sensibles à l'irradiation, deux vagues d'activation de la mort cellulaire pouvaient se produire : une première vague rapide est initiée par la translocation à la mitochondrie de p53, résultant en la formation de l'apoptosome et consécutivement l'activation de la caspase-3. Cette vague initiale est suivie d'un processus de mort cellulaire plus lent, dépendant de l'activité transcriptionnelle de p53 (Erster & al, 2004 ; Chipuk & Green, 2006). L'activité pro-apoptotique de p53 et la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale sont reliées, et deux mécanismes indépendants mais convergents ont été décrits, par lesquels p53 induit directement la perméabilisation de la MME et consécutivement la libération du cytochrome-c et l'activation des caspases effectrices (figure 10).

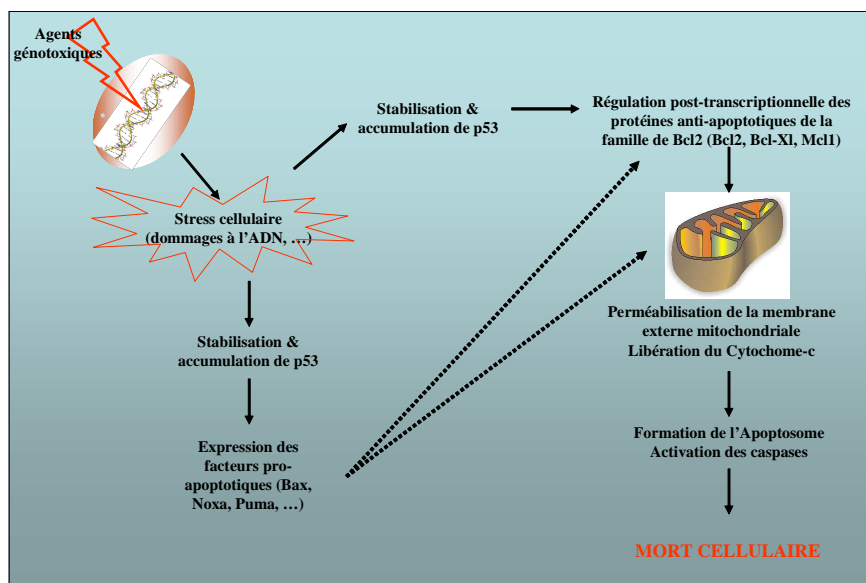


Figure 10 : Place de p53 dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.

L'ensemble de ces observations suggère que l'action de p53 comme facteur de transcription n'est pas une condition *sine qua non* pour induire la mort.

Quoiqu'il en soit, la signalisation *via* p53 implique des relais moléculaires complexes capables de relier les altérations nucléaires chimio-induites et l'engagement du processus apoptotique principalement au niveau de la mitochondrie. Ainsi, p53 arbitre les réponses cellulaires consécutives aux dommages de l'ADN induits par les agents génotoxiques et conditionne le destin de la cellule : l'arrêt dans le cycle cellulaire ou l'apoptose. La figure 11 résume la place de p53 dans la prise de décision quant au devenir de la cellule.

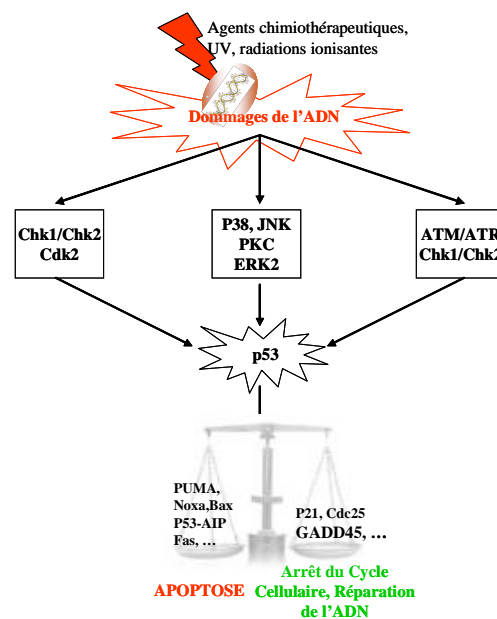


Figure 11: Place centrale de p53 dans la prise de décision du destin de la cellule.

b) Les homologues de p53.

La famille p53 se compose de p53 et de ses homologues plus récemment découverts p63 et p73, ayant 60% d'homologie dans la séquence en acides aminés du domaine de liaison à l'ADN. Tous sont des inducteurs d'apoptose. Bien que les membres de la famille p53 aient une structure conservée, il existe néanmoins des différences entre ces protéines. Contrairement au nombre élevé de mutations de p53 dans les cancers humains, p63 et p73 sont rarement mutés (*Melino & al, 2003 ; Deyoung & al, 2007*). Des mutations de p73 ne prédisposent pas à la formation tumorale mais influencent la réponse aux dommages de l'ADN. En effet, en réponse aux dommages à l'ADN générés par l'étoposide ou la camptothécine, les kinases ATM et/ou ATR activent Chk1 et Chk2 qui en retour, activent

E2F1. Ce facteur de transcription E2F1 stimule la transcription de p73 (*Urist & al, 2004*). De plus, dans les cellules où p73 et p63 sont exprimés sous plusieurs isoformes, certaines sont pro-apoptotiques, par exemple le TA-p73 ou le TA-p63, et d'autres sont anti-apoptotiques, comme le Δ Np73 (*Melino & al, 2003-2004*).

P73 est activé en réponse à une grande variété d'agents génotoxiques, dont les agents endommageant l'ADN et les oncogènes E1A et myc (*Zaika & al, 2001*). Plusieurs drogues, comme le taxol, la gemcitabine, l'étoposide, le melphalan, ou la camptothécine, ont été décrites comme augmentant le niveau de transcription du gène de p73, montrant ainsi l'importance de cette protéine dans l'apoptose chimio-induite (*Kaika & al, 2001 ; Melino & al, 2003*). Une fois activée, p73, comme p53, peut réguler l'induction de l'apoptose et l'arrêt dans le cycle cellulaire. L'apoptose dépendante de p73 semble être en premier lieu régulée par sa capacité à activer la transcription de plusieurs gènes cibles dont les promoteurs sont également ciblés par p53, comme Bax, Puma, Noxa, Bad et Bik, l'oxydoréductase PIG3, les récepteurs de mort CD95, TNFR1, TRAIL-R1 et TRAIL-R2, la protéine mitochondriale p53AIP1 et les caspases-3, -6, et -8 (*Melino & al, 2002 ; Muller & al, 2005*). Les cellules surexprimant p73 γ montrent une augmentation de Puma, ce qui a pour conséquence l'activation et la translocation mitochondriale de Bax suivies de la libération du cytochrome-c (*Melino & al, 2004*). Par ailleurs, p73 peut activer Noxa, gène cible de p53 impliqué dans la dysfonction mitochondriale, et Bax (*Flinterman & al, 2005*). Ceci peut expliquer pourquoi les cellules tumorales sont vulnérables aux agents anticancéreux génotoxiques même en l'absence de p53 fonctionnel. Toutefois, l'évidence d'un rôle indépendant de la transcription de p73 dans l'induction de l'apoptose est controversée. Une étude démontre le clivage de p73 par les caspases-3 et -8 en réponse aux agents endommageant l'ADN et à TRAIL, accompagné de la translocation à la mitochondrie des formes entière et clivée de p73. Un mutant p73 déficient pour la transactivation augmente l'apoptose induite par TRAIL et l'ajout de p73 recombinant sur des mitochondries isolées entraîne la libération de cytochrome-c (*Sayan & al, 2008*). Ces découvertes contrastent avec les publications antérieures démontrant que, bien que p73 induise la translocation de Bax du cytosol à la mitochondrie, p73 en lui-même ne se localise pas à la mitochondrie et la translocation de Bax n'est pas un effet direct de son interaction avec p73 (*Melino & al, 2004*). En réponse aux agents génotoxiques et au stress oxydatif, p73 est transcriptionnellement activé par p53 (*Chen & al, 2001 ; Wang & al, 2007*). Comme p53, la stabilité et l'activité de p73 succédant aux dommages de l'ADN sont régulées par des modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation,

l'ubiquitination, l'acétylation et le recrutement de co-activateurs transcriptionnels. Aussi, p53 requiert p73 et p63 pour enclencher l'apoptose (*Flores & al, 2002*) et p73 a une fonction pro-apoptotique même en l'absence de p53. À la lumière des résultats de l'action directe de p53 sur les mitochondries, il serait intéressant de savoir si p73 peut induire des effets semblables. Il a été rapporté que l'apoptose induite par p73 α provoquait, de façon similaire à p53, un stress du RE (relocalisation au RE de la scotine) (*Bourdon & al, 2002 ; Terrinoni & al, 2004*). Ces événements ont pour conséquence une diminution du niveau intracellulaire de calcium et l'activation transcriptionnelle de Gadd153, facteur de transcription induit dans des conditions de stress du RE (*Terrinoni & al, 2004*).

De manière similaire à p53, le taux d'expression de la protéine p63 augmente après traitement des cellules avec des agents endommageant l'ADN (*Katoh & al, 2000 ; Okada & al, 2002 ; Petitjean & al, 2008*). Les taux augmentés de p63 ne résultent pas de l'activation transcriptionnelle du gène p63 mais sont probablement dus à des modifications post-traductionnelles (*Katoh & al, 2000 ; Okada & al, 2002*). De plus, p63 α qui possède un domaine inhibiteur à son extrémité C-terminale, est clivé par les caspases en un site consensus de clivage par les caspases non classique (acide aminé 458), lequel augmente l'activité apoptotique de cette protéine (*Sayan & al, 2007*). L'apoptose dépendante de p63 semble être primitivement régulée par des mécanismes transcriptionnels et aucun mécanisme indépendant de la transcription n'a à ce jour été identifié. Toutes les isoformes de p63 activent de manière transcriptionnelle les promoteurs transfectés exogènes, les ARNm endogènes ou les protéines issues des gènes cibles pro-apoptotiques de p53 (*Katoh & al, 2000 ; Helton & al, 2008*). Les gènes cibles de p63 incluent Fas/CD95, TNF-R, TRAIL-R, Bax, PIG3, Rad9, Apaf-1, et les caspases-3, -8, -9 (*Gressner & al, 2005 ; Ihrie & al, 2005 ; Helton & al, 2008*). Par ailleurs, le domaine de transactivation et le domaine riche en proline de p63 sont requis pour son activité de transactivation. En effet, la délétion du domaine riche en proline n'affecte pas la capacité de p63 à bloquer la croissance mais abolit l'induction de l'apoptose par p63 (*Helton & al, 2008*). Les mécanismes de régulation qui sous-tendent l'apoptose dépendante de p63 ne sont pas complètement élucidés. Des modifications post-traductionnelles et des partenaires protéiques ont été identifiés. Bien qu'ils affectent l'activité transcriptionnelle de p63, il n'est pas clair si ceux-ci influencent spécifiquement la fonction apoptotique de cette protéine. Ainsi, la phosphorylation de p63 contribuerait à la régulation de son taux intracellulaire. Par exemple, le traitement à l'acide okadaïque entraîne une augmentation du taux de p63, suggérant que la phosphorylation par des sérine/thréonine-kinases spécifiques pourrait

stabiliser la protéine p63 (Okada & al, 2002 ; Petitjean & al, 2008). Par ailleurs, le facteur p63 peut prévenir l'apoptose engagée par p73, suggérant là encore l'existence de réseaux complexes non élucidés requis pour la résistance aux drogues. P63 a été décrit comme inducteur de transcription de certains gènes impliqués dans les voies de signalisation apoptotique et ciblés par p53 comme Mdm2, Bax, PERP et Noxa (Flores & al, 2002). Comme p53, l'induction de gènes pro-apoptotiques par p63 ou p73 est augmentée après l'association aux protéines ASPP (pour Apoptosis-Stimulating Proteins of p53) (Bergamaschi & al, 2004). Les protéines ASPP1 et ASPP2 interagissent avec p63 et augmentent la transactivation des promoteurs de Bax et PIG3 et ainsi l'activité apoptotique de p63, alors que la transactivation de p21^{WAF1} ou Mdm2 par p63 n'est pas affectée quand les protéines ASPP1 et ASPP2 sont surexprimées.

c) c-Abl.

La protéine c-Abl est une tyrosine-kinase impliquée dans de nombreux processus cellulaires et réside de manière prépondérante dans le noyau. De nombreux faits expérimentaux relient cette protéine à l'apoptose. Tout d'abord la surexpression de c-Abl induit l'apoptose (Yuan & al, 1997). Des cellules c-Abl^{-/-} sont résistantes à l'apoptose induite suite à des altérations de l'ADN (Huang & al, 1997). Enfin, le traitement à l'étoposide, la doxorubicine ou le cisplatine entraîne la phosphorylation et l'activation de c-Abl par les kinases ATM et DNA-PK (Pommier & al, 2004).

En réponse aux dommages à l'ADN, c-Abl protège p53 en neutralisant les effets inhibiteurs de Mdm2. La phosphorylation de Mdm2 par c-Abl lève l'inhibition de p53 par Mdm2, définissant un mécanisme par lequel c-Abl active p53 (Goldberg & al, 2002). Par ailleurs, c-Abl active la SAPK (stress activated protein kinase) également connue sous le nom de JNK (Liedtke & al, 1998). Une fois activée, SAPK est transloquée à la mitochondrie et phosphoryle Bcl-x_L. En outre, c-Abl inactive les voies de survie dépendantes des PI(3) kinases ou de la voie de NFκB en phosphorylant et stabilisant son inhibiteur endogène IκB qui réprime son activité transcriptionnelle. Par ailleurs, cette kinase c-Abl phosphoryle p73 et augmente ses activités transcriptionnelles et apoptotiques (Gong & al, 1999 ; Yuan & al, 1999). Les dommages à l'ADN induisent la phosphorylation de p73 sur la tyrosine 99 d'une manière dépendante de c-Abl, et les protéines p73 mutées sur ce résidu sont incapables d'induire la réponse apoptotique après traitement par radiations ionisantes (Sanchez-Prieto & al, 2002).

La kinase c-Abl est directement clivée par les caspases durant l'apoptose induite par Fas, TNF (impliquant la voie des récepteurs de mort) et par les dommages à l'ADN (*Barila & al, 2003*). Les produits de clivage (fragments de 120kDa) de c-Abl sont transloqués au noyau où la protéine c-Abl tronquée exerce sa fonction pro-apoptotique, et sensibilisent les cellules à l'apoptose (*Barilà & al, 2003*).

d) La kinase Chk2.

Les kinases Chk1 et Chk2 forment le module central en aval d'ATR/ATM qui les activent par phosphorylation. Ces sérine/thréonine-kinases sont à l'interface entre les détecteurs des dommages de l'ADN et les effecteurs de la réponse à ces lésions. Elles jouent un rôle critique dans le choix de la réponse cellulaire. A la différence de Chk1, la kinase Chk2, située en aval d'ATM, est impliquée dans l'induction de l'apoptose succédant aux dommages de l'ADN. Elle régule l'apoptose en phosphorylant PML (Promyelocytic leukemia protein) (*Yang & al, 2002*). Les effets de PML s'exercent, du moins en partie, en régulant positivement p53 ou *via* la protéine DAXX qui intervient dans la voie apoptotique des récepteurs de mort. Outre son effet régulateur de l'apoptose, Chk2 participe à la régulation du cycle cellulaire en inactivant les Cdk et en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phosphorylant Cdc25A et Cdc25C. La protéine p53 est également un substrat de Chk2. La phosphorylation de p53 induit la transcription de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21^{WAF1}, des protéines pro-apoptotiques Puma, Noxa, et du facteur NFκB qui réprime la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L.

Un certain nombre d'interactions fonctionnelles règnent entre les composantes des points de contrôle du cycle cellulaire et les régulateurs de la voie apoptotique mitochondriale. Par exemple, un mécanisme direct implique la protéine pro-apoptotique BH3-only Bid dans le contrôle de la phase S régulé par ATM (*Kamer & al, 2005 ; Zinkel & al, 2005*). Des souris Bid^{-/-} ne sont pas arrêtées dans le cycle cellulaire en réponse à l'étoposide, indiquant une fonction favorable à la survie de Bid dans le noyau, alors qu'il exerce un rôle purement pro-apoptotique dans la mitochondrie. En fait, Bid est phosphorylé par ATM en des sites requis pour son activité dans le contrôle du cycle cellulaire. Ces résultats sont toutefois controversés par Kaufmann qui montre que Bid est dispensable pour l'arrêt du cycle (comme pour l'apoptose) en réponse aux dommages de l'ADN. Le rôle de Bid dans le contrôle du cycle cellulaire demeure controversé (*Kaufmann & al, 2007a-2007b ; Zinkel & al, 2007*). Récemment, il a été montré que le régulateur apoptotique Apaf-1, bien connu pour sa

participation à la formation de l'apoptosome, joue aussi un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Le knockdown d'Apaf-1 dans des cellules humaines, le knockout d'Apaf-1 chez des souris et des mutations « perte de fonction » de Ced4, homologue de Apaf-1 chez *C. elegans*, révèlent l'implication de Apaf-1/Ced4 dans l'arrêt du cycle cellulaire succédant aux dommages de l'ADN (Zermati & al, 2007). La perte de Apaf-1 compromet les points de contrôle du cycle cellulaire déclenchés suite aux radiations ionisantes ou aux chimiothérapies tel le cisplatine. La déplétion en Apaf-1 corrèle avec un défaut de l'activation de la kinase Chk1 et le knockdown de Chk1 abroge l'arrêt dans le cycle par Apaf-1 (Zermati & al, 2007). Apaf-1 jouerait un rôle non apoptotique dans la réponse aux dommages de l'ADN. Dans des cellules exprimant Apaf-1, la protéine est transloquée au noyau suite aux dommages de l'ADN. Ceci met en évidence son rôle distinct dans la régulation de la voie Chk1. Apaf-1 régulerait une phosphatase qui déphosphorylerait Chk1. Par ailleurs, outre leurs effets directs sur les points de contrôle du cycle cellulaire, les régulateurs apoptotiques de la famille Bcl-2 sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Toutefois, Bcl-2 serait aussi directement impliqué dans la répression du mécanisme de réparation NHEJ, conduisant indirectement à l'arrêt du cycle cellulaire (Wang & al, 2008). Précisément Bcl-2 inhibe la fonction de la DNA-PK, enzyme cruciale du processus NHEJ, en bloquant l'interaction entre l'hétérodimère Ku70-Ku80 et la sous-unité catalytique de la DNA-PK.

e) Autres protéines requises en réponse aux dommages de l'ADN.

Les communications entre le noyau et la mitochondrie font actuellement l'objet de grandes investigations et de nombreuses protéines ont été découvertes dans la signalisation entre ces deux organites, parmi lesquelles Nur77/TR3, la caspase-2, l'histone H1.2.

- Le récepteur nucléaire orphelin Nur77/TR3.

L'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire orphelin **Nur77/TR3** aurait des effets pro-apoptotiques dépendants de la mitochondrie en réponse aux dommages de l'ADN induits par l'étoposide ou le 5-FU (Moll & al, 2006).

- La caspase-2.

L'activation de la **caspase-2** a été détectée en réponse aux dommages de l'ADN induits par les génotoxiques tels l'étoposide, le cisplatine, la doxorubicine, les radiations ionisantes, avant la perméabilisation mitochondriale (Lassus & al, 2002). La pro-caspase-2 est constitutivement présente dans le noyau et est relocalisée suite aux dommages de l'ADN

(*Zhivotovski & al, 1999*). Nombreuses données indiquent que la caspase-2 fonctionne comme une enzyme régulatrice initiatrice en amont de la mitochondrie durant l'apoptose succédant aux dommages de l'ADN (*Robertson & al, 2002 ; Vakifahmetoglu & al 2006*). Le PIDDosome est une importante plateforme d'activation de la caspase-2 en réponse au stress génotoxique (*Tinel & Tschopp, 2004*). L'activation de la caspase-2 par le PIDDosome est étroitement associée à p53. Une connexion fonctionnelle entre la caspase-2 et p53 est essentielle à l'apoptose consécutive aux dommages de l'ADN (*Vakifahmetoglu & al 2006 ; Baptise-Okoh & al, 2008*). Toutefois, la présence d'un complexe comprenant PIDD, RAIDD et la caspase-2 est retrouvée dans les cellules p53^{+/+} comme dans les cellules p53^{-/-}. Bien que ces résultats confirment la participation de PIDD et RAIDD dans la formation du PIDDosome, ils questionnent sur leur rôle en tant qu'uniques médiateurs de l'activation de la caspase-2. Un autre mécanisme d'activation de la caspase-2 et d'induction de l'apoptose impliquant les composantes des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque (*Duan & Dixit, 1997 ; Lavrik & al, 2006*), a récemment été réinvesti par Olsson (*Olsson & al, 2009*). La caspase-2 peut avoir recours au complexe DISC comme autre plateforme d'activation. Le recrutement de la caspase-8 au sein de ce complexe est capital pour l'activation de la caspase-2 en réponse aux dommages de l'ADN générés par des agents génotoxiques (5-FU, étoposide). La caspase-8 interagit directement avec la pro-caspase-2, procédant en son clivage et son activation. Les deux caspases -2 et -8 clivent Bid et la forme active tBid conduit à la perméabilisation de la MME, au relargage du cytochrome-c et à l'activation consécutive de la cascade des caspases en aval. Le lien fonctionnel entre ces deux caspases au sein du complexe DISC constitue un mécanisme alternatif au PIDDosome pour l'activation de la caspase-2 apicale suite aux lésions génomiques (*Olsson & al, 2009*). Peu de substrats de la caspase-2 ayant été identifiés, elle aurait une fonction amplificatrice plutôt qu'effectrice dans les cascades apoptotiques (*Zhivotovsky B & Orrenius S, 2005*). De plus, la caspase-2 pourrait être spécifiquement impliquée dans une voie de mort cellulaire dépendante de ATM/ATR contrôlée par Chk1 en l'absence de p53 fonctionnel et activée en réponse aux dommages de l'ADN (*Sidi & al, 2008*). Cette fonction semble indépendante de la participation de molécules classiquement associées à l'apoptose (caspase-3, Bcl-2), proposant une voie de mort cellulaire alternative agissant indépendamment du réseau de p53 après endommagement de l'ADN. L'implication de la caspase-2 dans différentes voies conduisant à l'apoptose en réponse aux dommages de l'ADN est résumée à la figure 12.

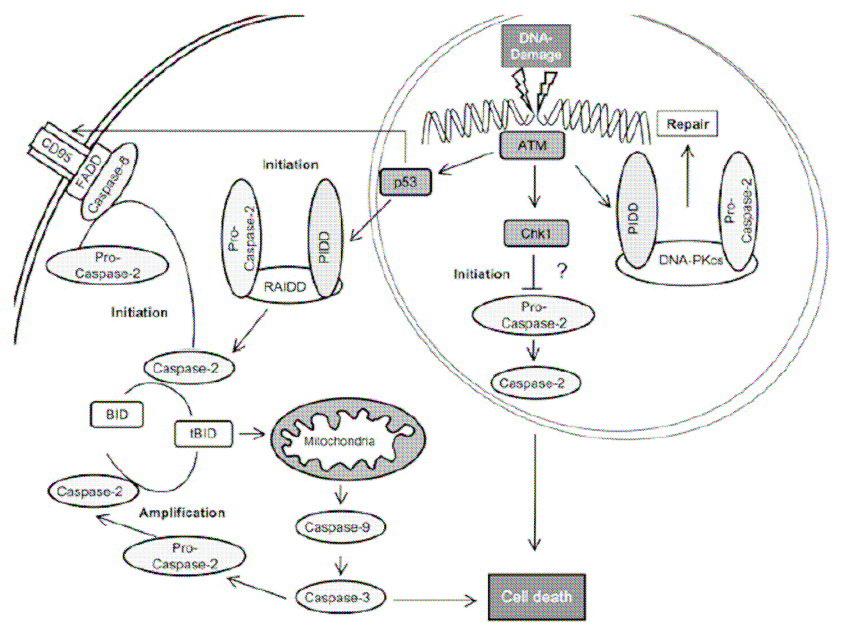


Figure 12 : La caspase-2 dans l'apoptose induite en réponse aux dommages de l'ADN (d'après *Krumshnabel & al, 2009*).

- L'histone H1.2.

En 2003, le groupe de Tsujimoto découvre que l'histone H1.2 est un facteur apoptogène qui est libéré du noyau dans le cytosol en réponse aux dommages de l'ADN et provoque la libération mitochondriale de cytochrome-c et l'apoptose consécutive (*Konishi & al, 2003*). Dans ce contexte, la translocation de l'histone H1.2 à la mitochondrie dépend de la stabilisation et de la translocation mitochondriale de p53, et est régulée par la kinase Chk2 (*Chen & al, 2005*). Une fois transloquée à la mitochondrie, l'histone H1.2 s'associe et co-localise avec Bak dans la MME, entraînant son changement conformationnel et son activation, à l'origine du relargage du cytochrome-c et de l'induction du processus apoptotique (*Konishi & al, 2003 ; Okamura & al, 2008*). Par ailleurs, en système acellulaire, l'histone H1.2 induit l'activation des caspases-3 et -7 en formant un complexe protéique avec Apaf-1, la caspase-9 et le cytochrome-c (*Ruiz-Vela & Korsmeyer, 2007*). Ceci suggère que l'histone H1.2 agit comme un régulateur positif de la formation de l'apoptosome. Ainsi, l'histone H1.2 joue un rôle important dans la transmission des signaux apoptotiques et dans la communication entre le noyau et la mitochondrie suite à des lésions de l'ADN.

f) Les céramides, seconds messagers lipidiques.

Différents traitements génotoxiques incluant la daunorubicine, le mitoxantrone, l'étoposide ou le cisplatine sont suivis de l'action d'une lipase particulière, la sphingomyélinase. Cette enzyme hydrolyse la sphingomyéline, lipide constituant les

membranes plasmiques pour générer les céramides, un second messager de l'apoptose. Les céramides modulent l'apoptose des cellules *via* la stimulation de plusieurs voies de signalisation passant par l'inhibition des kinases des voies de survie (Akt/PKB et PKC α), par l'activation de kinases activées en réponse à un stress (JNK/SAPK, PKC δ) et de phosphatases (PP2A et PP1), et par la mitochondrie. Les céramides induisent directement l'apoptose *via* une voie mitochondriale sur les cellules cancéreuses. Cet effet nécessite la transformation des céramides en gangliosides GD3 au niveau de l'appareil de Golgi (*De Maria & al, 1997*). Le GD3 induit la transition de perméabilité sur des cellules intactes ou des mitochondries isolées (*Scorrano & al, 1999*). Les céramides forment des canaux dans la MME (*Siskind & al, 2006*) ou induisent l'activation mitochondriale et l'apoptose par une voie dépendante des protéines de la famille Bcl-2, tel Bax, Bak et Bim.

De manière contradictoire, les traitements anticancéreux stimulent aussi la production de Diacylglycérol (DAG) par induction de la phospholipase-C. Le DAG active alors la protéine kinase C qui inhibe la voie des céramides en amont et en aval de leur production. La réponse finale de la cellule serait affectée par l'équilibre entre la production des céramides et celle du DAG.

g) La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Plusieurs agents communément utilisés pour le traitement des cancers induisent une augmentation de la production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), parmi lesquels le trioxyde d'arsenic, les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine), la vinblastine, le cisplatine, la mitomycine C, la camptothécine, l'inostamycine, la néocarzinostatine (*Engel & Evens, 2006*). La remarquable activité du trioxyde d'arsenic dans les leucémies promyéloïdes aiguës est attribuée à de multiples mécanismes d'action, dont une production accrue de ROS intracellulaires altérant la perméabilité de la MME (*Jing & al, 1999*). Il affecte le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), à l'origine de cette production marquée d'anions superoxydes due à la fuite d'électrons à partir des complexes respiratoires (*Pelicano & al, 2003*). Des anthracyclines telle la daunorubicine, réagissent avec le cytochrome P450 en présence de NAD(P)H réduit pour former des intermédiaires radicalaires semiquinones qui en retour réagissent avec l'oxygène pour générer des anions superoxydes (*Gouaze & al, 2001*). La doxorubicine, anthracycline inhibiteur de la topoisomérase II, génère des ROS (H₂O₂ et anions superoxydes) à l'origine de dommages mitochondriaux et de l'apoptose induite indépendamment de p53 (*Serrano & al, 1999 ; Tsang*

& al, 2003) et contribuant en sa cardiotoxicité. La doxorubicine génère des dommages oxydatifs de l'ADN, directs et sites-spécifique en présence de cuivre II, conduisant à la production indirecte de H₂O₂ par l'activation de la PARP et de la NAD(P)H Oxydase (NOX). La production de ROS joue également un rôle important dans la cytotoxicité du cisplatine (Miyajima & al, 1997) modulée par la thioredoxine et le glutathion (Lu & Cederbaum, 2007). La bléomycine est capable de se lier simultanément à l'oxygène et à un ion métallique (Fe²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ ou Mn²⁺) après liaison à l'ADN, pour induire la production de radicaux libres (Petering & al, 1990). Le bortezomibe, inhibiteur du protéasome, provoque dans les cellules NSCLC une production de ROS et une dysfonction mitochondriale (Ling & al, 2003). Le rétinoïde de synthèse 4HPR (pour N-(4-hydroxyphenyl)retinamide) est actif dans une variété de lignées cellulaires cancéreuses et induit une significative production de ROS mitochondriaux affectant la CRM, la peroxydation des cardiolipines et l'altération de la perméabilité membranaire mitochondriale à l'origine de l'activation de la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale comme démontré dans les cellules leucémiques, les cellules de rétinoblastome (Goto & al, 2003 ; Tosetti & al, 2003). Autre exemple, le TAS-103, un inhibiteur de topoisomérase, induit l'apoptose des cellules cancéreuses via le clivage de l'ADN et la production ultérieure de H₂O₂ par l'activation de la PARP et de la NOX. L'apoptose induite par la berbérine, un alcaloïde isoquinoline et inhibiteur de la topoisomérase II, est initiée par la production de ROS par la xanthine oxydase, une autre source intracellulaire de ROS (notamment H₂O₂) (Meeran & al, 2008).

Les ROS réagissent rapidement et endommagent différents types de biomolécules (acides nucléiques, phospholipides membranaires et protéines). Les dommages oxydatifs de l'ADN, telles des modifications des bases puriques et pyrimidiques ou du squelette de désoxyribose, des cassures simples et doubles brins, des liaisons croisées (cross-links) avec d'autres molécules, rompent ainsi la continuité de la double hélice. L'oxydation des protéines entraîne leur perte de fonctions (activité enzymatique, capacité à former des canaux, etc ...) et augmente leur susceptibilité à la dégradation protéolytique. La peroxydation des lipides perturbent la dynamique et les fonctions de barrière des membranes cellulaires. La peroxydation des lipides mitochondriaux affectent les fonctions mitochondriales (respiration, phosphorylation oxydative, perméabilité aux ions, maintien du $\Delta\Psi_m$, capacité à tamponner les vagues calciques) et la peroxydation des cardiolipines, phospholipides spécifiques à la membrane mitochondriale interne, entraîne le détachement du cytochrome-c. Par ailleurs le stress oxydatif sensibilise fortement la mitochondrie à l'induction de la MPT (Kowaltowski &

al, 1996). L'ANT est une cible des ROS induits par les agents anticancéreux tels la doxorubicine et le trioxyde d'arsenic. Le rôle de VDAC comme cible des ROS est moins clair.

Conclusion :

Suite aux lésions de l'ADN, une réponse moléculaire complexe est activée conduisant à la survie ou à la mort de la cellule. Les protéines ATM/ATR et DNA-PK sont les premiers relais des altérations de l'ADN et phosphorylent les protéines p53, c-Abl, Chk2 qui participent à l'induction de l'apoptose ou à l'arrêt du cycle cellulaire. Les voies de signalisation convergent ensuite vers deux sites cellulaires : à la surface cellulaire pour activer la voie des récepteurs de mort ou vers la mitochondrie. La figure 13 récapitule les principales voies de l'apoptose induites suite aux dommages de l'ADN générés par les agents anticancéreux conventionnels.

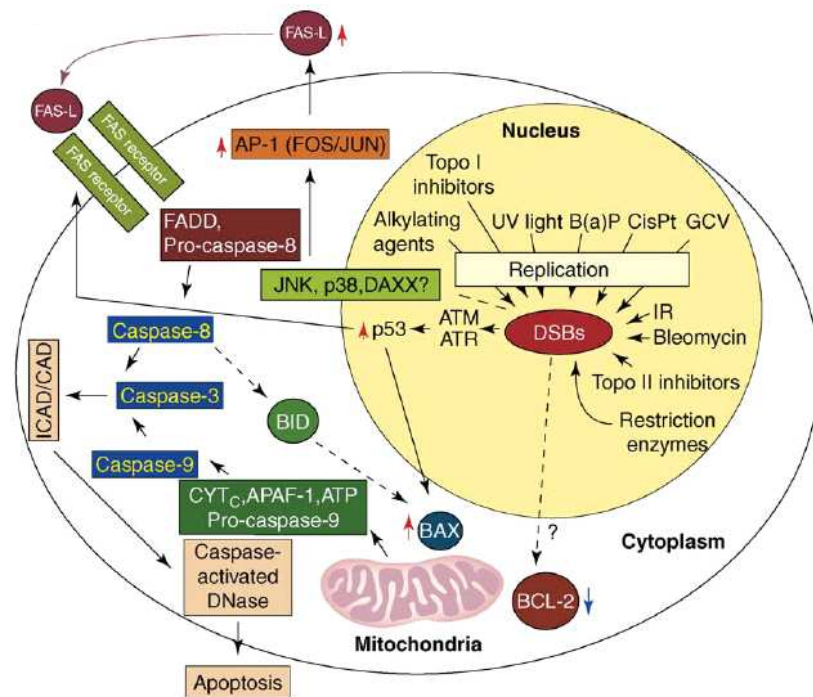


Figure 13 : Principales routes de l'apoptose induites par les dommages de l'ADN en réponse aux agents génotoxiques (d'après Roos & Kaina, 2006).

II- Illustration du mécanisme d'induction de l'apoptose suite aux dommages de l'ADN : les inhibiteurs de la topoisomérase-1 nucléaire.

Les inhibiteurs de topoisomérases sont des poisons qui stabilisent les topoisomérases sur l'ADN. Ces drogues se lient spécifiquement à l'interface ADN/Topoisomérase-1 et bloquent les complexes de clivage en prévenant l'étape de re-ligation de l'ADN (*Meng & al, 2003 ; Pommier, 2003*). Dans cette conformation particulière, l'ADN a déjà été clivé sur l'un de ses brins par l'enzyme. Les machineries de réplication et de transcription qui parcourent l'ADN finissent par entrer en collision avec les complexes ADN/Topoisomérases, induisant alors des coupures doubles brins irréversibles (*Pommier & al, 1999*). La stabilisation du complexe de clivage par ces inhibiteurs génère donc des lésions de l'ADN qui initient un arrêt du cycle cellulaire suivi de la réparation de l'ADN (*Pommier & al, 2003*) et/ou de l'apoptose (*Sordet & al, 2003*). L'activation de l'apoptose est finement contrôlée en amont par des voies régulatrices qui répondent aux lésions de l'ADN induites par les inhibiteurs de topoisomérase-1. L'initiation de ces réponses cellulaires implique la reconnaissance des cassures de l'ADN par les kinases ATM, ATR et DNA-PK. Celles-ci phosphorylent un grand nombre de substrats parmi lesquels les kinases c-Abl et Chk2. C-Abl induit l'apoptose d'une part en activant les voies de mort cellulaire impliquant SAPK/JNK, p73 et p63, et d'autre part en inhibant la voie de survie PI3K. En plus de son rôle dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN, la kinase Chk2 peut induire la phosphorylation activatrice de PML et de p53 à l'origine de l'induction du programme apoptotique par une voie mitochondriale intrinsèque. L'activation de l'apoptose par les inhibiteurs de topoisomérase-1 est dépendante du type cellulaire et de la dose administrée, suggérant que des lésions de même type peuvent activer différentes voies. Dans certains types cellulaires, la réponse apoptotique implique également le récepteur de mort Fas. En effet, le traitement de lignées cellulaires de carcinome du colon HT29 avec la camptothécine entraîne une augmentation de l'expression de Fas, Fas ligand, Bax et p21, ainsi que le recrutement de FADD par Fas (*Shao & al, 2001*). Le traitement de cellules HT29 avec FasL ou l'anticorps anti-Fas agoniste, CH-11, potentialise la réponse apoptotique des cellules HT29 traitées à la camptothécine, alors que l'anticorps anti-Fas bloquant ZB4 et l'inhibiteur de FasL sont incapables de prévenir l'apoptose induite par la CPT dans ce modèle. Par ailleurs, il a été rapporté que l'apoptose induite par les inhibiteurs de topoisomérase impliquait la production de ROS. C'est le cas de la CPT qui de manière synergique avec l'activation de Fas, induit

l'apoptose des cellules de médulloblastome *via* un processus dépendant des ROS (Li & al, 2009). Le TAS-103, un inhibiteur mixte de l'activité des topoisomérases-1 et -2, entraîne l'apoptose des cellules leucémiques *via* la production de H₂O₂ (Mizutani & al, 2002). Dans les cellules leucémiques, le TAS-103 entraîne le clivage de l'ADN par inhibition de l'activité des topoisomérases. La formation de ces dommages de l'ADN provoque l'hyperphosphorylation de la PARP laquelle a pour conséquence une déplétion du NAD⁺ et NADP⁺ intracellulaire, à l'origine de l'activation des NAD(P)H-oxydases. Actifs, ces complexes enzymatiques membranaires stimulent la production de H₂O₂. H₂O₂ va déclencher la MPT à l'origine de la chute du $\Delta\Psi_m$ et de l'activation de la caspase-3 qui gouverne la dégradation oligonucléosomique de l'ADN.

III- Les thérapies ciblées induisent l'apoptose des cellules tumorales.

Les génotoxiques ont fait partie des premières molécules utilisées en chimiothérapie. Ces dernières années, de nouvelles approches ont été développées parmi lesquelles les thérapies ciblées présentent l'intérêt, au moins théorique, de cibler sélectivement les cellules tumorales. Les thérapies ciblées se distinguent des agents génotoxiques conventionnels car elles ciblent de nouveaux points stratégiques, de localisation extranucléaire, spécifiques de la machinerie cellulaire tumorale. Le ciblage concerne des protéines spécifiquement exprimées dans les tumeurs ou des voies de signalisation dérégulées dans les cellules tumorales. Cependant comme les génotoxiques, un certain nombre de thérapies ciblées déclenchent l'apoptose des cellules tumorales, principalement par une voie mitochondriale. Parmi les thérapies ciblées, les approches cliniques les plus efficaces sont de loin les anticorps monoclonaux et les petites molécules inhibiteurs de protéines kinases.

3.1- Les anticorps monoclonaux à visée antitumorale sont peu cytotoxiques.

L'efficacité des anticorps monoclonaux (mAb) en thérapie antitumorale s'est confirmée en 1997 avec le développement d'un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20, le Rituximab. Cette approche est particulièrement adaptée au ciblage de récepteurs membranaires spécifiquement surexprimés dans certaines tumeurs. A ce jour, parmi les 21 anticorps monoclonaux en essais cliniques, neuf sont indiqués en thérapie antitumorale : Rituximab (Rituxan®, 1997), Trastuzumab (Herceptin®, 1998), Gemtuzumab ozogamicin

(Mylotarg®, 2000), Alemtuzumab (Campath®, 2001), Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®, 2002), Tositumomab-I131 (Bexxar®, 2003), Cetuximab (Erbix®, 2004), Bevacizumab (Avastin®, 2004), Panitumumab (Vectibix®, 2006).

Bien que les mAb interagissent directement avec les récepteurs membranaires spécifiques, une multitude de réponses sont possibles, déterminées par les propriétés de l'antigène, celles de l'anticorps et le contexte cellulaire (*Eccles, 2001*). Ils interfèrent directement avec les voies de transduction du signal en les bloquant au point d'amorçage, prévenant la fixation du ligand activateur à son récepteur. Ainsi, les récepteurs à activité kinase de la famille du récepteur à l'EGF (tels que HER2), la voie du HGF (Hepatocyte growth factor)/c-Met, la voie du récepteur de l'IGF (Insulin-like growth factor) sont des voies de transduction du signal cellulaire souvent dérégulées dans les cellules cancéreuses et représentent les cibles des anticorps monoclonaux actuellement en essais cliniques (*pour revue, Ma & Adjei, 2009*). Ainsi, le Trastuzumab administré seul réduit significativement le volume tumoral constitué de cellules du sein exprimant le récepteur HER2 (*pour revue Nahta & Esteva, 2006*). Cependant, malgré leur apparent succès, les mécanismes d'action par lesquels ces mAb exercent leur activité antitumorale ne sont pas pleinement élucidés. Ils peuvent induire de multiples réponses qui contribuent à leur effet antitumoral telles que l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition de l'angiogenèse, le déclenchement de réponses immunes, l'inhibition de la réparation des cassures de l'ADN, et pour certains d'entre eux une réponse cytotoxique. Plusieurs études *in vivo* chez l'homme (*Gennari & al, 2004 ; Van Pelt & al, 2003*) indiquent que le Trastuzumab induit l'apoptose des cellules cancéreuses du sein mais les mécanismes et l'importance de ce phénomène nécessitent d'être étudiés. Enfin, les mécanismes cytotoxiques de ces molécules, directs ou indirects (par activité anti-angiogénique ou sur le système immunitaire) ne sont pas connus.

3.2- Les petites molécules inhibiteurs des protéines kinases induisent l'apoptose des cellules tumorales.

Les protéines kinases sont des cibles privilégiées en thérapie antitumorale du fait de la fréquente dérégulation de leur activité kinase. Les conformations actives comme inactives de ces protéines kinases sont retenues dans les stratégies de développement de composés puissants et sélectifs. L'extraordinaire succès de l'Imatinib (Glivec®) a encouragé le développement de nombreux inhibiteurs de protéines kinases parmi lesquels une dizaine est actuellement utilisée en cliniques. L'Imatinib (Glivec®), pionnier de la série des inhibiteurs

de protéines kinases, et des composés plus récents tel le Dasatinib ciblent la protéine de fusion Bcr-Abl. Outre le ciblage de la kinase Bcr-Abl dérégulée dans les leucémies myéloïdes chroniques, d'autres inhibiteurs de protéines kinases sont actuellement utilisés en clinique. Le Gefitinib (Iressa®) et l'Erlotinib (Tarceva®), premiers inhibiteurs du récepteur à l'EGF, ont une efficacité démontrée chez les patients atteints de cancer où des mutations affectent le domaine kinase de l'EGFR, le rendant constitutivement actif, et de cancers résistants aux thérapies anticancéreuses conventionnelles (par exemple les cancers NSCLC). D'autres petites molécules inhibiteurs des récepteurs à activité kinase sont également utilisées dans le traitement des cancers tel le Sorafenib, à l'origine développé comme inhibiteur de Raf, qui inhibe le récepteur au VEGF, empêchant l'angiogenèse du cancer. Par ailleurs, les inhibiteurs de protéines kinases peuvent également interférer avec les kinases impliquées dans la signalisation intracellulaire, fréquemment mutées dans certains types de cancers. C'est le cas des kinases de la voie PI3K/Akt/mTOR, de la voie des MAPK (Ras, Raf, MEK), de la kinase Src, pour lesquelles de nombreux inhibiteurs spécifiques sont actuellement en cours d'essais cliniques pour le traitement d'un large panel de tumeurs (pour revue *Ma & Adjei, 2009*).

Les effets cellulaires des petites molécules inhibiteurs des kinases incluent un arrêt de la croissance cellulaire, des désordres métaboliques et l'induction de l'apoptose (pour revue *McCubrey & al, 2008*). En interférant avec de multiples voies de survie comme les voies PI3K/AKT, JAK/STAT et Raf/MEK/ERK, ces molécules induisent un stress cellulaire qui va activer l'apoptose généralement par une voie mitochondriale (pour revue *McCubrey & al, 2008*). Par exemple, l'inhibition des voies Akt par l'Imatinib conduit à la déphosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad et consécutivement à sa relocalisation mitochondriale pour favoriser la perméabilité mitochondriale et la mort apoptotique des cellules leucémiques (pour revue *McCubrey & al, 2008*).

IV- Les chimiothérapies classiques peuvent induire des réponses cellulaires différentes de l'apoptose.

Après une chimiothérapie, l'importance de l'apoptose dans les tumeurs solides *in vivo* reste discutée. Plusieurs auteurs (*Abend, 2003 ; Erenpreisa & al, 2006*) minimisent l'importance de l'apoptose dans la régression tumorale post-traitement, au profit d'autres formes de mort. Ainsi, l'apoptose n'est pas l'unique réponse cellulaire déclenchée après des dommages cellulaires induits par la chimiothérapie. Les autres réponses peuvent être

l'autophagie, la nécrose, la catastrophe mitotique (Abend, 2003 ; Okada & al, 2004). Par ailleurs, en réponse à certaines chimiothérapies, les cellules tumorales peuvent être irréversiblement arrêtées dans le cycle cellulaire, phénomène apparenté à la sénescence.

Certains agents anticancéreux, habituellement référencés pour induire l'apoptose des cellules tumorales, peuvent déclencher des programmes de mort non apoptotiques dans certains types cellulaires ainsi traités. A travers quelques exemples, le tableau suivant illustre le fait que l'apoptose n'est pas la seule réponse cellulaire activée par les thérapies anticancéreuses conventionnelles.

Agent anticancéreux	Type de mort non apoptotique	Modèle cellulaire	Références	
γ - irradiation	Autophagie	Cancers du sein, prostate, colon, gliome	<i>Yao & al, 2003</i> <i>Ito & al, 2005</i>	
Tamoxifen		Cancer du sein	<i>Scarlatti & al, 2004 ;</i>	
Temozolomide		Gliome malin	<i>Kanzawa & al, 2004</i>	
Arsenic trioxyde As ₂ O ₃		Gliome malin, cellules leucémiques	<i>Kanzawa & al, 2003-2005 ;Yang & al, 2008</i>	
Butyrate de sodium		Cellules Hela surexprimant Bcl-xl		<i>Shao & al, 2004</i>
Acide suberoylanilide SAHA				
Etoposide		Cellules de cancer du col	<i>Lee & al, 2007</i>	
Inhibiteurs de la CRM : (piericine, myaxothiazol)	Mitophagie	Cellules HeLa	<i>Pletjushkina & al, 2006 ;</i> <i>Chen Y & al, 2007</i>	
Sélénite de sodium		Cellules gliomes	<i>Kim & al, 2007</i>	
Fas-L	Nécrose	Cellules de fibrosarcomes Cellules leucémiques	<i>Vercammen & al, 1998;</i> <i>Holler & al, 2000</i>	
MNNG		Cellules MEF et BMK	<i>Zong & al, 2004</i>	
Cisplatine		Cellules leucémiques	<i>Gonzalez & al, 2001;</i>	
Vincristine		Cellules de mélanome	<i>Leonetti & al, 2004</i>	
Arsenic trioxyde As ₂ O ₃		SCLC, leucémies	<i>Petterson & al, 2009</i> <i>Scholz & al, 2005</i>	
Bortezomib	Catastrophe mitotique	Lymphomes	<i>Shen & al, 2008</i>	
Oxaliplatine		Cancer oesophage	<i>Ngan & al, 2008</i>	
Camptothécine, SN38	Sénescence	Cancer du colon, glioblastome	<i>Han & al, 2002;</i> <i>Wang Y & al, 2004</i>	

Doxorubicine		Carcinome du colon	<i>Chang & al, 2002;</i>
Poisons des microtubules (Paclitaxel, taxol, vincristine, vinblastine)		Cancer du sein	<i>Ramanathan & al, 2005 ; Alexandre & al, 2007</i>
Méthotrexate		Cancer du sein	<i>Hattangadi & al, 2004</i>
Discomerdolide		NSCLC	<i>Klein & al, 2005</i>

Quoi qu'il en soit, il est frappant de constater que dans la plupart de ces types de mort, la **mitochondrie** occupe une place centrale. La transition de perméabilité mitochondriale a été décrite dans l'apoptose comme dans la nécrose (*Lemasters & al, 1998*) et également au cours de l'autophagie. La libération cytosolique de cytochrome-c et d'AIF est observée lors de l'induction de la catastrophe mitotique par la débromohymenialdésine, un inhibiteur de Chk2 (*Castedo & al, 2004*). Par ailleurs de nombreuses interconnexions existent entre les différentes voies de signalisation et de régulation de ces processus de mort. Par exemple, les cathepsines et calpaïnes clivent Bid au niveau d'une région spécifique sensible aux protéases, suggérant le rôle de Bid comme détecteurs de l'intégrité des lysosomes et du réticulum endoplasmique (*Stoka & al, 2001 ; Chen & al, 2001*). L'inhibition des caspases stimule l'autophagie et potentialise les effets de la radiothérapie dans un modèle murin de cancer du poumon (*Kim & al, 2008*). De plus, des fibroblastes embryonnaires de souris double knockout Bax/Bak, résistantes à l'apoptose, meurent par un processus non apoptotique associé à la formation d'autophagosome/autolysosome après traitement à la staurosporine et à l'étoposide (*Shimizu, 2004*). Ainsi, les interactions entre les différentes réponses cellulaires aux traitements anticancéreux, quelles soient apoptotiques ou non apoptotiques, mettent la mitochondrie au cœur de cette attaque cytotoxique. Ces données renforcent l'intérêt que l'on doit porter à la mitochondrie dans les cellules tumorales traitées par les agents anticancéreux.

Partie III- Résistance à l'apoptose : une caractéristique des cellules cancéreuses.

L'apoptose assure l'élimination des cellules âgées, endommagées, inutiles ou potentiellement dangereuses. Dans les organismes adultes, l'apoptose a été abondamment décrite dans les cellules de tissus prolifératifs où elle contribue au maintien de l'homéostasie cellulaire. Etant donné le rôle fondamental du processus apoptotique dans le maintien de l'homéostasie tissulaire physiologique, il n'est pas étonnant de constater qu'un certain nombre de pathologies humaines puissent résulter d'un dysfonctionnement de l'apoptose, par excès ou par défaut. Parmi les dernières avancées de la recherche sur le cancer, une des plus importantes est l'assimilation que l'apoptose et les gènes qui la régulent ont un rôle fondamental dans le développement du phénotype tumoral. Par exemple, il est maintenant clair que quelques mutations oncogéniques dérèglent l'apoptose et ce phénomène conduit au déclenchement de la formation de la tumeur, à sa progression et à la genèse de métastases. Il est également évident que la plupart des agents anticancéreux induisent l'apoptose, et par conséquent que les défauts dans ce programme apoptotique contribuent à l'échec des traitements. Ce sont ces différents points qui relient cancer et apoptose que nous allons détailler dans les chapitres suivants.

Il est désormais évident que les cellules tumorales présentent de multiples défauts dans l'exécution du processus apoptotique. Cette résistance à l'apoptose s'opère à différents niveaux dans le déroulement du processus tumoral. Schématiquement il est concevable que cette résistance à l'apoptose intervienne dans la genèse du cancer, dans la persistance et la dissémination des cellules tumorales, dans la résistance des cellules tumorales aux traitements.

I- Arguments en faveur de l'implication d'une résistance à l'apoptose dans la genèse des cancers.

La tumorigénèse se définit comme un processus de transformation multi-étape (*Bertram, 2000*). Le phénotype malin est la conséquence de l'accumulation séquentielle de multiples défauts génétiques dans les cellules, bien souvent acquis individuellement pendant une période de la vie. La caractérisation des protagonistes moléculaires impliqués dans la

tumorigénèse résulte essentiellement des expériences d'inactivation génique dans le modèle animal.

La mutation la plus communément rencontrée est celle du gène suppresseur de tumeur p53. L'inactivation fonctionnelle de la protéine p53 est rencontrée dans plus de 50% des tumeurs solides chez l'homme (*Hollstein & al, 1994*). Les mutations germinales de p53 déterminent le syndrome de prédisposition au cancer de Li-Fraumeni caractérisé par des sarcomes. Des néoplasies clonales apparaissent spontanément dans les modèles de souris ayant subi une inactivation génique (knockout) de p53 (*Donehower & al, 1992 ; Jacks & al, 1994*). Les souris p53^{+/-} développent diverses tumeurs caractérisées par une perte ou une inactivation somatique de l'allèle wild-type restant (*Donehower & al, 1992 ; Jacks & al, 1994*). A l'inverse, p21 (essentiel pour l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53) est rarement muté dans les tumeurs humaines. Contrairement aux souris p53 KO, les souris p21^{-/-} ne développent pas de tumeur (*Donehower & al, 1992 ; Deng & al, 1995*). Par conséquent, les tumeurs observées dans les souris p53 KO ne résultent pas d'altérations du mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire, et l'apoptose est donc le mécanisme prédominant par lequel p53 inhibe le développement tumoral. Certaines mutations de p53 sont un événement relativement précoce dans les cancers de la peau autre que le mélanome (*Benjamin & Ananthaswamy, 2007*). Bien que p53 soit communément muté dans les tumeurs humaines, ce n'est pas le cas de ses homologues p63 et p73 (pour revue *Moll & Slade, 2004*).

La caractérisation du proto-oncogène **Bcl-2** a établi l'importance de l'apoptose dans la tumorigénèse. Bcl-2 a été identifié pour la première fois dans une catégorie de lymphomes à cellules B présentant la translocation du gène de Bcl-2 à proximité du gène d'une immunoglobuline, à l'origine de son expression soutenue et dérégulée (*Tsujimoto & al, 1984*). Cette translocation t(14 ; 18) augmente l'incidence de tumeurs spontanées des cellules B chez la souris. Toutefois, l'expression soutenue de Bcl-2 seule n'est que faiblement tumorigène et l'incidence tumorale dans ces souris est relativement faible (5-10%) après un temps de latence long (*McDonnell & Korsmeyer, 1991*). D'importants effets de la surexpression de Bcl-2 sur la lymphomagenèse ont été constatés en combinaison avec des oncogènes. Des effets synergiques sur le développement des lymphomes sont notés lorsque Bcl-2 coopère avec c-Myc, Pim-1 ou v-Abl (*Kumar & al, 1999 ; Acton & al, 1992 ; Strasser & al, 1990*). La surexpression de Bcl-2 dans d'autres tissus tels que les cellules myéloïdes et les cellules épithéliales mammaires confirme son rôle dans la tumorigénèse. En effet, de manière précoce

et accélérée, des souris surexprimant bcl-2/c-myc développent des tumeurs mammaires et des leucémies (Jager & al, 1997). Bcl-2 ne se comporte donc pas comme un oncogène typique : au lieu de perturber la prolifération, Bcl-2 favorise la survie des cellules en prévenant leur apoptose. La surexpression de **Bcl-x_L** induit la lymphomagenèse des cellules B (Swanson & al, 2004). Par ailleurs, les protéines BH3-only peuvent agir comme des suppresseurs de tumeurs. En effet, dans des modèles murins de lymphomes à cellules B, la perte d'un seul allèle de **Bim** accélère la lymphomagenèse des cellules B induite par la surexpression de c-myc (Egle & al, 2004). Quelques membres de la famille Bcl-2 seraient donc impliqués dans la tumorigénèse principalement de manière indirecte en coopération avec certains oncogènes et gènes pro-apoptotiques.

II- Arguments en faveur de l'implication d'une résistance à l'apoptose dans la persistance et la dissémination des cancers.

Hanahan et Weinberg (2000) suggèrent que le vaste catalogue des génotypes des cellules cancéreuses est représenté par la manifestation de six altérations principales de la physiologie cellulaire qui dictent collectivement la croissance maligne (figure 14):

- l'autosuffisance en signaux de croissance,
- l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance,
- l'échappement à l'apoptose,
- le potentiel répliatif illimité,
- l'angiogenèse soutenue,
- l'invasion tissulaire et métastases.

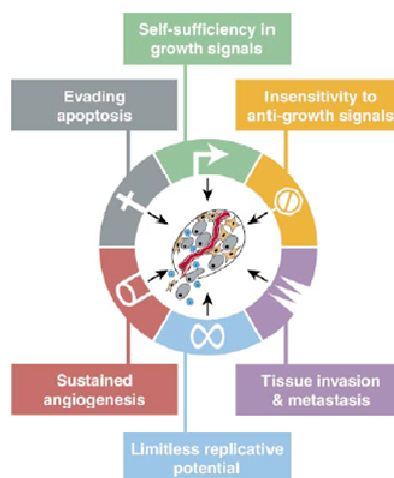


Figure 14 : Compétences acquises par les cellules cancéreuses (Hanahan & Weinberg, 2000).

Les cellules tumorales sont capables de surmonter les points de contrôle garants de l'intégrité du génome, en prévenant la détection des erreurs, en supplantant les contrôles cellulaires de ces points de contrôle, et en acquérant la capacité de résister à la mort cellulaire. L'évasion à l'apoptose est une *caractéristique intrinsèque* de presque toutes les tumeurs et il est maintenant reconnu que les produits des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes sont respectivement des médiateurs communs de la mort et de la survie cellulaires. On peut alors imaginer que des mutations dans l'expression et/ou la structure primaire des gènes qui régulent l'apoptose puissent intervenir dès les premières étapes de l'oncogenèse en favorisant la persistance des cellules mutées qui, en d'autres circonstances, seraient normalement éliminées. Ces mutations seraient donc à l'origine de la résistance acquise à l'apoptose des cellules tumorales. La résistance à l'apoptose peut contribuer au développement et à la dissémination des tumeurs. Les cellules tumorales doivent en effet survivre dans un milieu hostile caractérisé par des modifications métaboliques majeures au sein du microenvironnement, comme l'hypoxie, l'acidose, l'hypoglycémie (*Wouters & al, 2003*). La résistance à l'apoptose crée alors un environnement permissif pour l'instabilité génétique et l'accumulation de mutations (*Malaguarnera, 2004*).

Des mutations comme des mécanismes additionnels peuvent perturber la fonction de p53 wild-type (*Wiman, 2006*), comme la perte du bras court du chromosome 17 (*Baker & al, 1989*) ou l'amplification de Mdm2 (*Bond & al, 2004*). La perte du bras court p17 comme de p53 est fréquente dans les carcinomes colorectaux et corrèle avec la transition du stade adénome au stade carcinome, conférant un avantage de croissance à la tumeur (*Fearon & Vogelstein, 1990*). Dans les cancers avancés de la prostate, la fréquence des mutations de p53 est de 20-25% et corrèle avec la dissémination métastatique (*Navone & al, 1999*). Un modèle knock-in des mutations humaines R175H, désignés 515A, constitue un modèle murin du syndrome de Li-Fraumeni (*Lang & al, 2004*). Les tumeurs se développant chez les souris p53 515A^{+/-} présentent un taux supérieur de métastases. Ces mutations R175H augmentent donc le potentiel métastatique en réduisant la susceptibilité à l'apoptose (*Olive & al, 2004 ; Lang & al, 2004*). Par ailleurs, les mutations de p53 et l'activation de Bax sont étroitement liées dans la progression des cancers du colon (*Simms & al, 1998*). La surexpression de Noxa corrèle avec la progression des cancers de la prostate (*Diallo & al, 2007*), et celle de Mcl-1 dans le système hématopoïétique conduit au développement de divers lymphomes, principalement des lymphomes folliculaires et des lymphomes des cellules B diffus (*Zhou & al, 1998*). Mcl-1 est également impliqué dans la survie des cellules de myélomes multiples.

Des taux élevés de Mcl-1 sont détectés dans les cancers de la prostate, dans les leucémies lymphocytaires chroniques et les rechutes dans les AML et ALL. Dans les leucémies lymphocytaires chroniques, l'expression de Mcl-1 est un important régulateur de la progression de la maladie et est corrélée à d'autres marqueurs de mauvais pronostic (*Pepper & al, 2008*).

La perte de Bax accélère le développement de lymphomes des cellules B par c-Myc (*Eischen & al, 2001*). Bcl-x_L coopère aussi avec c-Myc dans la formation des tumeurs des cellules β-pancréatiques et des cancers cutanés (*Pelengaris & al, 2004*). Bcl-w est fréquemment surexprimé dans les adénocarcinomes colorectaux où il jouerait un rôle dans la progression du stade adénome au stade adénocarcinome dans l'épithélium colorectal. Il est également exprimé dans la majorité des adénocarcinomes gastriques infiltrants où il préviendrait l'apoptose des cellules tumorales en bloquant l'activation de JNK (*Lee & al, 2003*). Dans une récente étude, la comparaison des taux de Bim dans des nevi dysplasiques, des mélanomes primaires et des mélanomes métastatiques révèlent que l'expression de Bim décroît avec la progression du mélanome (*Sinicrope & al, 2008*), au même titre que celle d'Apaf-1 (*Fujimoto & al, 2004*). Ainsi, ces données expérimentales mettent en évidence l'implication des membres de la famille Bcl-2 dans la progression des tumeurs.

L'altération de l'expression des **caspases** dans les cellules tumorales participerait également à l'évolution des tumeurs. Comparativement aux cellules normales, la caspase-3 est surexprimée dans certains cancers, tel le neuroblastome, alors qu'elle est sous-exprimée dans les carcinomes hépatocellulaires. Certaines études démontrent que le taux élevé de caspase-3 peut être un marqueur de bon pronostic comme dans les cancers NSCLC (*Volm & al, 2000 ; Koomagi & al, 2000*), alors que dans une étude *in vitro* de l'activité de la caspase-3, un taux élevé de cette dernière corrèle avec un mauvais pronostic dans les carcinomes colorectaux (*Jonges & al, 2001*). De plus, la sous-expression concomitante de la caspase-3 et de PTEN semble un déterminant important dans la progression des lymphomes gastriques malins primaires (*Isobe & al, 2004*). De manière intéressante, une surexpression de la pro-caspase-3 est inversement corrélée à la formation de métastases ganglionnaires de lymphome gastrique et de cancers NSCLC (*Koomagi & al, 2000 ; Isobe & al, 2004*). Le statut de la caspase-8 dans les cellules de neuroblastomes montre que sa perte d'expression apparaît durant la formation des métastases *in vivo* (*Stupack & al, 2006*). La méthylation du gène de la caspase-8 est associée à la présence de métastases de neuroblastomes (*MacKee & al, 2006*).

L'expression et/ou la fonction des **IAPs** est dérégulée dans plusieurs cancers humains et leurs taux d'expression dans les échantillons tumoraux sont corrélés aux paramètres cliniques et au pronostic. Par exemple, la survivine est surexprimée dans la majorité des cancers, contrairement aux tissus sains adultes où son expression est faible voir indétectable. Des taux élevés de survivine dans les neuroblastomes primaires corrént avec des tumeurs à haut risque et de mauvais pronostic (*Islam & al, 2000*). De même, un taux élevé de survivine reflète d'un mauvais pronostic dans les leucémies myéloïdes aiguës et les lymphomes non hodgkiniens (*Schlette & al, 2004*). L'expression anormale de cIAP2 résulte de translocations chromosomiques. Par exemple, la translocation t(11;18)(q21;q21) affecte cIAP2 dans nombreux lymphomes de type MALT (*Dierlamm & al, 1999*). Cette translocation mène à la fusion des domaines BIR de cIAP2 avec la protéine MALT1, une paracaspase et un médiateur crucial de l'activation de NFκB déclenchée par le récepteur des cellules T. Récemment il a été montré que la protéine de fusion cIAP2-MALT1 active de manière constitutive la voie NFκB, indépendamment des protéines adaptatrices de la signalisation (*Valfolomeev & al, 2006*). Il est à noter que l'expression de cIAP1, cIAP2 et de la survivine discrimine différents types de maladies lymphoïdes (*De Graaf & al, 2005*). Une dérégulation de l'expression de XIAP est observée dans divers cancers mais en ce qui concerne sa valeur pronostic, les données sont contradictoires.

Enfin, des altérations dans la voie apoptotique extrinsèque contribueraient en la résistance à l'apoptose de certains cancers. En effet, l'expression du récepteur **Fas/CD95** est réduite ou parfois perdue dans les carcinomes du colon (*Moller & al, 1994*). Son absence favorise l'échappement des cellules tumorales à leur destruction immunitaire. De plus, **c-FLIP** peut être surexprimé dans certains cancers comme les cancers du colon où il protège les cellules cancéreuses de l'apoptose induite par les cellules T cytotoxiques *in vivo* (*Medema & al, 1999 ; Zhou & al, 2005*).

Un défaut d'apoptose, et par conséquent la résistance à l'apoptose, est non seulement impliqué dans le déclenchement, dans la progression des tumeurs, mais aussi dans la formation des métastases bien que les mécanismes nécessitent d'être davantage étudiés.

III- Arguments en faveur de l'implication d'une résistance à l'apoptose dans la résistance des cancers aux traitements : exemple du cancer du poumon.

Les chimio- et radio- thérapies représentent les meilleures armes pour éliminer les cellules tumorales de l'organisme. Néanmoins de nombreuses tumeurs, en particulier les tumeurs solides, présentent une résistance aux traitements. La compréhension des mécanismes qui sous-tendent cette résistance est donc fondamentale dans la recherche biomédicale. Parmi les facteurs affectant la sensibilité aux drogues, il est à citer les mécanismes qui limitent la quantité de médicaments accédant à la tumeur, mais également ceux qui affectent l'environnement tumoral. La résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie peut apparaître à plusieurs niveaux : un efflux majoré des molécules et un influx réduit, une inactivation de la drogue, des altérations des cibles thérapeutiques, le processus de dommages induits par le médicament, et l'échappement à l'apoptose.

Un certain nombre d'arguments définissent la résistance à l'apoptose comme un point crucial dans l'échec aux traitements anticancéreux. Une meilleure connaissance de ces mécanismes pourrait contribuer en l'élaboration de nouvelles stratégies à visée thérapeutique. Par exemple, la méthylation du gène de la caspase-8, responsable de la résistance aux agents anticancéreux, est décrite dans certaines lignées de cancers du poumon ou de neuroblastomes (*Joseph & al, 1999 ; Fulda & al, 2001*). Ainsi, le traitement des SCLC avec des agents déméthylants tels que la 5-dAzaC, restaure l'activité apoptotique de ces cellules. Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 jouent un rôle majeur dans la résistance des cellules à l'apoptose induite par les agents anticancéreux (*Decaudin & al, 1998 ; Coultas & al, 2003*). L'inhibition de ces protéines constitue une voie de recherche prometteuse. En effet, interférer avec les composants de la machinerie apoptotique permettrait de restaurer la sensibilité des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques. Les stratégies actuellement disponibles ciblant les voies apoptotiques seront détaillées au chapitre IV.

Il est dorénavant acquis que la plupart des agents anticancéreux induisent l'apoptose, et l'inhibition intrinsèque des programmes apoptotiques réduit la sensibilité des cellules tumorales aux traitements anticancéreux. Pourtant la sensibilité à l'apoptose de cellules tumorales isolées n'est pas toujours corrélée à la sensibilité de la tumeur toute entière au

traitement antinéoplasique (*Okada & al, 2004*). Par exemple, des mutations de TP53 ne sont pas toujours associées à une toxicité réduite des agents anticancéreux et la perte de p53 peut aussi accroître la mort cellulaire dans certaines conditions (*Hawkins & al, 1996 ; Vikhanskaya & al, 1998*). La surexpression de Bcl-2 n'augmente pas systématiquement la viabilité cellulaire après une chimiothérapie ou une radiothérapie. Elle peut simplement retarder l'apoptose chimio- ou radio-induite sans accroître significativement la survie du patient (*Lock & al, 1996 ; Kyprianou & al, 1997*).

Le traitement du cancer du poumon est fonction du type histologique et du stade de développement de la tumeur. Les SCLC font partie des tumeurs les plus chimio- et radio-sensibles. A l'inverse, le traitement des NSCLC est plus délicat. La chirurgie reste la thérapie privilégiée comme traitement des patients atteints de NSCLC au stade précoce. Pourtant, en dépit du succès de l'intervention, les résultats sont décevants : alors que la survie à 5 ans est de 67% pour les NSCLC de stade IA, elle n'est que de 23% pour les NSCLC de stade IIIA. L'échec de cette thérapie est principalement dû au développement à distance de métastases dans 60% des cas. En théorie, la combinaison de la chirurgie à la chimiothérapie doit conférer un avantage sur la survie, mais bien que ce protocole soit désormais un standard, les résultats sont loin d'être satisfaisants. En effet, les NSCLC sont résistants à la plupart des chimio- et radio- thérapies conventionnelles, et une réponse complète aux traitements est donc très rare. Les mécanismes de résistance aux traitements sont nombreux et dépendent des capacités cellulaires à la détoxification et/ou à la réparation des dommages de l'ADN (*Volm & Rittgen, 2000*).

Les NSCLC et les SCLC diffèrent dans leur sensibilité aux traitements par les radiations et par les agents chimiothérapeutiques, les SCLC étant nettement plus sensibles que les NSCLC, *in vitro* comme *in vivo*. Cette différence est principalement due à la capacité de chaque type tumoral à induire l'apoptose. L'étoposide et les γ -radiations, principaux traitements utilisés dans la thérapie du cancer du poumon, induisent des dommages de l'ADN et l'activation de la voie apoptotique des récepteurs de mort Fas. De manière intéressante, les NSCLC sont apparues résistantes à tous les traitements alors que les SCLC, qui pourtant n'expriment pas toujours la pro-caspase-8, sont sensibles à l'apoptose induite en réponse aux dommages de l'ADN mais pas à Fas. La libération mitochondriale du cytochrome-c et l'activation des caspases -9 puis -3 sont observées dans ces deux types de carcinomes. Néanmoins, le clivage

des substrats nucléaires de la caspase-3, telle la PARP ou le DFF45/ICAD, n'apparaît que dans les lignées de cellules de SCLC et non dans les lignées résistantes NSCLC. De manière concordante, la relocalisation nucléaire de la caspase-3 n'est observée que dans les SCLC. Ainsi, l'inhibition de l'apoptose surviendrait en aval des modifications mitochondriales mais en amont des modifications nucléaires (*Joseph & al, 2001*).

Malgré ces défaillances, la staurosporine (STS), un inhibiteur à large spectre des protéines kinases, induit la mort cellulaire des deux types de carcinomes, accompagnée de la libération de cytochrome-c, de l'activation des caspases effectrices et du clivage consécutif de leurs substrats nucléaires. Contrairement aux chimiothérapies et aux radiations, la STS induit des modifications mitochondriales suivies de la libération hors de la mitochondrie d'AIF et de sa translocation au noyau. Ainsi, deux voies de signalisation, dépendante et indépendante des caspases, coexistent. Dans les NSCLC, la voie apoptotique dépendante des caspases s'avère moins efficace, et la voie apoptotique caspases-indépendante AIF-dépendante contourne cette résistance (*Joseph & al, 2002*). La dysfonction mitochondriale est donc une étape importante dans la mort des cellules NSCLC résistantes aux traitements conventionnels. Par ailleurs, le processus apoptotique dans les cellules NSCLC est bloqué en aval des caspases et pourrait être la conséquence de l'inhibition par les IAPs de l'activation des caspases exécuteurs. En effet, les NSCLC expriment fortement les cIAP, tant au niveau du messager que de la protéine. A la différence, les SCLC expriment davantage XIAP. Suite au traitement à l'étoposide ou aux radiations ionisantes, les cIAP comme les IAPs, sont mitochondriales. Ces résultats indiquent que seules, les IAPs ne sont pas le facteur responsable de la chimiorésistance des NSCLC (*Ekedahl & al, 2002*).

Dans les cellules SCLC sensibles aux traitements, l'irradiation et le cisplatine conduisent à la modulation des facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak, à la dépolarisation de la membrane mitochondriale et à la fragmentation nucléaire, ce qui n'est pas retrouvé dans les cellules NSCLC. De plus, l'apoptose des SCLC induite par l'irradiation conduit à l'activation des voies MEKK1, JNK et p38. Comparativement, les NSCLC surexpriment JNK et p38. En outre, les NSCLC sont sensibles à la modulation de Bax et à l'apoptose induite par un mutant actif de MEKK1. Ces résultats indiquent que l'irradiation et le cisplatine modulent l'expression de Bax et induisent l'apoptose par des voies différentes (*Viktorsson & al, 2003*).

La surexpression de Smac potentialise l'apoptose en neutralisant les inhibiteurs endogènes de caspases, les IAPs. Le traitement à l'étoposide provoque l'accumulation cytosolique de Smac, la libération mitochondriale du cytochrome-c et la chute du $\Delta\Psi_m$. Ces événements comme l'apoptose nucléaire consécutive requièrent l'activation des caspases dans les cellules SCLC, contrairement aux cellules NSCLC. De façon inattendue, l'inhibition des caspases n'affecte pas la libération de Smac. Le co-traitement des cellules SCLC avec un peptide ciblant les IAPs potentialise l'apoptose induite par l'étoposide, tandis que la sous-expression de Smac n'influence ni l'activité de la caspase-3, ni les modifications morphologiques nucléaires, ni même la fragmentation nucléaire. Une déficience en Smac peut donc être compensée afin d'induire la mort des cellules cancéreuses. La translocation cytosolique de Smac endogène ne joue pas un rôle critique dans l'apoptose des carcinomes pulmonaires (*Bartling & al, 2004*).

Des inhibiteurs analogues de la STS plus spécifiques des kinases, tels que les composés PKC412 et Ro31-8220, ont été testés en tant que potentiel traitement. Dans les NSCLC, le Ro31-8220 n'induit pas l'apoptose ni seul ni en combinaison à l'étoposide. Le PKC412 seul n'induit que faiblement l'apoptose des cellules NSCLC U1810 mais potentialise la mort des cellules SCLC U1285. Cependant, le PKC412 induit la libération mitochondriale des protéines pro-apoptotiques et l'activation des caspases. Pourtant l'activation d'une voie apoptotique caspase-indépendante est essentielle à la mort cellulaire des NSCLC. Le PKC412 sensibilise aussi les cellules U1810 à l'apoptose induite par l'étoposide et les radiations γ . Le Ro31-8220 augmente le taux de phosphorylation de ERK et Akt dans les deux lignées cellulaires alors que la phosphorylation d'Akt est prévenue dans les cellules U1810. Le PKC412 se présente comme un outil efficace pour potentialiser l'efficacité de la thérapie des NSCLC (*Hemström & al, 2005*). L'apoptose des cellules de NSCLC U1810 induite par le PKC412 corrèle avec l'inhibition d'Akt et de ERK-1 et -2, suggérant l'implication de ces kinases dans la survie cellulaire. L'évaluation des inhibiteurs de PI3K, LY-294002 et Wortmannin, de l'activateur d'Akt Ro31-8220, de l'inhibiteur de MEK tel le PD98059 et le PKC412, a montré que les inhibiteurs de PI3K induisent une mort cellulaire apoptose-like dans les cellules U1810. Les cellules H157 sont résistantes aux inhibiteurs de PI3K/Akt. Le composé PD98059 a un effet sensibilisateur sur les cellules H157 en combinaison avec les inhibiteurs de PI3K et l'étoposide. Les données morphologiques indiquent que le LY-294002 et le PKC 412 induisent la mort cellulaire par le processus de catastrophe mitotique. Ainsi la sensibilisation des NSCLC par les inhibiteurs de PI3K implique une interaction entre la régulation du cycle cellulaire, la catastrophe mitotique et l'apoptose (*Hemström & al, 2005*).

Afin de comprendre les mécanismes qui sous-tendent la régulation aberrante de l'apoptose dans les cellules NSCL, notre équipe a évalué la contribution des deux voies apoptotiques mitochondriales caspases-dépendante et caspases-indépendante (AIF-dépendante) dans les cellules NSCLC traitées à la STS. Bien que l'induction de l'activité des caspases soit impliquée dans l'apoptose induite par la STS, les cellules U1810 peuvent subir une mort cellulaire indépendamment des caspases. Ces travaux ont permis de démontrer le rôle capital d'AIF dans la mort des cellules NSCLC dans un modèle où la transduction du signal apoptotique *via* la voie des caspases est compromise et ainsi où seule, elle ne permet pas l'induction de l'apoptose des cellules U1810 (Gallego & al, 2004).

Partie IV- Une nouvelle approche : le développement de molécules capables de cibler directement les acteurs de l'apoptose dans les cellules tumorales.

La majorité des agents anticancéreux conventionnels ou ciblés frappent une/des cible(s) primitive(s) de localisation nucléaire ou extranucléaire et induisent secondairement l'enclenchement du processus apoptotique. Des stratégies plus directes et plus sélectives visant à manipuler le processus apoptotique au cœur des cellules cancéreuses, ont émergé comme potentiel outil thérapeutique. Ainsi cibler directement les molécules apoptotiques et leurs régulateurs constitue un nouvel axe de recherche en cancérologie dans le but de contourner les résistances qui limitent l'efficacité des traitements conventionnels. Les différents acteurs du processus apoptotique constituent alors autant de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour stimuler et/ou activer l'apoptose dans les cellules tumorales. Il est alors concevable de cibler spécifiquement la voie apoptotique extrinsèque (récepteurs de mort) ou la voie intrinsèque mitochondriale.

I- Interférer avec la voie apoptotique extrinsèque : les récepteurs de mort comme cibles antitumorales.

Plusieurs arguments sont avancés en faveur de l'utilisation de la voie extrinsèque comme un cible attractive antitumorale : 1) les récepteurs pro-apoptotiques étant largement exprimés dans les cancers, les agonistes des récepteurs de mort peuvent ainsi avoir un large potentiel antitumoral. 2) Des oncogènes comme Myc ou Ras augmentent la sensibilité tumorale à la voie apoptotique extrinsèque, notamment en facilitant son « dialogue » avec la voie intrinsèque (*Nieminen & al, 2007*). 3) Les récepteurs de mort activent les caspases indépendamment de p53, proposant une stratégie pour tuer les cellules cancéreuses quel que soit leur statut p53.

Diverses stratégies ont été proposées pour interférer avec la voie apoptotique extrinsèque. Outre l'utilisation des ligands FasL et TNF α , une stratégie prometteuse consiste à

cibler les récepteurs TRAIL. Deux classes d'agonistes des récepteurs de mort ciblant TRAIL-R1 et/ou TRAIL-R2 ont été développées : le recombinant humain rhApo2L/TRAIL, une forme soluble optimisée du ligand Apo2L/TRAIL endogène, qui active les deux récepteurs, et les anticorps monoclonaux agonistes qui activent TRAIL-R1 ou TRAIL-R2. Une seconde approche consiste en l'utilisation d'anticorps monoclonaux (mAb) agonistes des récepteurs TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5. Plus récemment la possibilité de potentialiser l'apoptose des cellules cancéreuses a été envisagée en interférant avec les inhibiteurs des voies apoptotiques, en réduisant le taux d'expression des IAPs ou en augmentant les taux d'expression de Smac/DIABLO. Le tableau V résume ces différentes stratégies permettant d'interférer avec la voie des récepteurs de mort, en détaillant les cibles, les moyens de les cibler, les effets cellulaires entraînés et les éventuels essais cliniques en cours (pour revue *Ashkenazi A, 2008*).

Tableau V : Interférer avec la voie apoptotique extrinsèque : les cibles, leurs ligands, les effets cellulaires et les modèles d'études

Cible	Ligands	Effets <i>in vitro</i>	Etudes précliniques	Etudes cliniques	Références
TNF-R	TNF α	Toxicité (manque de spécificité) : hypotension, leucopénies, dysfonction hépatique, thrombose.	+ mais l'effet pro-inflammatoire du TNF α : entrave au développement clinique.	+ sarcomes des tissus mous et des mélanomes (succès)	<i>Grunhagen & al, 2006</i>
Fas	- Anticorps agoniste de Fas - FasL taggé avec un motif à Leu-zipper	Apoptose.	+ mais hépatotoxicité sévère dans les modèles animaux.	Inapplicable en clinique du fait d'une importante toxicité.	<i>Walczak, 1999</i>
	Protéine de fusion FasL - domaine collagène de ACRP30/adiponectine	Potentialisation des effets des drogues conventionnelles.	+ (meilleure tolérance).	-	<i>Holler & al, 2003</i>
TRAIL-R1/DR4 TRAIL-R2/DR5	Apo2L/TRAIL	Apoptose principalement dans les cellules tumorales.	+ mais toxicité pour les hépatocytes humaines.	-	<i>Nieminen & al, 2007</i>
	rhApo2L/TRAIL (forme soluble optimisée de Apo2L/TRAIL endogène)	Apoptose (cellules cancéreuses de colon, poumon, sein, SNC, reins, prostate, peau, leucémies)	Xénogreffes humaines de cancers du colon, poumon, pancréas, de myélome multiple, de lymphomes non hodgkiniens et de gliomes.	+ (phase I pour NSCLC et lymphomes non hodgkiniens).	<i>Hylander & al, 2005</i> <i>Daniel & al, 2007</i> <i>Fanale & al, 2007</i>

<p>TRAIL-R1</p> <p>TRAIL-R2</p>	<p>Anticorps monoclonaux agonistes :</p> <p>Mapatumumab, lexatumumab, Apomab, AMG655</p>	<p>Activité antitumorale</p> <p>Mapatumumab, Apomab</p>	<p>- Xénogreffes de tumeurs du colon ou du pancréas.</p> <p>- En association avec le carboplatine et le paclitaxel dans des xénogreffes de NSCLC.</p>	<p>+</p> <p>(phase I)</p>	<p><i>Tolcher & al, 2007</i></p> <p><i>Jin & al, 2008</i></p>
<p>IAPs</p>	<p>Oligonucléotides antisens, SiRNA</p> <p>⇒ sous-expression des IAPs</p>	<p>Potentialisation de l'apoptose chimio- et radio-induite dans les cancers de l'ovaire et les NSCLC.</p>	<p>+</p>	<p>-</p>	<p><i>Holcik & al, 2000</i></p> <p><i>Li & al, 2001</i></p>
	<p>Peptides Smac</p>	<p>Potentialisation de l'apoptose chimio-induite dans les cancers du sein, neuroblastomes, mélanomes et NSCLC.</p>	<p>+</p> <p>mais dégradation protéolytique rapide.</p>	<p>-</p>	<p><i>Fandy & al, 2008</i></p> <p><i>Petrucci & al, 2007</i></p>
	<p>« Smac mimetic » et tétrapeptides « cappés »</p>	<p>Activité antitumorale</p>	<p>+ (retard de croissance tumorale des xénogreffes de cancers du sein).</p>	<p>-</p>	<p><i>Sun & al, 2004</i></p>

II- Interférer avec la voie apoptotique intrinsèque : la mitochondrie comme cible thérapeutique.

La mitochondrie, au centre du processus apoptotique, représente une source importante de cibles moléculaires pour induire la mort des cellules tumorales. En particulier, les nombreuses protéines constituant le pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) ou associées à celui-ci, sont autant de cibles potentielles de différentes molécules synthétiques. De la même manière, la chaîne respiratoire et ses complexes, les canaux potassiques mitochondriaux, les lipides mitochondriaux et la matrice mitochondriale sont autant de cibles potentielles pour de nouveaux agents anticancéreux. Parmi ces nouvelles stratégies visant à interférer avec la voie apoptotique mitochondriale, il est à citer les diverses stratégies ciblant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. En effet, le ratio entre les taux de protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 s'avère un important facteur régulateur préjugant de l'intégrité mitochondriale. Il régule la sensibilité des cellules aux stimuli apoptotiques. Les membres de la famille de Bcl-2 ont donc été considérés comme de potentielles cibles thérapeutiques pour le traitement de maladies où l'apoptose est dérégulée et plusieurs approches ont été développées pour interférer avec les membres de la famille Bcl-2.

Le tableau VI récapitule les cibles mitochondriales et leurs ligands actuels permettant d'interférer avec la signalisation apoptotique mitochondriale. Parmi ces cibles, il est à citer les composants du pore de transition de perméabilité mitochondriale (ANT, VDAC, PBR, Hexokinase), les membres de la famille Bcl-2, les lipides mitochondriaux, la matrice mitochondriale, les canaux potassiques mitochondriaux, la chaîne respiratoire mitochondriale.

Tableau VI : Interférer avec la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale

Cible	Ligands	Effets in vitro	Etudes précliniques	Etudes cliniques	Références
ANT	Lonidamine (dérivé dichloré de l'acide indazole-3-carboxylique)	- Ouverture du MPTP. - Potentialisation de la réponse apoptotique au cisplatine, doxorubicine, paclitaxel, cyclophosphamide, melphalan, irradiations γ .	+	+ Phase III (cancers du sein, ovaire, poumon et adénomes prostatiques)	<i>Ravagnan & al, 1999</i> <i>Belzacq & al, 2001</i>
	Arsenic trioxyde (TRISENOX) Sel inorganique trivalent dérivé du trioxyde d'arsenic	- Ouverture du MPTP. - Inhibition VDAC (altération de la phosphorylation oxydative et production de ROS).	+	+ Phase II (myélomes multiples +/- acide ascorbique pour les formes résistantes)	<i>Belzacq & al, 2001</i> <i>Zheng & al, 2004</i>
	CD437 (acide naphthalène carboxylique) rétinoloïde de synthèse agoniste du récepteur RAR γ	- Ouverture du MPTP. - Liaison au récepteur orphelin TR3/nur77/Nerve (translocation à la mitochondrie de TR3).	+	-	<i>Marchetti & al, 1999</i> <i>Belzacq & al, 2001</i>
	Acide bétulinique (Triterpénoïde pentacyclique naturel)	- Ouverture du MPTP, production de ROS. - Effets anti-angiogéniques liés aux dommages mitochondriaux. - Inhibition de la topoisomérase-I.	+	+ phase I/II	<i>Fulda, 2009</i>
	2CdA 2chloro-2'-deoxyadenosine , CaFdA 2-chloro-2'-arafluorodeoxyadenosine	Perturbation de l'intégrité mitochondriale \Rightarrow MPTP.	+	Traitement des maladies lymphoprolifératives	<i>Klopfer & al, 2004</i>
	Polypeptides : PAO diamide, GSAO	TP suite à l'oxydation des résidus de cystéine de l'ANT.	+ Inhibition de l'angiogénèse	-	<i>Costantini & al, 2000</i> <i>McStay & al, 2002</i> <i>Don & al, 2003</i>
	MT-21	Dissociation du complexe ANT/CyD.		-	<i>Machida & al, 2002</i>
	Vpr (peptide naturel issu de virus HIV1) TEAM-VP (peptide chimérique)	- Formation avec l'ANT de canaux de forte conductance, Perméabilisation MMI et MME - Effet indirect sur la mitochondrie via \uparrow caspase-9 et \downarrow NF κ B.	+	-	<i>Moon & Yang, 2006</i>

VDAC	Avicines	- Ciblage et fermeture de VDAC \Rightarrow \downarrow [ATP] _i et taux de consommation en O ₂ . - Activation de l'ubiquitine ligase E3 (dégradation de HSP70 et XIAP).	+	-	<i>Haridas & al, 2007</i>
	dérivés de la furanonaphtoquinone FNQ	Voie apoptotique caspase-dépendante <i>via</i> une production de ROS NADH-dépendante par l'intermédiaire de VDAC.	+	-	<i>Simamura & al, 2006</i>
	Paclitaxel	TP impliquant VDAC associé avec la tubuline mitochondriale.	+	Classiquement utilisé	<i>Carre & al, 2002</i>
PBR	PK11195 (isoquinoline carboxamide) Antagoniste du PBR	- Apoptose indépendante de la TP mais dépendante d'un stress oxydatif. - Blocage de l'efflux des drogues par la Pgp \Rightarrow augmentation de l'efficacité de nombreux agents chimiothérapeutiques. - à μ M : conséquence de l'inhibition de la F1/F0-ATPase.	+	-	<i>Hirsch & al, 1998</i> <i>Maaser & al, 2005</i> <i>Walter & al, 2005</i> <i>Gonzalez-Polo & al, 2005</i> <i>Cleary & al, 2007</i>
	RO5-4865 (Ligand synthétique)	Effet potentialisateur de l'apoptose induite par de nombreuses chimiothérapies conventionnelles.	+	-	<i>Decaudin & al, 1998-2002</i>
Hexokinase (HK)	2-Déoxyglucose (2-DG)	- Inhibition compétitive de l'activité de HK, diminution de son association à la mitochondrie. - Glyc-N-acylation anormale des protéines.	+	+ seul / associé (docétaxel)	<i>Kang & al, 2006</i>
	Lonidamine	Effet sur le métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses.	+	Phase III (cancers du sein, ovaire, poumon et adénomes prostatiques).	<i>Ravagnan & al, 1999</i> <i>Belzacq & al, 2001</i>
	3-Bromopyruvate	Alkylation des groupements sulfhydryle de HK \Rightarrow inhibition de la glycolyse.	+	+	
	Methyl-jasmonates	Rupture de la liaison HK - VDAC \Rightarrow dissociation de HK de la mitochondrie.	+	-	<i>Goldin & al, 2008</i>

Bcl-2	Oligonucléotides Antisens : Oblimersen ou Genasense	Blocage de l'expression de Bcl-2.	+	+	Phase III (LLC, mélanome métastatique, myélome).	<i>Jansen & al, 1998</i> <i>Letai, 2005</i> <i>Labi & al, 2008</i>
	« BH3-mimétique » naturelle : (-)Gossipol	Liaison à Bcl-2 et Bcl-xl.	+	+	Phase I / II (sein métastatique résistant, glioblastome).	<i>Kitada & al, 2003</i> <i>Xu & al, 2005</i> <i>Van Poznak & al, 2001</i>
	ABT-737	- Inhibiteur Bcl-2 et Bcl-xl. - Cytotoxicité synergique avec les radio- et chimio-thérapies conventionnelles. - Perméabilisation des MME et MMI.	+	+	(lymphomes, NSCLC, LLC).	<i>Oltersdorf & al, 2005</i> <i>Vogler & al, 2008</i>
	« BH3-mimétique » 072RB	Localisation mitochondriale.	+	-	(AML).	<i>Ponassi & al, 2008</i>
	Peptide NuBCP-9	Convertisseur de Bcl-2 en une molécule pro-apoptotique en se liant à la boucle entre le BH3 et le BH4 ⇒ « switch moléculaire ».	+	-		<i>Kolluri & al, 2008</i>
Lipides mitochondriaux	Avicines-D et -G	Formation de canaux au niveau de la MME.	+	-		<i>Li & al, 2005</i>
	Acide glycohenodesoxycholique	Altération de la fluidité et de la polarité des membranes mitochondriales.	-	-		<i>Sola et al, 2002</i>
Matrice mitochondriale	Rhodamine 123 et dérivés TMRM/TMRE	- En recherche fondamentale (évaluation en cytométrie en flux des variations de $\Delta\Psi_m$). - Activités anticancéreuses dues à son effet inhibiteur de la F0-F1 ATPase.	-	-		<i>Modica-Napolitano & Aprile, 2001</i>
	MKT-077 dérivé cationique de type rhodacyanine	- Déplétion de l'ADNmt. - Diminution de l'activité de la succinate-cytochrome-c réductase et de la cytochrome-c oxydase.	+		Phase I arrêtée pour toxicité rénale.	<i>Propper et al, 1999</i>
	Sels d'isoindolylalkyl phosphonium	- Significative activité anti-leucémique. - Accumulation sélective dans les mitochondries énergisées.			évaluation comme potentiels agents de contraste pour la détection, le diagnostic et le suivi thérapeutique des cancers.	<i>Min & al, 2004,</i> <i>Madar & al, 2007</i> <i>Wang & al, 2007</i>

	Tacrine tetrahydroaminoacridine	- Poison des topoisomérases I et II, Inhibiteur de l'ADN polymérase- γ . - Intercalant de l'ADNmt \Rightarrow déplétion en ADNmt et stress génotoxique \Rightarrow TP.	+	Traitement de la maladie d'Alzheimer	<i>Mansouri et al, 2003</i>
Canaux K⁺ mitochondriaux	diazoxide, cromakalime et analogues EMD-60480 et EMD-57970	Ouvreurs de canaux K _{ATP} mitochondriaux et de la membrane plasmique.	+	-	<i>Garlid & al, 1996</i>
	Minoxidil, NS004 et NS1619	Ouvreurs des canaux potassiques mitochondriaux (K ⁺ _{mt}).	+	-	<i>Debska & al, 2003</i>
	Déqualinium et l'amiodarone	Bloqueurs des canaux K ⁺ _{mt} \Rightarrow inhibition de la prolifération (cancer du sein).	+	-	<i>Abdul & al, 2003</i>
	Glibenclamide	Bloqueur des canaux K _{ATP} , effet antitumoral sur la lignée cellulaire de cancer gastrique humain MGC-803 <i>via</i> la voie ROS- JNK.	+	-	<i>Qian & al, 2008</i>
	Benzothiadiazine dioxazide	Perturbation du transport mitochondrial du K ⁺ _{mt} (Arrêt des cellules T leucémiques en phase G0/G1 du cycle cellulaire).	-	-	<i>Holmuamedov & al, 2002</i>
CRM	Acétogénines <i>annonaceae</i> (ACG) et dérivés	- Inhibition du transport des électrons au niveau du complexe I de la CRM - dérivés semi-synthétiques : inhibition de la croissance des cellules cancéreuses mammaires, pulmonaires, hépatiques et de colon humaines.	+	-	<i>Chahboune & al, 2006</i>
Cible mitochondriale non clairement définie	N-méthylpyridinium ou F16	- Inducteur de TP. - Effet mitochondriotoxique à l'origine de l'apoptose ou la nécrose selon le profil génétique des cellules cancéreuses ciblées.	+ xénogreffes tumeurs mammaires surexprimant erb-2/neu, c-myc, v-Ha-ras)	-	<i>Fantin & Leder, 2004</i>
	Mastoparan (petit peptide isolé du venin de guêpe) & le peptide (KLAKLAK) ₂	Inducteur de TP <i>via</i> son interaction avec VDAC par un mécanisme régulé par la CyD.	+ xénogreffes de tumeurs mammaires surexprimant HER-2	-	<i>Pfeiffer & al, 1995</i> <i>Ellerby & al, 1999</i> <i>Fantin & al, 2005</i>

De part sa place centrale dans le processus apoptotique, la mitochondrie se présente comme une cible attractive pour induire l'apoptose en s'affranchissant de la signalisation en amont souvent sujette aux mutations ou déficiences dans les cellules cancéreuses à l'origine de leur résistance aux traitements. Plusieurs agents pharmacologiques structurellement différents montrent des effets directs sur l'ultra-structure et les fonctions mitochondriales, agissant en des sites mitochondriaux spécifiques (figure 15).

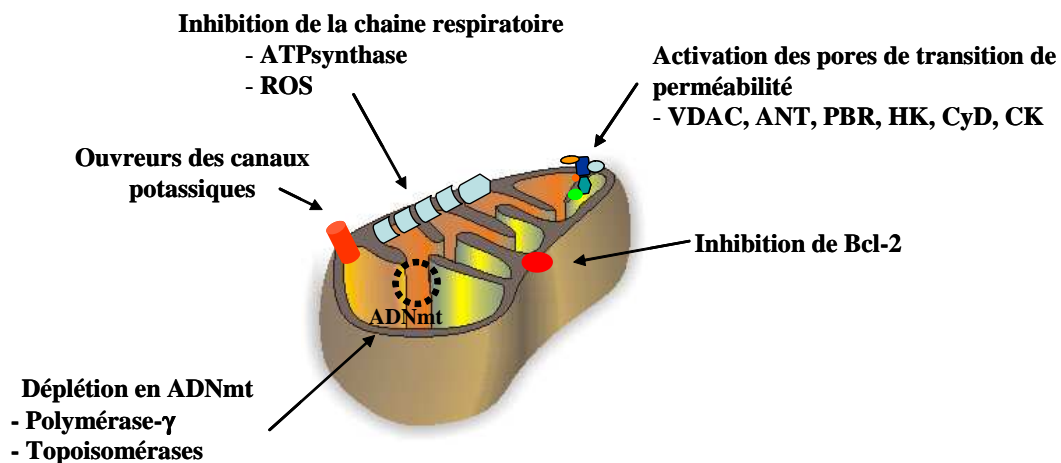


Figure 15 : Illustration schématique des sites d'action des drogues ciblant la mitochondrie (D'après Dias, 2005).

Ainsi, cibler la mitochondrie, et par conséquent activer directement la voie apoptotique intrinsèque, se présente comme une stratégie prometteuse pour l'élimination des cellules cancéreuses, permettant de contourner les résistances à l'apoptose des cellules cancéreuses.

Partie V- Les chimiothérapies du futur seront-elles d'origine naturelle ? L'exemple des Lamellarines.

La biodiversité représente un potentiel considérable comme source de nouveaux médicaments. Les substances naturelles constituent la plus importante source de drogues et de molécules chefs de file « *lead* » de la pharmacopée antitumorale. Au cours des cinquante dernières années, les nouveaux principes actifs anticancéreux commercialisés aux USA sont à plus de 50% d'origine naturelle (*Newman & Cragg, 2007*). Ainsi la découverte des substances naturelles anticancéreuses a ouvert la route aux principaux agents cytotoxiques parmi lesquels nombreux ont été isolés de plantes (étoposide, vinblastine, vinorelbine, topotécan, docétaxel, ...) et de microorganismes (doxorubicine, bléomycine, daunorubicine, épiburicine) (*Bailly, 2009*). Pourtant, ces dernières années l'intérêt des groupes pharmaceutiques pour les produits naturels a connu un certain déclin au profit de l'avancée des petites molécules synthétiques (en particulier les inhibiteurs de kinases imatinib (Gleevec®), dasatinib (Sprycel®) ou nilotinib (Tasigna®)) et au développement des anticorps monoclonaux. L'accroissement des capacités du criblage à très haut débit, l'incertitude juridique concernant l'accès à la biodiversité et l'arrivée de la chimie combinatoire ont probablement contribué à détourner certains groupes pharmaceutiques de ce domaine. Ainsi, depuis la mise sur le marché de l'irinotécan et du docétaxel en 1996, il aura fallu attendre plus de 10 ans pour qu'une nouvelle substance naturelle rentre à nouveau en essai clinique. C'est sans doute grâce à l'apparition de techniques robotisées d'évaluation de l'activité pharmacologique que la recherche dans le domaine des substances naturelles a été relancée. C'est ainsi qu'en 2007, les médicaments anticancéreux d'origine naturels réapparaissent avec le développement clinique de trois molécules innovantes : l'ixabepilone, le temsirolimus et la trabectedine. L'ixabepilone (BMS-247550 ; Ixempra® ; Bristol Myers Squibb) est un agent anti-microtubulaire nettement mieux toléré que les agents traditionnels ciblant le système des microtubules (alcaloïdes du Vinca, Taxanes) et actif dans des cas de résistance aux médicaments traditionnels (*Bollag & al, 1995 ; Fornier, 2007 ; Lee & al, 2008 et 2009*). Le temsirolimus (CGI-779 ou Torisel®, Wyeth) est le premier inhibiteur naturel de la kinase mTOR (*Ma, 2007*). La trabectedine (Ecteinascidine-743 ; Yondelis® ; PharmaMar) est un alcaloïde tétrahydroisoquinolinone isolé d'un tunicier des mers des Caraïbes *Ecteinascidia turbinata*. Cet agent alkylant du petit sillon de l'ADN cible préférentiellement les guanines en position N2 et génère au sein de la double hélice des adduits spécifiques qui constituent un obstacle à la machinerie de réparation

de l'ADN (Soares & al, 2007 ; Carter & al, 2007). L'entrée de ces trois molécules emblématiques relance ainsi l'engouement des groupes pharmaceutiques pour les substances naturelles.

A côté des ressources terrestres largement exploitées, le monde marin constitue une source nouvelle pour la découverte de substances antitumorales inédites. La mer abrite diverses formes de vie qui constituent un réservoir potentiel pour produire des médicaments. Le milieu marin se révèle être une source inépuisable de métabolites possédant une grande diversité structurale allant de simples peptides linéaires à des polyethers macrocycliques complexes et ayant des activités biologiques intéressantes (Bourguet-kondracki & al, 2005 ; Simmons & al, 2005). Seule la composition chimique de 1% des espèces marines à ce jour répertoriées a été analysée, mais chaque année, plusieurs centaines de nouveaux composés marins sont décrits, certains présentant des activités antitumorales. Ainsi de nombreux espoirs sont portés sur ces produits naturels marins en tant qu'agents anticancéreux. Une drogue d'origine marine, la Cytarabine, est couramment utilisée en thérapie antitumorale et une douzaine de nouvelles drogues sont des candidats prometteurs en tant qu'agents anticancéreux actuellement en essais cliniques. Ainsi, la Didemnine fut le premier peptide marin entré en essai clinique pour le traitement de cancers humains. Depuis, l'Ecteinascidine 743 (Yondelis®), la Dehydrodidemnine B (Aplidine®), la Bryostatin-1, la Dolastatine, la Ziconotide (Prialt®), le Discodermolide sont parmi les composés les plus avancés (Singh & al, 2008). Il est à noter que d'autres molécules d'origine marine sont utilisées comme outils pharmacologiques pour l'étude de la biologie cellulaire, tels que l'acide okadaïque, l'acide kainique, la latrunculine, la tetrodotoxine, ou encore la saxitoxine.

De par leurs capacités à se défendre en sécrétant diverses substances toxiques qui ne sont pas élaborées par les organismes terrestres, ces organismes marins détiennent une niche d'informations et recèlent un grand potentiel pour la recherche contre le cancer (Nagle & al, 2004). Aussi l'apparition de tumeurs cancéreuses n'a encore jamais été observée chez les ascidies et les requins. Ce n'est donc pas par hasard que les ascidies sont étudiées de manière très intense et que plusieurs molécules issues de ces organismes font l'objet d'importantes recherches. En étudiant les effets des substances extraites des ascidies, les propriétés antitumorales et également antivirales des Lamellarines ont été observées. Les Lamellarines constituent une famille d'alcaloïdes pyrroliques hexacycliques d'origine marine (Andersen & al, 1985 ; Bailly, 2004). Elles sont considérées comme des métabolites secondaires dérivés

d'acides aminés tyrosine et DOPA, précurseurs putatifs dans la biogenèse de nombreuses substances bioactives. C'est le mollusque prosobranch *Lamellaria sp.* (Andersen & al, 1985), (famille des *Lamellariidae*) qui a donné son nom à cette série et à partir duquel les quatre premiers dérivés, les Lamellarines A, B, C et D, ont été isolés en 1985. En fait, ces molécules ont pour véritable origine les ascidies qui constituent le régime alimentaire du mollusque. A ce jour, plus d'une quarantaine de Lamellarines (nommées de A à Z, et α - γ) ont été décrites (Bailly, 2004 ; Fan & al, 2004).

Suite à la découverte de potentielles activités antiprolifératives (Quesada & al, 1996 ; Ishibashi, 2002), leurs activités biologiques ont été testées. Certaines Lamellarines et dérivés (telle la storniamide) inhibent la résistance multiple aux drogues (MDR) causée par les glycoprotéines-P (Quesada & al, 1996). Par exemple, la Lamellarine-I inhibe les pompes Pgp et restaure la toxicité de la doxorubicine, daunorubicine ou vinblastine dans des cellules MDR. A l'inverse, d'autres Lamellarines telles les Lamellarines-K et -M sont des composés hautement cytotoxiques. Plus particulièrement, les Lamellarines-D (figure 16) possèdent d'intéressantes propriétés cytotoxiques vis-à-vis d'un large panel de cellules tumorales (Facompré & al, 2003). Pour cette raison, la conception d'analogues synthétiques de ces substances naturelles a conduit à l'identification de quelques molécules à activité antitumorale sur des modèles de xénogreffes *in vivo* (Marco & al, 2005 ; Lubber-Narod & al 2005 ; Nagle & al, 2004).

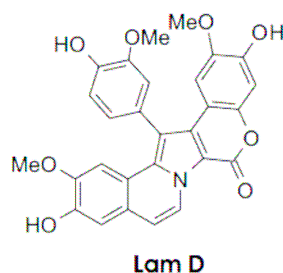


Figure 16 : Structure de la Lamellarine-D.

Les connaissances sur les effets antitumoraux des Lamellarines sont pour la plupart récentes et concernent uniquement la Lam-D et/ou ses dérivés synthétiques (Bailly, 2004 ; Facompré & al 2003 ; Vanhyuse & al, 2005 ; Tardy & al, 2004 ; Kluza & al, 2006). Quelques analogues synthétiques ont été sélectionnés comme candidats médicaments sur la base de leur efficacité antitumorale *in vivo* envers divers modèles de xénogreffes de tumeurs humaines, et de leurs profils ADME acceptables (Lubber-Narod & al, 2005 ; Elices, 2005). Parmi ces candidats, le

dérivé aminé de la Lam-D, le PM031379 (PharmaMar) a révélé une faible toxicité à l'égard des cellules non tumorales (*Luber-Narod & al, 2005*) et dispose d'une puissante activité antitumorale dans un modèle murin de xéno greffe de tumeur humaine de colon *in vivo* (*Elices, 2005*). Cependant, si les cytotoxicités sont connues, les mécanismes d'action restent à élucider.

Tout comme de nombreux autres agents anticancéreux (*Marchetti & al, 2002*), la Lamellarine-D et son dérivé synthétique le PM031379 tuent les cellules tumorales par apoptose (*Vanhuysse & al, 2005 ; Kluza & al, 2006*). De manière intéressante, l'apoptose induite par Lam-D est rapide et insensible aux mécanismes d'efflux par la glycoprotéine-P (*Vanhuysse & al, 2005*). Ces effets pro-apoptotiques sont principalement observés à fortes concentrations de l'ordre du micromolaire, concentrations compatibles avec les doses de PM031379 utilisées efficacement *in vivo* dans les modèles de xéno greffes (*Kluza & al, 2006*). Cependant, à plus faibles concentrations (de l'ordre du nanomolaire), la Lam-D n'est pas inefficace puisqu'elle conduit à une inhibition de la prolifération et un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (*Kluza & al, 2006*). Ces résultats suggèrent l'existence de plusieurs cibles cellulaires responsables de différents effets antitumoraux.

Depuis 2002, le groupe de C. Bailly s'est intéressé à comprendre quelles pouvaient être les cibles des Lamellarines. Ainsi, le groupe de C. Bailly a identifié la Lam-D en tant que poison de la topoisomérase-1 nucléaire *in vitro*, définissant ainsi les topoisomérases-1 comme une cible des Lamellarines responsable de leur effet antitumoral (*Facompré & al, 2003*). Les relations structure-activité précises ont été délimitées dans la série de la Lam-D (*Tardy & al, 2004*) et certains déterminants moléculaires clé responsables de son effet poison de la topoisomérase-1 et de sa cytotoxicité ont pu être identifiés, facilitant ainsi la conception de nouveaux analogues synthétiques développés en tant qu'agents anticancéreux (*Marco & al, 2005*). Cependant, il a été constaté que la Lam-D maintenait une toxicité significative envers des lignées résistantes à la camptothécine, inhibiteur de référence de la topoisomérase-1 (*Facompré & al, 2003 ; Vanhuysse & al, 2005 ; Marco & al, 2005*). Cette constatation a mené à s'interroger quant au mécanisme moléculaire responsable de la mort des cellules tumorales induite par la Lam-D. En effet, ces données suggèrent que la topoisomérase-1 n'est pas la principale cible impliquée dans l'induction du processus apoptotique par la Lam-D. En 2006, en collaboration avec notre équipe, J. Kluza a découvert que la Lam-D et le PM031379, un de ses dérivés de synthèse particulièrement actif *in vivo*, étaient capables de perméabiliser

directement les mitochondries et ainsi d'enclencher l'apoptose de lignées leucémiques *via* la voie intrinsèque mitochondriale (Kluza & al, 2006). Ainsi la topoisomérase-1 nucléaire n'est pas l'unique cible cellulaire de la Lam-D (Kluza & al, 2006). La Lam-D requiert la mitochondrie pour induire l'apoptose nucléaire, *via* un mécanisme apparenté à la transition de perméabilité mitochondriale car 1) la Lam-D maintient une cytotoxicité marquée envers des lignées cellulaires résistantes au poison de référence de la topoisomérase-1 nucléaire, la camptothécine (CPT) (Facompré & al, 2003 ; Marco & al, 2005) ; 2) à la différence de la CPT, la Lam-D induit une chute précoce du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) dans les cellules leucémiques, 3) la Lam-D perméabilise directement les mitochondries isolées de cellules cancéreuses (Kluza & al, 2006) ; 4) dans un système acellulaire d'apoptose, seules les mitochondries traitées par la Lam-D peuvent induire l'apoptose de noyaux isolés ; 5) les altérations mitochondriales fonctionnelles et structurales comme l'apoptose nucléaire induites par la Lam-D sont largement prévenues par la Cyclosporine-A, un inhibiteur de la transition de la perméabilité mitochondriale, et non par l'inhibiteur à large spectre des caspases, le Z-VAD-fmk. Ainsi, l'ensemble de ces travaux ont permis de distinguer au moins 2 cibles de la Lam-D : la topoisomérase-1 nucléaire et la mitochondrie.

Récemment, l'équipe de Méijer définit une nouvelle cible intracellulaire des Lamellarines (Baunbaeck & al, 2008). Les Lamellarines ciblent plusieurs protéines kinases relevantes pour le cancer. Elles inhibent efficacement l'activité catalytique de certaines kinases parmi lesquelles le couple CDK1/cycline B (essentiel à la transition G1/S et G2/M du cycle cellulaire), le couple CDK5/p25, la GSK3 α/β , PIM1 (surexprimée dans les cancers de la prostate), DYRK1A et CDK1. Les auteurs démontrent la contribution de l'inhibition de ces kinases dans les propriétés antitumorales des 22 Lamellarines testées. En effet, les Lamellarines inactives sur les kinases sont dépourvues d'effet inducteur de mort cellulaire. L'inhibition des kinases pourrait ainsi contribuer aux effets des Lamellarines sur la prolifération cellulaire et l'apoptose.

OBJECTIFS

OBJECTIFS DU TRAVAIL.

Ainsi, à la lumière des connaissances actuelles, les Lamellarines se présentent comme des candidats médicaments anticancéreux prometteurs, et constituent également de véritables outils pharmacologiques pour disséquer les voies de signalisation apoptotique. En conséquence, j'ai entrepris la poursuite du travail initié au laboratoire quelques années plus tôt, à la découverte des mécanismes moléculaires responsables des effets pro-apoptotiques des Lamellarines avec 2 objectifs principaux :

- Comprendre les mécanismes pro-apoptotiques déclenchés par les Lamellarines dans des cellules tumorales résistantes à l'induction thérapeutique d'apoptose (article 1).

Depuis plusieurs années, notre équipe en collaboration avec les laboratoires de B. Zhivotovsky et de B. Joseph (Karolinska Institutet, Sweden) a caractérisé une lignée de cellules de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) très résistante à l'induction de l'apoptose par les radio- et chimio- thérapies conventionnelles (*Joseph & al, 2001 ; Gallego & al, 2004*). En effet, cette lignée de NSCLC, les cellules U1810, présente une voie apoptotique caspase-dépendante partiellement défaillante, la rendant résistante à la plupart des traitements *in vitro* (*Joseph & al, 2001*). Néanmoins, la restauration de l'apoptose est possible dans ces cellules uniquement à travers l'activation d'une voie mitochondriale dépendante du facteur AIF (*Gallego & al, 2004*).

Puisque la Lam-D et le PM031379 possèdent une activité antitumorale nette *in vitro* comme *in vivo* sur de nombreux modèles cellulaires, il nous a paru opportun de tester ces molécules sur ce modèle de résistance tumorale à l'apoptose. Ainsi, nous avons comparé les voies de signalisation induites par la Lam-D et son dérivé le PM031379 au niveau nucléaire, mitochondrial et au niveau de l'activation des caspases dans la lignée de NSCLC, les U1810 (article 1).

- Evaluer la part respective de l'effet nucléaire inhibiteur de la topoisomérase-1 et de l'effet mitochondrial direct dans l'action pro-apoptotique des Lamellarines.

Puisque la Lam-D possède au moins deux cibles caractérisées, nous avons cherché à savoir quelle(s) cible(s) étai(en)t au minimum nécessaire(s) pour induire l'apoptose de cellules leucémiques. Nous avons ainsi évalué la contribution respective du noyau et de la mitochondrie dans l'apoptose induite par les Lamellarines. Les chemins moléculaires *via* lesquels la Lam-D provoque l'apoptose des cellules leucémiques et le rôle du noyau ont été étudiés (article 2).

RESULTATS

OVERCOMING CHEMORESISTANCE OF NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA THROUGH RESTORATION OF AN AIF DEPENDENT APOPTOTIC PATHWAY

Miguel-Angel Gallego^{1*}, Caroline Ballot^{1*}, Jérôme Kluza¹, Nabil Hajji³, Alain Martoriati¹, Laurent Castéra¹, Carmen Cuevas², Pierre Formstecher¹, Bertrand Joseph³, Guido Kroemer⁴, Christian Bailly^{1#} and Philippe Marchetti¹

¹INSERM U 837, Université Lille 2, Faculté de Médecine, IMPRT, Jean-Pierre Aubert Research Centre, Place de Verdun, 59045 Lille, France

²PharmaMar, Avda. de los Reyes,1, P.I. La Mina-Norte, E-28770 Colmenar Viejo, Madrid, Spain

³Institute of Environmental Medicine Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm, Sweden

⁴INSERM U848, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

* These authors contributed equally to this work.

Oncogene. 2008 Mar 27;27(14):1981-92.

Les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) sont classiquement résistants à l'apoptose induite par les chimiothérapies conventionnelles. Nous avons évalué les effets de deux agents anticancéreux potentiels de la famille des Lamellarines sur une lignée cellulaire hautement résistante à l'apoptose. L'alcaloïde marin la Lamellarine-D, et son dérivé synthétique aminé le PM031379 induisent tous deux l'activation de Bax, la libération mitochondriale du cytochrome-c et de l'Apoptosis-Inducing Factor (AIF), de même que l'activation de la caspase-3. Toutefois, seul le PM031379 engendre la mort cellulaire et les signes de l'apoptose nucléaire associée à la translocation nucléaire d'AIF. La déplétion d'AIF par siRNA et la micro-injection d'anticorps anti-AIF neutralisant préviennent largement la cytotoxicité induite par le PM031379, soulignant la contribution indispensable d'AIF pour tuer les cellules NSCLC. En utilisant des cellules NSCLC dépourvues d'ADN mitochondrial (cellules Rho0), nous avons montré que la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriales est capitale pour la translocation d'AIF induite par le PM031379 au noyau et consécutivement la mort cellulaire. Le prétraitement des cellules NSCLC avec la Ménadione, un générateur de ROS mitochondriaux, est capable de restaurer l'apoptose déficiente induite par les chimiothérapies dans les cellules NSCLC. L'ensemble de ses données suggère que la production de ROS mitochondriaux est cruciale pour surpasser la chimiorésistance des cellules NSCLC. Par ailleurs, cette étude souligne le mécanisme d'action original des Lamellarines en tant que potentiels agents anticancéreux.

ORIGINAL ARTICLE

Overcoming chemoresistance of non-small cell lung carcinoma through restoration of an AIF-dependent apoptotic pathwayM-A Gallego^{1,5}, C Ballot^{1,5}, J Kluza¹, N Hajji², A Martoriati¹, L Castéra¹, C Cuevas³, P Formstecher¹, B Joseph², G Kroemer⁴, C Bailly^{1,6} and P Marchetti¹¹INSERM U 837, Université Lille 2, Faculté de Médecine, Jean-Pierre Aubert Research Centre, Place de Verdun, Lille, France;²Institute of Environmental Medicine Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; ³PharmaMar, Avda. de los Reyes, 1,P.I. La Mina-Norte, E-28770 Colmenar Viejo, Madrid, Spain and ⁴INSERM U848, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Non-small cell lung carcinomas (NSCLCs) are typically resistant against apoptosis induced by standard chemotherapy. We evaluated the effects of the two potential antitumor agents of the lamellarin class on a highly apoptosis-resistant NSCLC cell line. Both the marine alkaloid lamellarin-D and its synthetic amino derivative PM031379 induced the activation of Bax, the mitochondrial release of cytochrome *c* and apoptosis-inducing factor (AIF), as well as the activation of caspase-3. However, only PM031379 triggered cell death and sign of nuclear apoptosis coupled to the nuclear translocation of AIF. Depletion of AIF with small interfering RNA or microinjection of a neutralizing anti-AIF antibody largely prevented PM031379-induced cytotoxicity, underscoring the essential contribution of AIF to NSCLC killing. Using NSCLC cells lacking mitochondrial DNA, we showed that the generation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) was crucial for the PM031379-induced translocation of AIF to the nucleus and subsequently cell death. Pretreatment of NSCLC cells with menadione, a mitochondrial ROS generator, was able to restore the deficient chemotherapy-induced apoptosis of NSCLC cells. Altogether, these data suggest that mitochondrial ROS generation is crucial for overriding the chemoresistance of NSCLC cells. Moreover, this study delineates the unique mechanism of action of lamellarins as potential anticancer agents.

Oncogene (2008) 27, 1981–1992; doi:10.1038/sj.onc.1210833; published online 1 October 2007

Keywords: apoptosis; mitochondria; chemotherapy

Introduction

Chemotherapy resistance represents a major problem for the treatment of patients with lung carcinomas. Among these resistance mechanisms, defects in the cell death machinery are supposed to play an important role (Zhivotovsky and Orrenius, 2003). Indeed, molecular modifications hindering programmed cell death such as increased expression of anti-apoptotic genes and/or mutations in the intrinsic apoptotic pathway participate in the resistance to anticancer treatment (Johnstone *et al.*, 2002). We previously demonstrated that the resistance of non-small cell lung carcinomas (NSCLCs) cells to conventional cytotoxic drugs can be explained by a defect that affects the post-mitochondrial phase of the apoptotic process (Joseph *et al.*, 2001; Gallego *et al.*, 2004). Despite this knowledge, a better understanding of signaling pathways in resistant cells is needed to overcome resistance and to reactivate their sensitivity to anticancer treatment.

Mitochondria are at the crossroads of apoptotic pathways induced by anticancer agents, at several levels. In response to apoptotic stimuli, the outer mitochondrial membrane is permeabilized, causing the release of proteins from the mitochondrial intermembrane space. Several intermembrane space proteins, notably cytochrome *c* (Cyt *c*) can trigger the activation of caspases. Other intermembrane space proteins can trigger caspase-independent apoptotic events. One of the most prominent caspase-independent death effector released from intermembrane space is apoptosis-inducing factor (AIF). To become fully effective as an apoptosis inducer, AIF is first released from mitochondria and then imported into the nucleus to induce chromatin condensation and DNA degradation (Galluzzi *et al.*, 2006). The action of AIF is critical for cell death induction by some anticancer agents. Thus, the depletion of AIF with small interfering RNAs (siRNAs) or the neutralization of AIF with micro-injected antibodies can inhibit the death of (i) neuroblastoma (Gabellini *et al.*, 2006), (ii) NSCLC cells responding to tyrosine kinase inhibitors (Gallego *et al.*, 2004), (iii) colon cancer cells responding to the non-steroidal anti-inflammatory drug sulindac (Park *et al.*, 2005b), (iv) cervical cancer cells treated with arsenic trioxide (Kang *et al.*, 2004b),

Correspondence: Professor P Marchetti, INSERM U 837, 1 Place de Verdun, Lille Cedex F-59045, France.

E-mail: philippe.marchetti@lille.inserm.fr

⁵These authors contributed equally to this work

⁶Current address: Institut de Recherche Pierre Fabre, 3 rue des satellites, 31432 Toulouse, France.

Received 11 May 2007; revised 12 July 2007; accepted 31 August 2007; published online 1 October 2007

(v) leukemia cells subjected to photodynamic therapy (Furre *et al.*, 2005) and (vi) prostate cancer cells exposed to titanocene drugs (O'Connor *et al.*, 2006). Furthermore, in highly resistant NSCLC cells where the caspase-dependent pathway is defective, activation of a caspase-independent, AIF-mediated mitochondrial signaling pathway restores NSCLC cell death (Gallego *et al.*, 2004) substantiating the importance of alternative (caspase-independent) mechanisms for effective cancer therapy. Likewise, it is worth noting that the resistance to radiation can be reversed through activation of nuclear translocation of AIF (Park *et al.*, 2005a).

In addition to the release of catabolic enzymes (or activator of such enzymes), mitochondria can contribute to cell death by affecting redox and bioenergetic equilibria. A variety of anticancer drugs trigger mitochondria to generate reactive oxygen species (ROS) that contribute to apoptotic signaling (Engel and Evens 2006). The apoptosis-associated ROS generation results from a dysfunction of the mitochondrial respiratory chain and/or an increase in mitochondrial membrane permeability. Elevated levels of ROS contribute to the cellular oxidation observed in late apoptosis. Then, ROS serve as intracellular second messengers that modulate the activation of numerous signaling pathways and/or the expression of pro-apoptotic genes. Moreover, ROS generation can also favor the mitochondrial permeability increase in a self-amplifying loop that contributes to locking the cell into an irreversible commitment to death.

An over-growing body of evidence indicates that mitochondria, by virtue of their prominent role in apoptosis, constitute a potential pharmacological target for new antitumor drugs. We recently discovered that this applies for the marine alkaloid lamellarin-D (Lam-D) and its synthetic amino derivative PM031379 (Kluza *et al.*, 2006). Both Lam-D and PM031379 induce mitochondria isolated from leukemia cells to swell and to release apoptogenic effectors that provoke nuclear apoptosis (Kluza *et al.*, 2006). Lam-D functions also as a potent topoisomerase I poison (Facompre *et al.*, 2003).

The aim of this study was to achieve a better understanding of apoptotic signaling in NSCLC focusing on mitochondrion-related events. To this end, we used two prototypic lamellarins Lam-D and PM031379 as pharmacological tools to decipher the apoptotic networks in the chemoresistant NSCLC cell line U1810. Our data reveal that mitochondrial ROS play a major role in determining the susceptibility to cell death, presumably by modulating the nuclear translocation of AIF.

Results

PM031379, but not Lam-D, induces nuclear apoptosis in NSCLC cells

From a structural point of view, Lam-D and PM031379 only differ by the nature of the substituent linked to the central pyrrole ring of the common planar pentacyclic chromophore. As shown in Figure 1a, Lam-D bears a

methoxy-phenol moiety, whereas PM031379 displays an aminopropine side chain. We have shown previously that both agents are equipotent cell death inducers when added to leukemia cells (Kluza *et al.*, 2006). However, the two molecules exhibited a major difference in their cytotoxic potential when added to the highly chemoresistant NSCLC cell line U1810 (Gallego *et al.*, 2004). After 18 h of incubation, a marked dose-dependent increase in nuclear apoptosis was observed with PM031379 as documented by the appearance of a sub-G1 peak (Figure 1b, left panel), along with oligonucleosomal DNA fragmentation (Figure 1c). Kinetic experiments (from 1 to 24 h) revealed a significant increase in nuclear apoptosis that was detected by 12 h after incubation with 10 μ M PM031379 (Figure 1b, right panel). U1810 cells treated with PM031379 manifested the morphological hallmarks of apoptosis, namely chromatin and cytoplasmic condensation, as well as nuclear fragmentation (Figure 1d). In strict contrast to PM031379, Lam-D failed to induce subdiploidy (Figure 1b) DNA fragmentation (Figure 1c) or other features of apoptosis (Figure 1d) in U1810 cells. Similar results were obtained in the NSCLC cell line, A549 (Figure 1e). These results suggest that Lam-D and its derivative PM031379 markedly differ in their ability to trigger the apoptotic cascade in NSCLC cells.

Apoptotic cascade triggered by Lam-D and PM031379 in NSCLC cells

We have previously reported that Lam-D and PM031379 triggered mitochondrion-dependent apoptosis (Kluza *et al.*, 2006). To define the apoptotic cascade induced by PM031379 in NSCLC cells and also in that way the mechanisms of resistance to Lam-D, we focused on two major events contributing to nuclear apoptosis, namely the mitochondrial release of the pro-apoptotic factors AIF and Cyt *c* and the activation of effector caspases (Figure 2). Because Bax is a prominent mediator of the outer mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis, we first examined whether PM031379 was capable of activating Bax in U1810 cells (Figure 2a). Using the 6A7 antibody, which only recognizes the membrane-bound active form of Bax, we showed that PM031379 lead to significant Bax activation, as detectable by immunofluorescence staining followed by cytofluorometric analysis (Figure 2a, upper panel) or immunofluorescence microscopy (Figure 2a, lower panel). PM031379-treated cells showed a punctuate, cytoplasmic staining pattern of activated Bax, consistent with a mitochondrial localization of Bax. This contrasts with the diffuse, presumably cytosolic staining pattern of Bax found in control cells. As expected from its effect on Bax activation, PM031379 induced the relocation of two major pro-apoptotic factors, Cyt *c* and AIF, from mitochondria to the cytosol, as determined by immunoblotting (Figure 2b). Significant induction of a caspase-3/7-like enzymatic activity was detected in PM031379-treated U1810 cells (Figure 2c). Unexpectedly, we also observed that Lam-D, like PM031379, induced Bax activation (Figure 2a) and AIF release to the cytosol

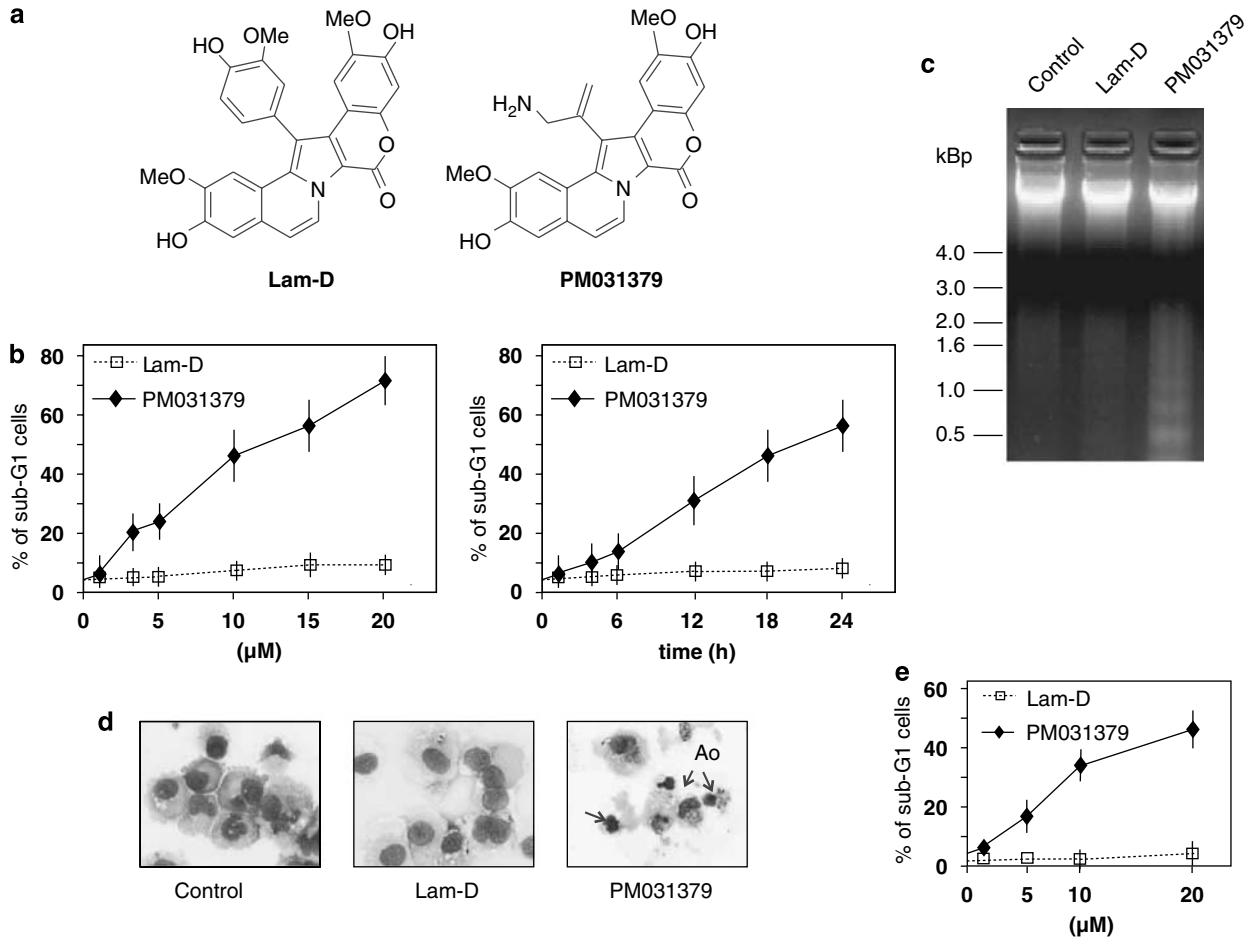


Figure 1 Nuclear signs of apoptosis induced by lamellarins. (a) Structure of Lam-D and PM031379. (b) For the concentration-dependent study (left), U1810 cells were treated with 1, 3, 5, 10, 15 and 20 μM of Lam-D or PM031379 for 18 h and the percentage of sub-G1 cells was measured by flow cytometry. Results are representative of four independent experiments. For the time-dependent study (right), U1810 cells were treated with 10 μM of Lam-D or 10 μM PM031379 for 1, 4, 6, 12, 18 and 24 h and the percentage of sub-G1 cells was determined as above. (c and d) U1810 cells were cultured for 18 h in the absence (Control) or presence of 10 μM Lam-D or 10 μM PM031379. (c) The internucleosomal DNA fragmentation was assessed by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. (d) Morphological studies were performed after May-Gruenwald Giemsa staining (original magnification $\times 630$; arrows indicate cells with the morphological appearance of apoptosis). (e) Apoptosis induced by lamellarins in A549 cells. The human lung adenocarcinoma cells, A549, were cultured for 24 h with indicated concentrations of Lam-D or PM031379 and the percentage of sub-G1 cells was determined. Results are representative of three independent experiments. Lam-D, lamellarin-D.

(Figure 2b) as well as the activation of effector caspases (Figure 2c). It is noteworthy that although Lam-D failed to induce nuclear apoptosis of U1810 cells, Lam-D and PM031379 demonstrated equipotent effects on activation of the first steps of the apoptotic cascade. Thus, we considered the possibility that the apoptosis-inducing cascade stimulated by Lam-D would be interrupted downstream the mitochondrial outer membrane permeabilization and caspase activation steps but upstream of the nuclear apoptotic events. Hence, we examined the subcellular distribution of AIF upon Lam-D and PM031379 exposure (Figure 2d). Consistent with the results of immunoblots (Figure 2b), confocal microscopic analysis showed the translocation of AIF from mitochondria to the cytosol in response to Lam-D or PM031379 administration as indicated by the diffuse extra nuclear staining pattern observed in comparison to control cells (Figure 2d). However, PM031379 differed in its capacity to trigger the nuclear translocation of

AIF. While PM031379 was efficient in stimulating the translocation of AIF to the nucleus, Lam-D failed to do so (Figure 2d). Thus, the capacity of PM031379 (as opposed to Lam-D) to induce nuclear pyknosis and karyorrhexis correlates with its unique potential to induce the complete mitochondrio-nuclear translocation of AIF (Figure 2d). It appears that translocation of AIF to the nucleus is a critical step for the development of the apoptotic process in lung cancer.

Involvement of AIF-mediated pathway in PM03137-induced U1810 cell apoptosis

To evaluate the contribution of AIF-dependent and caspases-dependent cell death pathways in PM031379-treated U1810 cells, AIF was silenced by siRNA or caspases were inhibited by addition of *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone (*Z*-VAD-fmk). Then, apoptosis and clonogenic cell survival were

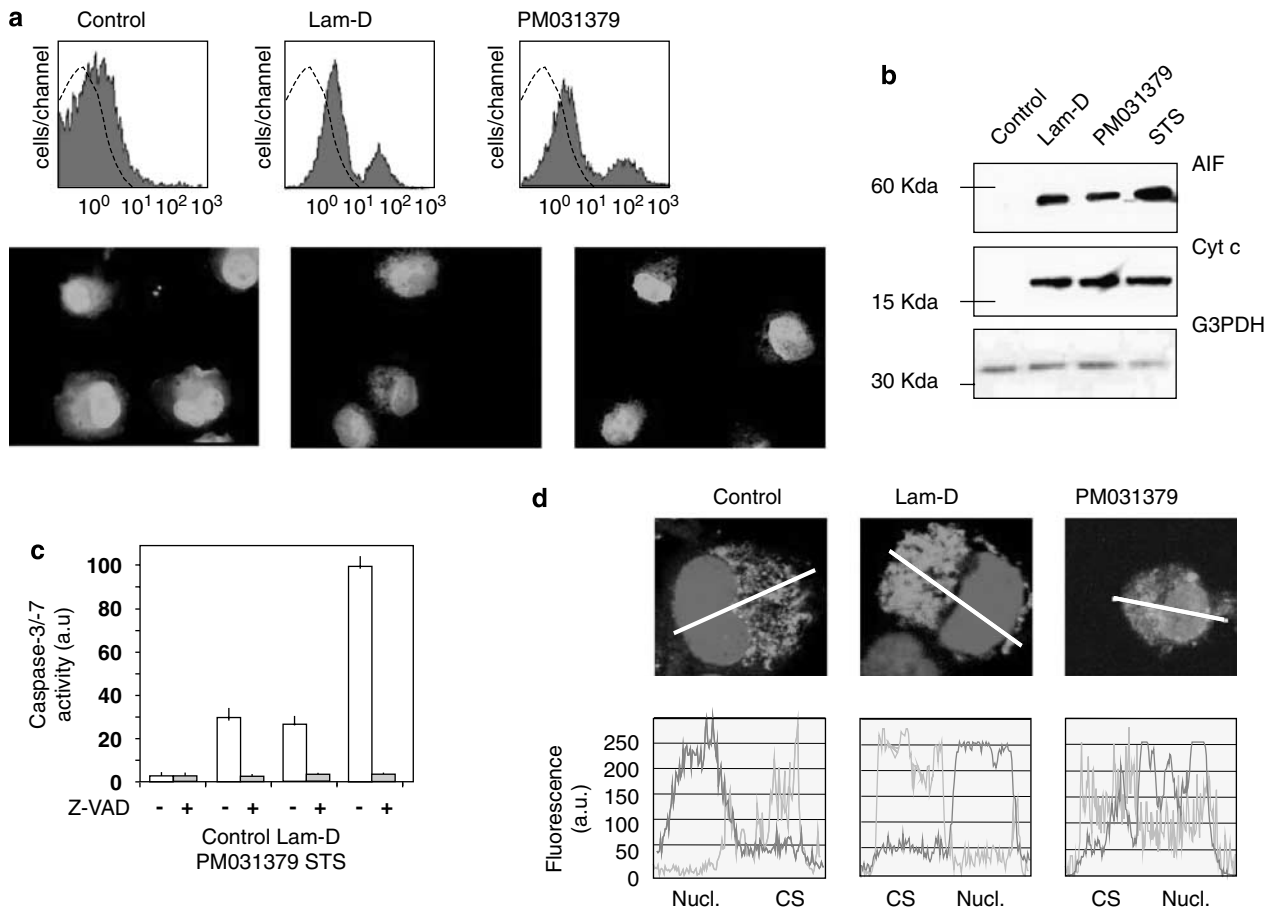


Figure 2 Apoptotic signaling pathways triggered by Lam-D and PM031379. (a) Bax activation and its mitochondrial membrane localization were assessed following treatment with 10 μ M PM031379 or Lam-D for 6 h. Upper panel, intracellular flow cytometry was performed using conformation-specific anti-Bax antibody (solid line) as described. Secondary antibody alone served as negative control (dashed line). Lower panel, microscopy examination of the subcellular localization of Bax using specific immunostaining (original magnification \times 630). (b) Mitochondrial release of Cyt *c* and AIF upon Lam-D and PM031379 exposure. Eighteen hours after the treatment with 10 μ M Lam-D, 10 μ M PM031379, or 1 μ M STS, the cytosolic fractions were analysed by immunoblot using specific antibodies. G3PDH served as loading control. Data are representative of three independent experiments. (c) Caspase-3/-7 activity in U1810 cells treated with lamellarins. Cells were incubated with 10 μ M PM031379, 10 μ M Lam-D or 1 μ M STS for 18 h in the presence or absence of the caspase inhibitor *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone (Z-VAD, 100 μ M) (means \pm s.d. of three independent experiments performed in duplicate). (d) Confocal images of immunostaining with AIF (green) and nuclear PI staining (red) of U1810 cells treated or not treated (control) with 10 μ M Lam-D or 10 μ M PM031379 for 18 h (upper panel). Quantification of signals was also measured by confocal microscopy (lower panel). The fluorescence intensities of cells (AIF: green; PI: red) were measured along the cursor (white line, upper panel). Data are shown on a linear scale of arbitrary units of fluorescence intensity for different subcellular regions. Two additional studies yielded similar results. Lam-D, lamellarin-D; Cyt *c*, cytochrome *c*; AIF, apoptosis-inducing factor; STS, staurosporine; Z-VAD, *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome); CS, cytoplasm; Nucl, nucleus.

assessed upon treatment with PM031379 (Figure 3). AIF siRNA, which reduced the expression of protein by 70% (Figure 3a), Z-VAD-fmk, both significantly decreased hypoploidy (sub-G1) induced by PM031379 as an internal control of their efficacy (Figure 3b). Confirming with the seminal role of AIF in lung cancer cell death (Gallego *et al.*, 2004), the death of U1810 cells induced by PM031379 was largely prevented when AIF was silenced (Figure 3b). Although Z-VAD-fmk completely inhibited caspase-3/-7 activity in U1810 cells treated with PM031379 (Figure 2c and not shown), it failed to counteract the lethal effect of PM031379 (Figure 3b). Thus, the induction of cell death by PM031379 in U1810 cells was largely mediated by the AIF-dependent pathway and caspases were required for

the nuclear DNA loss, yet were dispensable for the occurrence of cell death.

Since AIF has a physiological role for the maintenance of complex I of the respiratory chain (Vahsen *et al.*, 2004), the knockdown of AIF might result in PM031379 resistance due to adventitious effects on the AIF-dependent mitochondrial function and not to the pro-apoptotic function of AIF. To exclude this possibility, we used a second approach to interfere with the pro-apoptotic function of AIF. U1810 cells were microinjected with a neutralizing anti-AIF antibody that is able to prevent AIF translocation to the nucleus (Gallego *et al.*, 2004) or an isotype-matched anti-CD86 control antibody (Figure 3c). Upon treatment with PM031379, 49% of U1810 cells microinjected with control antibody

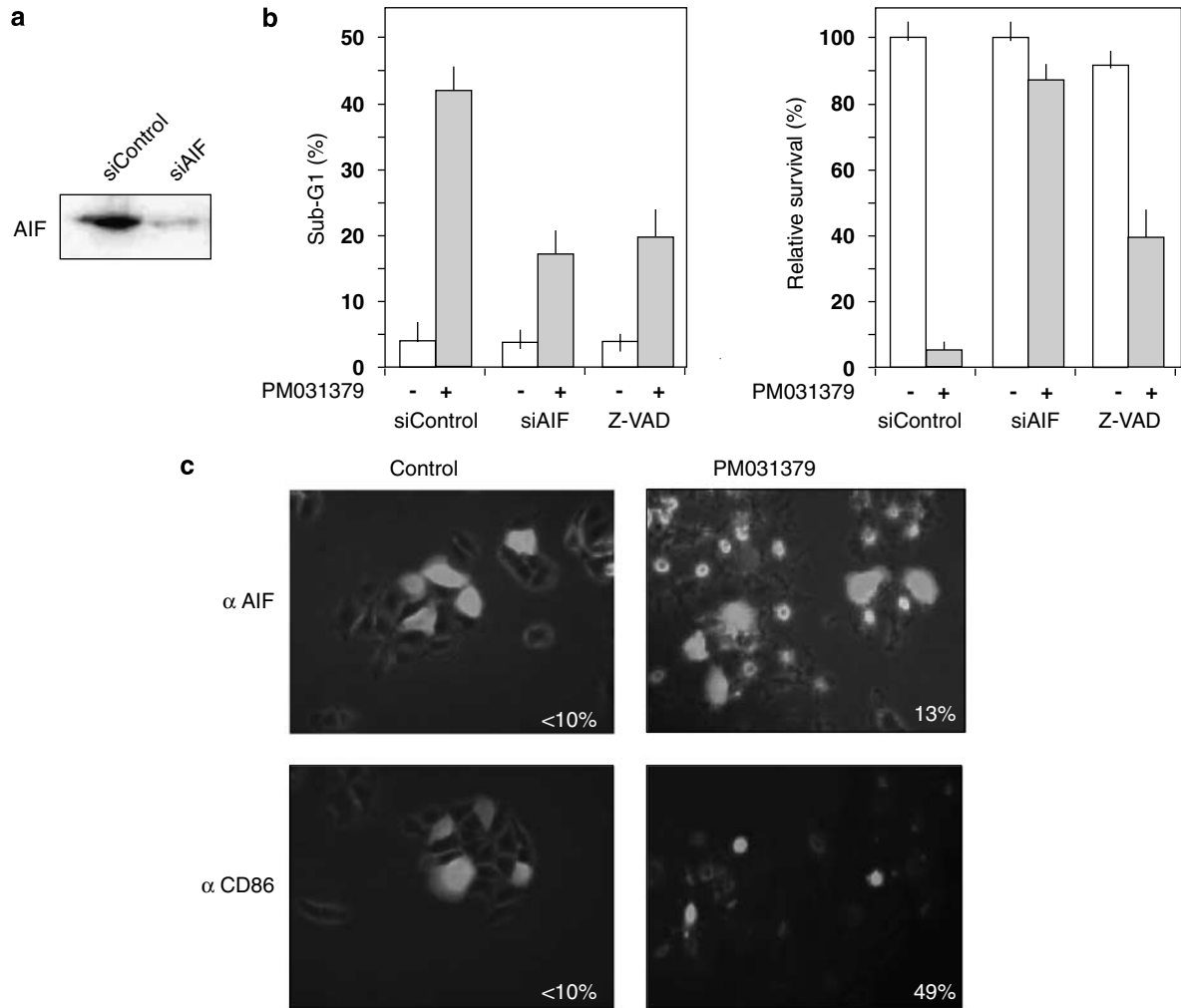


Figure 3 Effect of AIF depletion on hypoploidy and cell survival reduction induced by PM031379. **(a and b)** AIF was depleted in U1810 cells using siRNA. U1810 cells were electroporated with AIF siRNA (siAIF) or control siRNA (siControl). **(a)** Immunoblots of AIF expression in U1810 cells 72 h after electroporation with indicated siRNA. Equal loading was confirmed by probing with a G3PDH-specific antibody. **(b)** Fifty-four hours after transfection, cells were left untreated or treated with 10 μ M PM031379 in the presence or absence of 100 μ M Z-VAD-fmk for 18 h. Then, the frequency of cells with a subdiploid DNA content (left) or the relative survival (right) was determined. The percentage of sub-G1 was determined by flow cytometry (means \pm s.d. of three independent experiments). Survival was assessed by colony forming assays (means \pm s.d. of three independent experiments, each performed in duplicate). **(c)** Representative images of U1810 cells microinjected with either a neutralizing antibody against AIF or an isotype matching antibody (antibody against CD86) used as control along with dextran-Alexa and then treated or not treated with 10 μ M PM031379. Eighteen hours later, cells were observed under the microscope and the fraction of dextran-Alexa-positive cells (green fluorescence) exhibiting a death phenotype (arrows) was scored. Numbers represent the percentage of dead cells. siRNA, small interfering RNA; siAIF, small interfering apoptosis-inducing factor; Z-VAD-fmk, *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone.

presented morphological signs of cell death. In contrast, anti-AIF microinjection largely prevented the PM031379-induced cytotoxicity, down to 13%, 18 h after PM031379 treatment. This experiment confirms that AIF translocation to the nucleus is necessary for PM031379-mediated apoptosis of U1810 cells.

Mitochondrial ROS production is crucial for PM031379-induced U1810 cell apoptosis

Because the oxidative balance is thought to influence the resistance to apoptosis induced by anticancer drugs in lung cancer (Kang *et al.*, 2004a), we subsequently measured the production of intracellular ROS in

U1810 cells, before and after treatment with Lam-D or PM031379. This was performed by using the superoxide-sensitive probe hydroethidine (HE), a non-fluorescent chemical that enters cells and that can be oxidized to fluorescent hydrophilic ethidium, which then is trapped within the cellular membranes. As shown in Figure 4a, ROS levels were increased after treatment with PM031379, and this increase was efficiently blocked by pretreatment with the thiol containing antioxidant *N*-acetyl cystein (NAC). Similar inhibitory effects were observed with the antioxidant compounds, α -tocopherol and L-ascorbate but with a reduced efficacy (Figure 4a). The increase in ROS level became obvious within 2 h after PM031379 exposure (Figure 4b),

well before signs of apoptosis occur (Figure 1b). Using the peroxide-specific probe dichlorofluorescein diacetate, similar increases in ROS level were observed upon PM031379 exposure (not shown). In contrast to PM031379, however, Lam-D was unable to trigger the generation of ROS (Figure 4a). To determine whether mitochondria were the source of ROS induced by PM031379, we measured the HE-detectable ROS in normal U1810 cells as well as cells that were depleted from mitochondrial DNA and that bear a so-called ρ^0 phenotype (Figure 4B). ρ^0 cells lack mitochondrial DNA-encoded proteins and RNAs and are incapable of mitochondrial respiration (not shown) because of the loss of key components of the electron transport chain. In contrast to normal U1810 cells, ρ^0 U1810 cells failed to exhibit a consistent increase in HE fluorescence over 24 h of PM031379 exposure contrasting with graded increases in ROS generation observed in U1810 cells (Figure 4b). Thus, an intact respiratory chain is essential for the ROS generation induced by PM031379 in NSCLC cells.

Since glutathione (GSH) is a major antioxidant that plays a key role in maintaining the intracellular redox state (Anderson *et al.*, 1997), we therefore determined a kinetic analysis of the effects of PM031379 on intracellular levels of GSH (Figure 4c). Treatment with PM031379 resulted in a slight increase in cellular GSH detected 3 h after PM031379 exposure then the GSH levels remained almost unchanged. Cells were incubated with the thiol-reacting agent, *N*-ethylmaleimide or with L-buthionine sulfoximine, a specific inhibitor of GSH synthesis, providing a control for GSH depletion (Figure 4c). These observations led us to conclude that elevation of ROS induced by PM031379 was not due to a decrease in antioxidant capacity.

Next, we investigated the extent to which mitochondrial ROS production contributed to apoptosis of U1810 cells. Inhibition of ROS by NAC prevented nuclear apoptosis induced by PM031379 (Figure 4d). In agreement, the antioxidants, α -tocopherol and L-ascorbate reduced the percentage of apoptotic cells upon PM031379 exposure (Figure 4d). Moreover, ρ^0 U1810 cells, which have lost their ability to produce mitochondrial ROS in response to PM031379 administration (Figure 4b), were resistant against PM031379-induced

apoptosis (Figure 4c). These observations support the notion that mitochondrial ROS are required for efficient apoptosis of NSCLC cells.

Mitochondrial ROS are involved in AIF nuclear translocation

Since it has been reported that the mitochondrial AIF redistribution is modulated by intracellular ROS level (Murahashi *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005a), we investigated to which extent ROS affect the subcellular redistribution of AIF from mitochondria to the cytosol and then to the nucleus. The antioxidant NAC that suppressed nuclear apoptosis (Figure 3c) failed to prevent the mitochondrial release of the pro-apoptotic proteins Cyt *c* or AIF as well as the activation of caspase-3 (Figure 5a). However, in conditions in which NAC inhibited ROS production (Figure 4a) and cell death (Figure 4c), NAC also largely prevented the PM031379-induced AIF nuclear translocation (Figure 5a) and the fragmentation of nuclear DNA in high molecular weight fragments (Figure 5b) that is a typical hallmark of AIF activity in the nucleus (Susin *et al.*, 2000). Similarly, nuclear translocation of AIF was absent in ρ^0 U1810 cells exposed to PM031379 (Figure 5c). Moreover, pre-incubation of U1810 cells with menadione, a substance known to generate ROS by futile redox cycles in mitochondria, restored the capacity of Lam-D to induce nuclear translocation of AIF (Figure 6a). These results suggest that mitochondrial ROS induced by PM031379 are required for the nuclear translocation of AIF providing a mechanistic explanation for the involvement of mitochondrial ROS in U1810 cells apoptosis.

Menadione enhances the susceptibility of U1810 cells to apoptosis induction

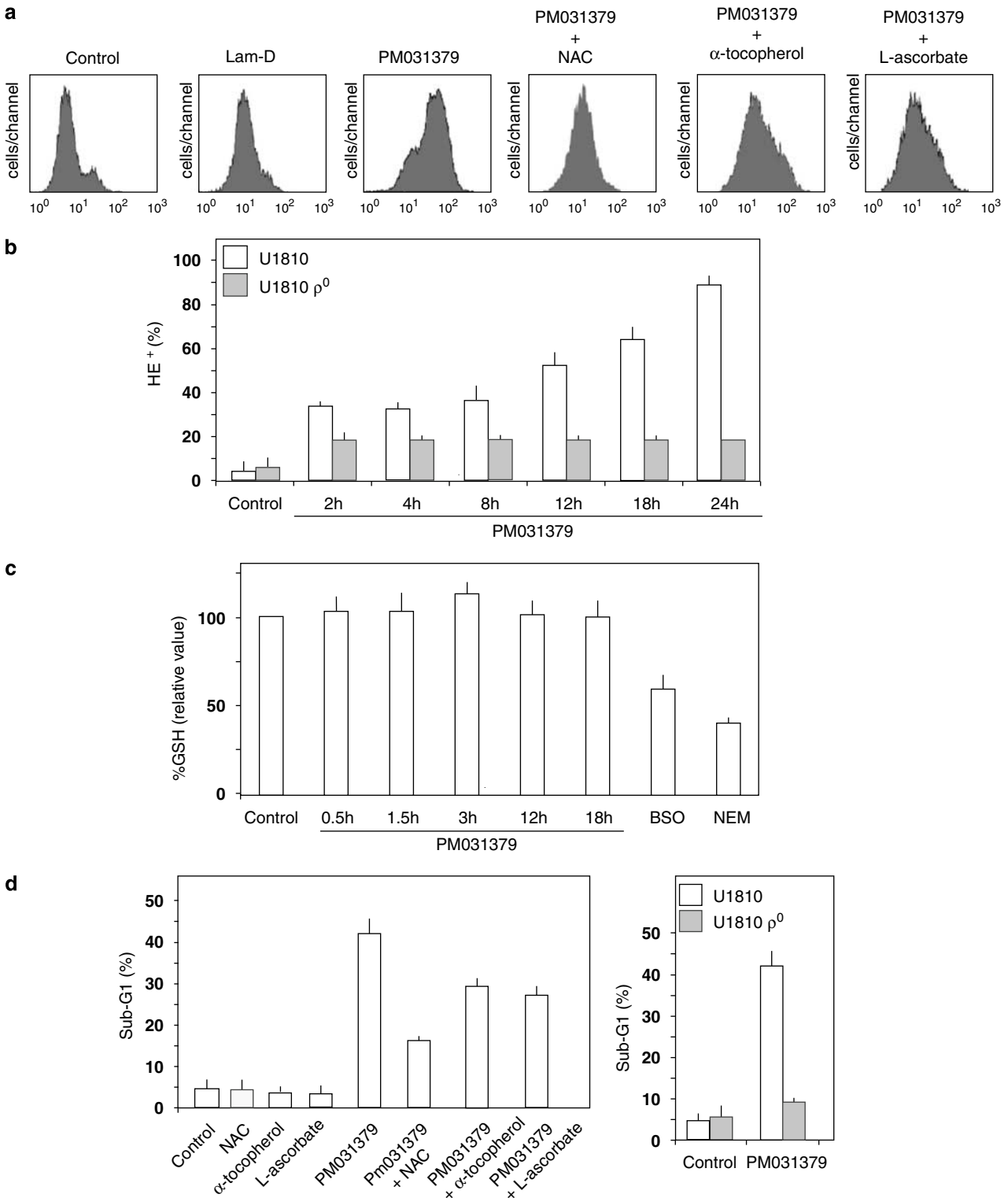
We next examined the effect of intracellular ROS production in combination with Lam-D or DNA damaging agents on NSCLC cell death. Confirming previous data (Joseph *et al.*, 2001; Ekedahl *et al.*, 2003), U1810 cells are resistant to apoptosis induction by the conventional chemotherapeutic drugs etoposide and cisplatin as well as Lam-D (Figure 6b). Incubation of U1810 cells with menadione resulted in moderate

Figure 4 ROS production in Lam-D and PM031379-treated U1810 cells. (a) U1810 cells were pretreated in the absence or presence of 10 mM NAC for 30 min, 100 μ M L-ascorbate or 100 μ M α -tocopherol for 2 h. Then cells were incubated with dimethylsulfoxide (Control), 10 μ M Lam-D or 10 μ M PM031379 for 18 h. Finally, cells were labeled with hydroethidine and subjected to cytofluorometric analysis. The experiment was conducted twice with similar results. (b) Kinetics of the PM031379-induced ROS production in U1810 cells and U1810 ρ^0 cells. U1810 ρ^0 cells and the parental wild-type U1810 cells were incubated in the presence of 10 μ M PM031379 for the indicated period, and the percentage of HE⁺ cells (mean \pm s.d. of three independent experiments) was determined by flow cytometry. (c) Intracellular GSH level in U1810 cells after PM031379 exposure. U1810 cells were incubated in the presence of 10 μ M PM031379 for the indicated period, and the levels of glutathione were determined. Alternatively, U1810 cells were treated with 10 mM BSO or with 100 μ M NEM for 12 h to deplete intracellular GSH. Results are expressed as fluorescence as a percentage of control (mean \pm s.d. of three independent experiments in triplicates). (d) Effect of inhibition of ROS production on PM031379-induced apoptosis. U1810 cells were pretreated or not pretreated with NAC (10 mM), L-ascorbate (100 μ M) or α -tocopherol (100 μ M) for 2 h and then cells were incubated with dimethylsulfoxide (Control) or 10 μ M PM031379 for 18 h (left part). Nuclear apoptosis was determined by cytofluorometric analysis of the percentage of sub-G1 cells. Alternatively, the percentage of sub-G1 cells was determined in U1810 ρ^0 cells and in the parental wild-type U1810 cells treated with 10 μ M PM031379 for 18 h (right part). ROS, reactive oxygen species; Lam-D, lamellarin-D; NAC, *N*-acetyl cysteine; NEM, *N*-ethylmaleimide; BSO, *N*-buthionine sulfoximine; GSH, glutathione.

apoptosis (Figure 6b). However, pretreatment with menadione increased the susceptibility of the cells to the lethal effects of Lam-D as well as etoposide or cisplatin (Figure 6b). Taken together, these data suggest that the drug-induced generation of mitochondrial ROS may sensitize NSCLC cells to apoptosis induction.

Discussion

Platinum-based chemotherapies are widely used as a first-line treatment of NSCLC. However, low response rates to platinum-based chemotherapies illustrate that resistance to current therapies is a crucial problem in



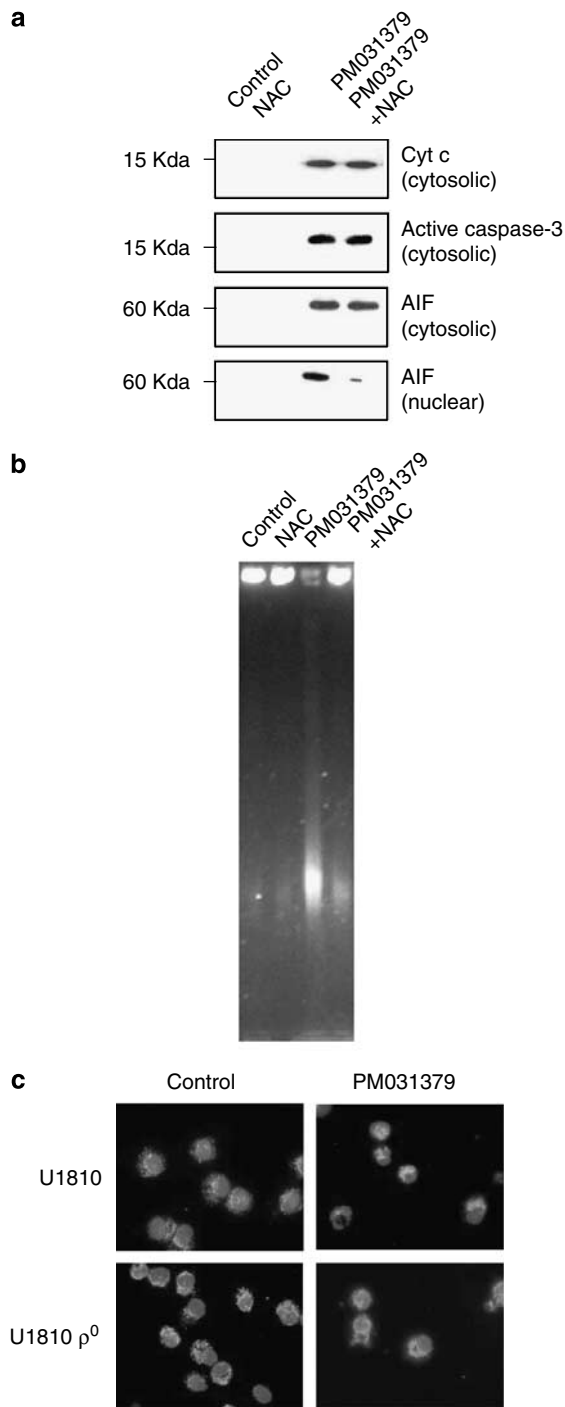


Figure 5 Effect of ROS inhibition on the subcellular redistribution of pro-apoptotic proteins. **(a)** Cytosolic and nuclear fractions were obtained from U1810 cells treated with 10 μ M PM031379 for 18 h. Where indicated, cells were pre-incubated for 2 h with NAC (10 mM) before PM031379 treatment. Subcellular fractions were subjected to immunoblot detection of Cyt *c*, active caspase-3 and anti-AIF. **(b)** Genomic DNA analysed by pulse field gel electrophoresis. The effect of NAC (10 mM) on large-scale DNA fragmentation in PM031379 (10 μ M)-treated U1810 cells were analysed at 24 h. **(c)** Representative images of immunostaining of AIF (green) and nuclear Hoechst 33342 (blue) staining of U1810 ρ^0 cells and the parental wild-type U1810 cells treated with 10 μ M PM031379 for 18 h (original magnification \times 630). ROS, reactive oxygen species; NAC, *N*-acetyl cysteine; Cyt *c*, cytochrome *c*; AIF, apoptosis-inducing factor.

NSCLC management. Cytotoxic agents often trigger the caspase-mediated mitochondrial cell death pathway. However, multiple results suggest that the classical caspase-dependent apoptotic pathways are not functional in NSCLC cells in response to cytotoxic agents *in vitro* (Yang *et al.*, 2003; Bartling *et al.*, 2004; Broker *et al.*, 2004) and this may also be the case *in vivo* (Ferreira *et al.*, 2001a, b). As an example, chemoresistant NSCLC exhibit a reduced expression of caspase-9 or caspase-3 (Okouoyo *et al.*, 2004). We previously identified the U1810 cells as the most radioresistant among a panel of NSCLC cell lines (Joseph *et al.*, 2001). However, the resistance of U1810 cells cannot simply be explained by the absence of apoptotic proteins or the overexpression of anti-apoptotic proteins (Joseph *et al.*, 2001).

One therapeutic option that has been proposed to overcome resistance is the restoration of the defective caspase-dependent cell death pathway (Fennell, 2005). Overexpression of caspases in drug-resistant human NSCLC xenografts may overcome chemoresistance *in vivo* (Okouoyo *et al.*, 2004). Pharmacological inhibition of IAP proteins restored NSCLC cells apoptosis sensitivity *in vitro* and *in vivo*, in mice grafted with human NSCLC (Yang *et al.*, 2003). Other therapeutic strategy consists in stimulating caspase-independent cell death pathways in NSCLC. Indeed, cell death can occur in caspase-deficient cells through the activation of caspase-independent routes. Thus, microtubule-stabilizing agents trigger cell death through pathway involving the lysosomal protease cathepsin B in NSCLC resistant to DNA-damaging agents (Broker *et al.*, 2004). Alternatively, nuclear translocation of AIF may be crucial in determining the chemosensitivity of NSCLC cells (Gallego *et al.*, 2004, and this study). The nuclear translocation of AIF is an essential step for cell death induction since the presence of AIF in the nucleus (but not in the cytosol) is the parameter that predicts whether nuclear chromatin condensation as well as cell death occurs. This nuclear translocation is the only phenomenon that distinguishes the cellular effects of Lam-D and PM031379. While PM031379 induces nuclear AIF translocation, apoptosis and cell death, Lam-D fails to do so. Moreover, the PM031379-induced cell death is prevented by several antioxidants or depletion of mitochondrial DNA at the level of the nuclear translocation of AIF. As we demonstrated in this study, the generation of ROS induced by PM031379 was not accompanied by depletion of GSH content. Moreover GSH depletion by L-buthionine sulfoximine did not induce U1810 cell death (not shown). Thus, such an ROS accumulation and cell death are apparently unrelated to the rate of glutathione.

The present study suggests a novel strategy to restore apoptosis in chemoresistant NSCLC cells. We demonstrated that mitochondrial ROS favors the apoptosis by stimulating the nuclear translocation of AIF. Consistent with these findings, ROS generation has been involved in lung cancer cell death via a caspase-independent pathway (Kang *et al.*, 2004a). We used lamellarins as selective pharmacological tools to activate mitochondrial

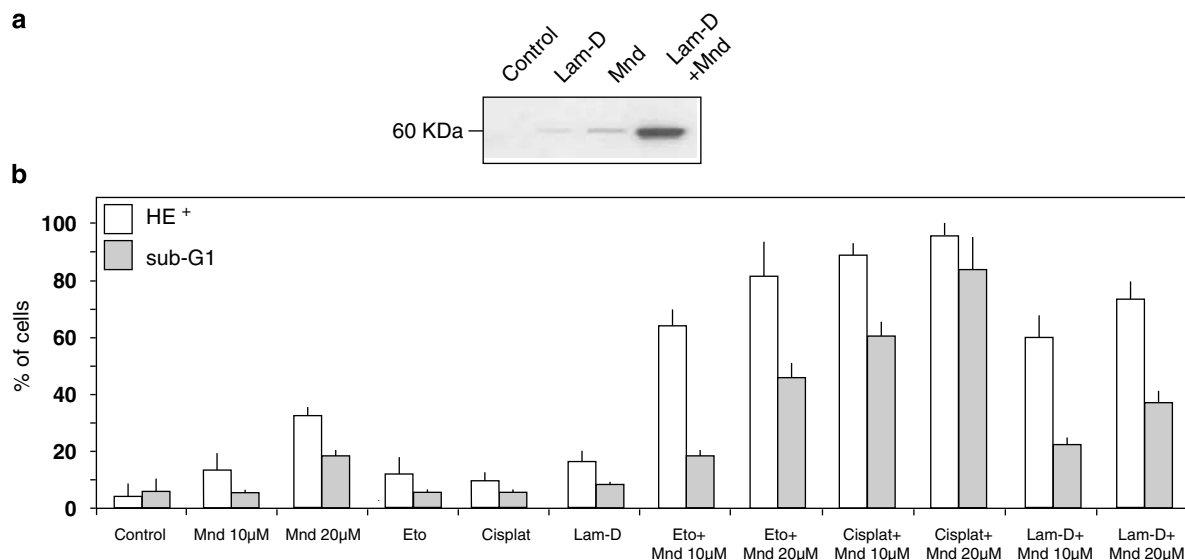


Figure 6 Effect of menadione in combination with the anticancer drugs Lam-D, etoposide and cisplatin on ROS production and apoptosis. (a) Nuclear redistribution of AIF was studied by immunoblot. Nuclear extracts were prepared from U1810 cells treated with 10 µM Lam-D alone or in combination with 20 µM Mnd for 18 h. Representative picture from two independent experiments. (b) U1810 cells were treated with 10 or 20 µM Mnd alone or in combination with 10 µM Lam-D or 10 µM Eto or 40 µM Cisplat for 18 h. Cells were harvested for determination of apoptosis (% of sub-G1 cells) and ROS generation (HE⁺) (means ± s.d. of three independent experiments). Lam-D, lamellarin-D; ROS, reactive oxygen species; AIF, apoptosis-inducing factor; Mnd, menadione; Eto, etoposide; Cisplat, cisplatin; HE, hydroethidine.

cell death pathways. Indeed, we have found that Lam-D and PM031379 are potent mitochondria-targeted agents triggering mitochondrial permeability transition and subsequent apoptosis in a large panel of tumor cells (Kluza *et al.*, 2006). Mitochondrial respiration is associated with the generation of small amounts of ROS, and it is generally taken as an established fact that mitochondrial permeability transition responsible for uncoupling of mitochondrial electron transport causes increased generation of ROS (Zamzami *et al.*, 1995). Surprisingly, we did not observe any mitochondrial ROS production with the mitochondrial permeability transition inducer Lam-D (Figure 3). This may be due to intrinsic antioxidant properties of Lam-D as already seen with other lamellarin alkaloids (Krishnaiah *et al.*, 2004). However, we were unsuccessful to demonstrate the antioxidant capability of Lam-D in U1810 cells (data not shown). From a pharmacological point of view, lamellarins represent a promising family of anticancer agents due to their potent activities in xenograft models and their original mechanism of action and the present work strongly reinforces the idea that Lam-D and PM031379 exhibit distinct mechanistic properties (Bailly, 2004). Lam-D derivatives are now designed as topoisomerase I-targeted agents, whereas amino analogs of the PM031379-type essentially function as ROS-promoting mitochondriotoxic agents. These molecules are excellent tools to dissect the apoptotic machinery and solid anticancer drug candidates. The pre-clinical development of a lamellarin derivative is currently ongoing.

To conclude, the importance of promoting mitochondrial ROS could determine the chemosensitivity of

NSCLC cells. The enhancement of drug sensitivity with increased intracellular ROS level may provide an opportunity to develop novel strategies to fight against cancer.

Materials and methods

Chemicals and modulation of apoptosis

Staurosporine, *N*-ethylmaleimide, L-buthionine sulfoximine, NAC, α -tocopherol (vitamin E) and 100 µM L-ascorbate (vitamin C) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Lam-D and PM031379 were synthesized at Pharmamar (Madrid, Spain). Compounds were dissolved in dimethylsulfoxide at an initial stock concentration of 10 mM and stored at -20°C in the dark. Subsequent dilutions were performed in phosphate-buffered saline or in culture medium. When indicated, cells were treated with cisplatin or etoposide (both from Bristol-Myers Squibb, New York, NY, USA) alone or in combination with menadione (Sigma). Z-VAD-fmk (Bachem, Basel, Switzerland) was used at 100 µM.

Culture conditions and generation of siRNA

The characterized human NSCLC cell line U1810 (Bergh *et al.*, 1985) was routinely cultivated as published (Gallego *et al.*, 2004). We applied siRNA to inhibit AIF expression using an siRNA double-stranded oligonucleotide designed to interfere with the expression of human AIF (sense anti-human AIF 5'-GAUCCUCCCCGAAUACCUCTT-3', Proligo, Boulder, CO, USA). An oligonucleotide-specific for mouse AIF (sense anti-mouse AIF 5'-AUGCAGAACUCCAAGCACGTT-3') that does not affect human AIF was used as a control as reported before (Cande *et al.*, 2004). Exponentially growing cells were concentrated to 10⁷ cells ml⁻¹ in optiMEM medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 500 µl of cell

suspension was pipetted into a 4-mm electroporation cuvette (Cell Projects, Marietsham, UK), then siRNAs were added at a final concentration of 150 pmol. Electroporation was performed immediately with an Easyject Electroporator (Equibio, Flowgen, Nottingham, UK) using a rectangle pulse of 260 V, 900 μ F. After incubating for 15 min at RT, the cells were diluted with culture medium and incubated for 72 h before experiments. Silencing of AIF was determined by measuring AIF protein expression at 72 h after electroporation by immunoblotting.

Generation of ρ^0 cells

The procedure to generate ρ^0 cells was based on standard published protocols using ethidium bromide (Marchetti *et al.*, 1996b). Two different sublines were derived and controlled for mtDNA depletion using specific PCR reactions as described elsewhere (Armand *et al.*, 2004). The ρ^0 subline that morphologically resembled most closely the parental wild-type control cell line was kept and results are shown for this cell line. In experiments, ρ^0 and parental wild type control cells were maintained in the same culture medium supplemented with pyruvate, uridine and glucose. Twenty-four hours before experiments were realized, ethidium bromide was removed from the medium of ρ^0 cells.

Detection of apoptosis

The frequency of hypoploid cells (sub-G1 cells) was assessed as described (Gallego *et al.*, 2004). DNA fragmentation (5×10^6 cells per lane) was determined by agarose gel electrophoresis as described previously (Kawabe and Ochi, 1991). Formation of high molecular weight DNA fragments was determined by using pulse field gel electrophoresis, as described previously (Gallego *et al.*, 2004). The activity of caspase-3-like enzymes was determined with the Caspase-Glo 3/7 luminescent kit (Promega Corp, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's recommendation.

Cytofluorometric analysis of ROS production

To evaluate the intracellular production of ROS, cells were incubated for 15 min at 37°C to 500 nm HE immediately before cytofluorometric analysis as previously described (Marchetti *et al.*, 1996a).

Determination of intracellular glutathione

The total glutathione content was determined after loading the cells with the glutathione sensitive probe, monochlorobimane. U1810 cells were seeded at a density of 5×10^4 per well into 96-well black microtiter plates in triplicates. After 8 h of incubation at 37°C in 5% CO₂, cells were treated for various period of time. Then, monochlorobimane (100 μ l) in phosphate-buffered saline was added at a final concentration of 40 μ M to the living cells and left 30 min. Fluorescence was measured at 460 nm using a microplate-reading fluorometer (Fluorocount, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) with excitation at 360 nm.

Clonogenic assay

U1810 cells were seeded into 25-cm² flasks and allowed to grow until sub-confluence. U1810 cells were treated for 18 h with Z-VAD-fmk (100 μ M), PM031379 (10 μ M) alone or in combination with Z-VAD-fmk. Alternatively, 54 h after electroporation, siControl or siAIF U1810 cells were treated next with 10 μ M PM031379 for 18 h. At the end of the incubation time, cells were collected from the monolayer with trypsin and washed twice in RPMI medium. The cells ($50\,000\text{ ml}^{-1}$) were plated in drug-free medium in triplicate into six-well dishes.

One week after treatment, the colonies that emerged in the Petri dish were stained with 0.2% crystal violet in 900 ml methanol to allow macroscopic estimation. The surviving fractions following given treatments were calculated as a percentage of viable cells in untreated cultures.

Immunofluorescence and Bax detection

For subcellular localization of AIF, U1810 cells were grown on coverslips and stained with AIF antibodies as described previously (Gallego *et al.*, 2004). For counterstaining, propidium iodide (0.2 μ g ml⁻¹) or Hoechst 33342 (10 μ g ml⁻¹) was used. All samples were analysed using a confocal microscope (Leica TCS NT, Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) as described (Gallego *et al.*, 2004).

For flow cytometric analysis of Bax activation, a procedure described elsewhere (Nyman *et al.*, 2005) was used. Then cells (10 000 per sample) were analysed on a XL flow cytometer. Alternatively, the subcellular localization of Bax was detected by immunofluorescence using anti-human Bax antibody (dilution 1:200, clone 2D2; AG Scientific, San Diego, CA, USA). Primary antibody binding was detected with Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse antibodies (dilution 1:500). Samples were viewed using fluorescence microscope DMLR (Leica).

Immunoblot analysis

Cytosolic fractions or cytosols were prepared using a method that has been reported previously (Gallego *et al.*, 2004). Nuclear extracts were prepared using the Nuclear Fractionation kit (Biovision, Mountain View, CA, USA). Fifty micrograms of proteins of the cytosolic fraction or the nuclear extract were subjected to 12% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) which were afterwards probed with primary antibodies including anti-Cyt *c*, clone 7H8.2C12 (1/1000; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-AIF (1:1000, sc-13116; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) and anti-active caspase-3 (1:1000; Cell Signalling, Danvers, MA, USA). Fractionation quality and protein loading were verified by the distribution of the specific subcellular markers: G3PDH using a rabbit anti-G3PDH (1:1000; Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) for cytoplasm and Lamin B using a goat anti-Lamin B (1:5000; Santa Cruz) for nucleus. Primary antibodies binding was detected with horseradish peroxidase-conjugated-specific antibodies (1:1000; Biorad) and visualized by enhanced chemiluminescence following the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA).

Abbreviations

AIF, apoptosis-inducing factor; Cyt *c*, cytochrome *c*; HE, hydroethidine; Lam-D, lamellarin-D; NAC, *N*-acetyl cystein; NSCLC, non-small cell lung carcinoma; ROS, reactive oxygen species.

Acknowledgements

We thank Pierre Cappy for technical help. In memoriam we like to acknowledge the contribution to this article from Martial Flactif who passed away in July 2006.

This work was supported by grants from INSERM, Université de Lille II, Ligue Nationale contre le Cancer Comité du nord (to PM), Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée) and Institut National contre le Cancer, and European Union ChemoRes (to GK).

References

- Anderson CP, Tsai J, Chan W, Park CK, Tian L, Lui RM *et al.* (1997). Buthionine sulphoximine alone and in combination with melphalan (L-PAM) is highly cytotoxic for human neuroblastoma cell lines. *Eur J Cancer* **33**: 2016–2019.
- Armand R, Channon JY, Kintner J, White KA, Miselis KA, Perez RP *et al.* (2004). The effects of ethidium bromide induced loss of mitochondrial DNA on mitochondrial phenotype and ultrastructure in a human leukemia T-cell line (MOLT-4 cells). *Toxicol Appl Pharmacol* **196**: 68–79.
- Bailly C. (2004). Lamellarins, from A to Z: a family of anticancer marine pyrrole alkaloids. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **4**: 363–378.
- Bartling B, Lewensohn R, Zhivotovsky B. (2004). Endogenously released Smac is insufficient to mediate cell death of human lung carcinoma in response to etoposide. *Exp Cell Res* **298**: 83–95.
- Bergh J, Nilsson K, Ekman R, Giovanella B. (1985). Establishment and characterization of cell lines from human small cell and large cell carcinomas of the lung. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* **93**: 133–147.
- Broker LE, Huisman C, Span SW, Rodriguez JA, Kruyt FA, Giaccone G. (2004). Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* **64**: 27–30.
- Cande C, Vahsen N, Metivier D, Tourriere H, Chebli K, Garrido C *et al.* (2004). Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. *J Cell Sci* **117**: 4461–4468.
- Ekedahl J, Joseph B, Marchetti P, Fauvel H, Formstecher P, Lewensohn R *et al.* (2003). Heat shock protein 72 does not modulate ionizing radiation-induced apoptosis in U1810 non-small cell lung carcinoma cells. *Cancer Biol Ther* **2**: 663–669.
- Engel RH, Evens AM. (2006). Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci* **11**: 300–312.
- Facompre M, Tardy C, Bal-Mahieu C, Colson P, Perez C, Manzanares I *et al.* (2003). Lamellarin D: a novel potent inhibitor of topoisomerase I. *Cancer Res* **63**: 7392–7399.
- Fennell DA. (2005). Caspase regulation in non-small cell lung cancer and its potential for therapeutic exploitation. *Clin Cancer Res* **11**: 2097–2105.
- Ferreira CG, van d V, Span SW, Jonker JM, Postmus PE, Kruyt FA *et al.* (2001a). Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* **12**: 799–805.
- Ferreira CG, van d V, Span SW, Ludwig I, Smit EF, Kruyt FA *et al.* (2001b). Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* **7**: 2468–2474.
- Furre IE, Shahzidi S, Luksiene Z, Moller MTN, Borgen E, Morgan J *et al.* (2005). Targeting PBR by hexaminolevulinium-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer Res* **65**: 11051–11060.
- Gabellini N, Masola V, Quartesan S, Oselladore B, Nobile C, Michelucci R *et al.* (2006). Increased expression of LGI1 gene triggers growth inhibition and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* **207**: 711–721.
- Gallego MA, Joseph B, Hemstrom TH, Tamiji S, Mortier L, Kroemer G *et al.* (2004). Apoptosis-inducing factor determines the chemoresistance of non-small-cell lung carcinomas. *Oncogene* **23**: 6282–6291.
- Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. (2006). Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4812–4830.
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**: 153–164.
- Joseph B, Ekedahl J, Lewensohn R, Marchetti P, Formstecher P, Zhivotovsky B. (2001). Defective caspase-3 relocalization in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* **20**: 2877–2888.
- Kang YH, Lee E, Choi MK, Ku JL, Kim SH, Park YG *et al.* (2004a). Role of reactive oxygen species in the induction of apoptosis by alpha-tocopherol succinate. *Int J Cancer* **112**: 385–392.
- Kang YH, Yi MJ, Kim MJ, Park MT, Bae S, Kang CM *et al.* (2004b). Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Res* **64**: 8960–8967.
- Kawabe Y, Ochi A. (1991). Programmed cell death and extrathymic reduction of Vb8+ CD4+ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* anterotoxin B. *Nature* **349**: 245–248.
- Kluza J, Gallego MA, Loyens A, Beauvillain JC, Sousa-Faro JM, Cuevas C *et al.* (2006). Cancer cell mitochondria are direct proapoptotic targets for the marine antitumor drug lamellarin D. *Cancer Res* **66**: 3177–3187.
- Krishnaiah P, Reddy VLN, Venkataramana G, Ravinder K, Srinivasulu M, Raju TV *et al.* (2004). New lamellarin alkaloids from the Indian ascidian *Didemnum obscurum* and their antioxidant properties. *J Nat Prod* **67**: 1168–1171.
- Marchetti P, Susin SA, Decaudin D, Gamen S, Castedo M, Hirsch T *et al.* (1996a). Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA. *Cancer Res* **56**: 2033–2038.
- Marchetti P, Zamzami N, Susin SA, Petit PX, Kroemer G. (1996b). Apoptosis of cells lacking mitochondrial DNA. *Apoptosis* **1**: 119–125.
- Murahashi H, Azuma H, Zamzami N, Furuya KJ, Ikebuchi K, Yamaguchi M *et al.* (2003). Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *J Leukoc Biol* **73**: 399–406.
- Nyman U, Sobczak-Pluta A, Vlachos P, Perlmann T, Zhivotovsky B, Joseph B. (2005). Full-length p73{alpha} represses drug-induced apoptosis in small cell lung carcinoma cells. *J Biol Chem* **280**: 34159–34169.
- O'Connor K, Gill C, Tacke M, Rehmann FJ, Strohsfeldt K, Sweeney N *et al.* (2006). Novel titanocene anti-cancer drugs and their effect on apoptosis and the apoptotic pathway in prostate cancer cells. *Apoptosis* **11**: 1205–1214.
- Okouoyo S, Herzer K, Ucur E, Mattern J, Krammer PH, Debatin KM *et al.* (2004). Rescue of death receptor and mitochondrial apoptosis signaling in resistant human NSCLC *in vivo*. *Int J Cancer* **108**: 580–587.
- Park MT, Kim MJ, Kang YH, Choi SY, Lee JH, Choi JA *et al.* (2005a). Phytosphingosine in combination with ionizing radiation enhances apoptotic cell death in radiation-resistant cancer cells through ROS-dependent and -independent AIF release. *Blood* **105**: 1724–1733.
- Park YC, Jeong JH, Park KJ, Choi HJ, Park YM, Jeong BK *et al.* (2005b). Sulindac activates nuclear translocation of AIF, DFF40 and endonuclease G but not induces oligonucleosomal DNA fragmentation in HT-29 cells. *Life Sci* **77**: 2059–2070.

- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M *et al.* (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**: 571–580.
- Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N *et al.* (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* **23**: 4679–4689.
- Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T *et al.* (2003). Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res* **63**: 831–837.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T *et al.* (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* **182**: 367–377.
- Zhivotovsky B, Orrenius S. (2003). Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. *Semin Cancer Biol* **13**: 125–134.

ESSENTIAL ROLE OF MITOCHONDRIA IN THE APOPTOSIS OF CANCER CELLS INDUCED BY THE MARINE ALKALOID LAMELLARIN-D

Caroline Ballot^{*}, Jérôme Kluza^{*}, Alain Martoriati^{*}, Ulrika Nyman^{**}, Pierre Formstecher^{*},
Bertrand Joseph^{**}, Christian Bailly^{+,++} and Philippe Marchetti^{*,+}

* Inserm U837 and Faculté de Médecine, Université de Lille II 1 Place Verdun 59045 Cedex, France.

** Department of Oncology-Pathology, Cancer Centrum Karolinska (CCK), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

+ Plate-forme de Biothérapie, Centre de Bio-Pathologie, et Banque de Tissus, CHRU Lille, France.

++ Current address : Institut de Recherche Pierre Fabre, 3 rue des satellites, BP94244, 31432 Toulouse, France.

Molecular Cancer Therapeutics, 2009, en révision.

La Lamellarine-D, puissant agent cytotoxique et alcaloïde marin aux propriétés antitumorales, exerce son action pro-apoptotique *via* deux voies complémentaires : une voie nucléaire *via* l'inhibition de la topoisomérase-I et un ciblage mitochondrial. La présente étude s'attache à évaluer la contribution respective de ces deux voies dans la promotion de l'apoptose induite par cette molécule dans différentes cellules cancéreuses. La LamD provoque l'apoptose nucléaire dans les cellules leucémiques sans arrêt prédominant du cycle cellulaire. Les signaux transmis par la LamD initient l'apoptose *via* la voie apoptotique intrinsèque. Cet agent induit l'activation conformationnelle de Bax et une réduction des taux d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et cIAP2, parallèlement à l'activation des caspases-3 et -9. Une petite molécule antagoniste de Bcl-2, HA14-1, augmente significativement l'apoptose causée par la LamD. Suite à l'exposition à la LamD, l'expression de Fas et de son ligand endogène Fas-L n'est pas modifiée dans les cellules leucémiques. De plus, des cellules leucémiques déficientes pour la caspase-8 ou pour FADD subissent l'apoptose à travers la voie apoptotique mitochondriale, indiquant que la mort cellulaire induite par la LamD est indépendante de la voie apoptotique extrinsèque. La LamD induit des dommages à l'ADN dépendant de son effet sur la topoisomérase-I et provoque la phosphorylation de l'histone H2AX, la surexpression de la protéine de réparation de l'ADN Rad51 et la forme phosphorylée sur la sérine 15 de p53. En utilisant plusieurs lignées de cellules cancéreuses, nous avons montré que le mécanisme de l'apoptose induit par la LamD est indépendant du statut p53 des cellules tumorales. Par ailleurs, la sensibilité à la LamD n'est abrogée ni par la cycloheximide ni dans les cellules énucléées (cytoplastes). Les expériences utilisant un système acellulaire d'apoptose démontrent que la libération de cytochrome-c induite par la LamD s'opère indépendamment de la présence de facteurs nucléaires. Ces résultats suggèrent que la LamD exerce ses effets cytotoxiques en induisant primitivement l'apoptose mitochondriale et ces effets peuvent être initiés indépendamment de toute signalisation nucléaire. Ainsi, la Lam-D constitue un nouvel agent pro-apoptotique qui pourrait dépasser certaines formes de chimiorésistance.

ESSENTIAL ROLE OF MITOCHONDRIA IN APOPTOSIS OF CANCER CELLS INDUCED BY THE MARINE ALKALOID LAMELLARIN D

Caroline Ballot*, Jérôme Kluza*, Alain Martoriati*, Ulrika Nyman**, Pierre Formstecher*, Bertrand Joseph**, Christian Bailly*,# and Philippe Marchetti*,+

*Inserm U837 and Faculté de Médecine, Université de Lille II 1 Place Verdun 59045 Cedex, France ;

** Department of Oncology-Pathology, Cancer Centrum Karolinska (CCK), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden ;

+ Plate-forme de Biothérapie, Centre de Bio-Pathologie, et Banque de Tissus, CHRU Lille, France

Current address : Institut de Recherche Pierre Fabre, 3 rue des satellites, BP94244, 31432 Toulouse, France.

Running title : mitochondria, DNA damage and Lamellarin D

Corresponding author: **Prof. Philippe MARCHETTI**
MD, PhD
INSERM U 837 Faculté de médecine
1, place Verdun F- 59045 Lille Cedex France
Tel : 33-3-20 62 69 52 Fax : 33-3-20 62 68 84
E-mail : philippe.marchetti@inserm.fr

Abbreviations: Lamellarin-D (Lam D); benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone (z-VAD.fmk); Benzyloxycarbonyl-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethylketone (z-YVAD.cmk); Benzyloxycarbonyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone; (z-VDVAD.fmk) Benzyloxycarbonyl-Val-Glu-Val-Asp-chloromethylketone (z-DEVD.cmk); Benzyloxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-fluoromethylketone (z-IETD.fmk); Benzyloxycarbonyl- Leu-Glu-His-Asp-fluoromethylketone (z-LEHD.fmk); cytochrome c (Cyt c); Fas-associated protein with death domain (FADD)

This work received a financial support from INSERM, UNIVERSITE DE LILLE II and the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité du Nord) (to PM). CB was recipient of grant from INSERM-Région Nord Pas de Calais. JK received a fellowship from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

Abstract: Lamellarin D, a potent cytotoxic marine alkaloid, exerts its antitumor action through two complementary pathways: a nuclear route via topoisomerase I inhibition and a mitochondrial targeting. The present study was designed to investigate the contribution of these two pathways for apoptosis in cancer cells. LamD promoted nuclear apoptosis in leukemia cells without prominent cell cycle arrest. Signals transmitted by LamD-initiated apoptosis via the intrinsic apoptotic pathway. The drug induced conformational activation of Bax and decreased the expression levels of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and cIAP2 in association with activation of caspase-9 and caspase-3. A small molecule Bcl-2 antagonist, HA14-1, significantly enhanced LamD-mediated apoptosis. Upon LamD exposure, Fas and Fas-L expression was not modified in leukemia cells. Moreover, caspase-8 or FADD-deficient leukemia cells underwent apoptosis through the typical mitochondrial apoptotic cascade indicating that cell death induced by Lam D was independent of the extrinsic apoptotic pathway. LamD also exerted a topoisomerase I-mediated DNA damage response resulting in H2AX phosphorylation, upregulation of the DNA repair protein Rad51 and p53 as well as its phosphorylation at serine 15. However, apoptosis was independent of the p53 status of the tumor cells. Furthermore, sensitivity to LamD was abrogated neither by cycloheximide nor in enucleated cells. Cell-free system experiments indicate that LamD-induced cytochrome c release occurs independently of nuclear factors. These results suggest that LamD exerts its cytotoxic effects primarily by inducing mitochondrial apoptosis independently of nuclear signaling. Thus, LamD constitutes a new pro-apoptotic agent that may bypass some forms of drug resistance.

Introduction

Lamellarins represent a family of hexacyclic pyrrole alkaloids originally derived from marine invertebrates and have been shown to exert a wide spectrum of pharmacological activities, with one of the most promising being the antineoplastic effect (1). Among lamellarins, the natural compound Lamellarin D (Lam D, Fig 1A) was shown to inhibit a large panel of tumour cell types *in vitro*. At doses in the micromolar range, Lam D exhibits high apoptotic activities in leukemia cell lines (2;3). We have shown that upon exposure, Lam D led to dissipation of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), release of cytochrome c from mitochondria, caspase-3 activation, and ultimately to apoptotic cell death (2). Increasing evidence suggests that the pro-apoptotic effects of Lam D can result from several mechanisms. Lam D has first been described to inhibit nuclear topoisomerase I (4). *In vitro*, Lam D induced DNA cleavage with an efficiency just slightly lower than the prototype topoisomerase I inhibitor camptotecin (5). Structure-activity studies indicate a good correlation between topoisomerase I inhibition and cytotoxicity of Lam D derivatives leading to the suggestion that one of the pro-apoptotic targets of Lam D is in the cell nucleus (5). Nevertheless, its role in apoptosis yet needs to be demonstrated. Interestingly, topoisomerase I-mutated cancer cells are not totally resistant toward Lam D-induced apoptosis suggesting that induction of apoptosis could depend on other intracellular targets. We have previously reported strong evidences that Lam D and its amino synthetic derivative PM031379 can trigger apoptosis in leukemia cells through a direct increase in mitochondrial permeability (2). These results were obtained using a cell-free system of apoptosis in which supernatants of purified mitochondria treated with Lam D were mixed with isolated nuclei. However, we cannot conclude that apoptosis in intact cells result exclusively from this direct action on mitochondria. Moreover, recently, several kinases relevant for cancer signaling have also been demonstrated as new targets for Lam D (6). Thus, despite this growing knowledge on the

intracellular targets of Lam D, how Lam D triggers a series of events that lead to cell death still deserves further investigation.

The cytotoxic effects of many anticancer drugs are mediated via apoptotic pathways. Most of the conventional anticancer treatments, including chemotherapeutic drugs and irradiation, are thought to induce cell death of cancer cells through activation of the mitochondria-dependent pathway of apoptosis, a pathway often found altered in drug-resistant cancer cells (7). In most cases, chemotherapeutic drugs generate cell death signals within the cell. They first interact with an intracellular target resulting in stress signals that secondary converge to mitochondria and finally result in apoptotic cell death. The best known intracellular target of conventional anticancer drugs is nuclear DNA. Numerous cytotoxic agents, including topoisomerase I and II inhibitors, primary damage nuclear DNA and thereby generate genotoxic stress. As a consequence, DNA insults, in the absence of efficient repair, lead to cell apoptosis through activation of complex molecular cascades (8). Among them, the tumor suppressor protein p53 is at the center of the process coupling DNA damage to the initiation of apoptosis. In response to DNA insults, intracellular levels of p53 increase and promote the transcription of several pro-apoptotic genes of the Bcl-2 family such as the BH3-only genes, Noxa, Puma and Bax (8). Additionally, the translocation of p53 from the nucleus to the mitochondria in a transcription-independent manner is associated with cell death (9).

Following a first nuclear insult generated by conventional treatments, cancer cells can secondary entry into apoptosis (8). In response to the stress signal, mitochondria are activated and the permeability of their membranes to pro-apoptotic proteins is increased which in turn initiate the caspases cascade and finally result in cell death. The ratio of pro-apoptotic (e.g. Bax, Bak, Noxa, Puma) and anti-apoptotic members (e.g. Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1) of the Bcl-2 family probably determines the sensitivity of cells to an apoptotic signal by affecting the permeability of mitochondrial membranes (10). Thus, the expression level of anti-apoptotic

Bcl-2 proteins correlates with the resistance to a large spectrum of chemotherapeutic agents (10). One subset of pro-apoptotic Bcl-2 family members are called the BH3-only proteins (e.g. Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa) and these serve as sensors of both extrinsic (death receptor) and intrinsic (DNA damage, oxidative stress) death stimuli. Elevated expression of the BH3-only proteins favors activation of the pro-apoptotic proteins Bax and Bak and subsequently cell death (11).

In this paper, we examined the molecular circuits through which Lam D promotes cancer cell apoptosis. In particular, we investigated the apoptotic pathway triggered by Lam D in leukemia cells and the role of the cell nucleus in Lam D-induced apoptosis. In addition, we sought to determine if Lam D induction of apoptosis can constitute an advantage to overcome chemoresistance in cancer cells. An understanding of the mechanisms by which Lam-D causes apoptosis would permit to identify the most valuable molecularly-targeted strategy for drug development.

Material and Methods

Chemicals

Camptothecin (CPT) was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA) and Lamellarin D (Lam D) was synthesized at Pharmamar (Madrid, Spain). Several caspase inhibitors were used: the pan-caspase inhibitor Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone (z-VAD.fmk; 50 μ M; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), the caspase-1 inhibitor Benzyloxycarbonyl-Tyr-Val-Ala-Asp--chloromethylketone (z-YVAD.cmk; 50 μ M; Bachem, Basel, Switzerland), the caspase-2 inhibitor Benzyloxycarbonyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (z-VDVAD.fmk; 50 μ M; Calbiochem, Chemicon International, Inc., Temecula, CA), the caspase-3 inhibitor Benzyloxycarbonyl-Val-Glu-Val-Asp-chloromethylketone (z-DEVD.cmk; 50 μ M; Pharmingen BD Biosciences San Jose, CA), the caspase-8 inhibitor Benzyloxycarbonyl-Ile-Glu-Thr-Asp-fluoromethylketone (z-IETD.fmk; 50 μ M; Pharmingen BD Biosciences San Jose, CA), and the caspase-9 inhibitor Benzyloxycarbonyl-Leu-Glu-His-Asp-fluoromethylketone (z-LEHD.fmk; 50 μ M; Pharmingen BD Biosciences San Jose, CA). The dye Hoechst 33342 was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM Molecular Probes). The other compounds were purchased from Sigma.

Cell lines, culture conditions and transfections

Mouse leukemia P388 cell line and P388 CPT5, its topoisomerase I-mutated subclone (kindly provided by Pr. J-F. Riou, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France) were routinely cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 2mM L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, 0.1% β mercaptoethanol and 10% heat-inactivated FCS. Cell density was kept at levels allowing exponential growth (~ 250,000/ml). P388 cells were transfected with the pcDNA3.1/CT-GFP vector expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) alone (control cells) or cotransfected with human bcl-2 (kindly provided by Dr R.R.

Polakowska, INSERM U-837, Lille, France) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were transfected in 48 well plates (20×10^3 cells per well) in RPMI medium without serum, according to the manufacturer's instructions. After 4 h incubation, cells were washed and re-fed with a regular complete medium. After 24 h of incubation, cells were examined under the fluorescence microscope to check for the efficiency of transfection ($> 30\%$) and then incubated with 5 μ M Lam D. At 24 h post-treatment, cells were harvested and cytopins were prepared prior to staining with Hoechst 33342. Human colon carcinoma HCT116 cell lines wild type HCT116-p53^{+/+} and its p53 null derivative HCT116-p53^{-/-} (a generous gift from Dr B. Vogelstein, Johns Hopkins University, Baltimore, USA) were cultured and maintained in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2mM L-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Osteosarcoma Saos-2 cells were grown as previously described (12). Wild type Jurkat cells, Jurkat I 9.2 (caspase-8 deficient Jurkat) and Jurkat I 2.1 (FADD-deficient Jurkat) were from the ATCC and routinely cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml).

Generation of enucleated cells (cytoplasts)

P388 cells (2×10^7 /ml) were cultured in the presence of 10 μ g/ml cytochalasin B and 20 U/ml of DNase for 45 min at 37°C following procedures described previously (13), with minor modifications. The cell suspension was layered onto a discontinuous Ficoll (Pharmacia) density gradient (2 ml of 25%, 2 ml of 17%, 0.5 ml of 16%, 0.5 ml of 15% and 2 ml of 12.5% Ficoll in complete medium containing 7.5 μ g/ml cytochalasin B and 40 U/ml of DNase pre-equilibrated in ultracentrifuge tubes at 37°C in a CO₂ incubator for 24h). Gradients containing cell suspensions were centrifuged in a prewarmed SW41 rotor (Beckman) at 25,000 rpm for 30 min at 30°C. Cytoplasts were collected from the interface between 15 and 17% Ficoll layers, washed in complete medium (supplemented with insulin transferrin and

selenium) and cultured overnight at 37°C before treatment with 50µM Lam D for 14h. Cells were then stained with TMRM or FITC-VAD.fmk for 20 min prior to the cytofluorometric analysis.

Determination of nuclear apoptosis

The frequency of hypoploid (sub-G1) cells was assessed using FACS analysis as previously described (14). The morphological characteristics of nuclear apoptosis were evaluated using the Hoechst 33342 dye. Cells were stained with 5 µg/ml Hoechst 33342 for 10 min at room temperature and slides were mounted in 50% glycerol in PBS prior to analysis under fluorescence microscope (DMR, Leica). DNA fragmentation was determined by agarose gel electrophoresis as previously described (15).

Caspase activity assay

The activity of caspases was determined with specific pro-luminescent substrates; z-DEVD coupled to amino luciferin for DEVDase (caspase-3) using Caspase-Glo 3/7 luminescent kit, z-VDVAD coupled to amino luciferin for VDVADase (caspase-2) using Caspase-Glo 2 luminescent kit, z-IETD coupled to amino luciferin for IETDase (caspase-8) using Caspase-Glo 8 luminescent kit, and z-LEHD coupled amino luciferin for LEHDase (caspase-9) using Caspase-Glo 9 luminescent kit. All kits were from Promega Corp. (Madison, WI, USA). Caspase activity was measured in triplicate following the manufacturer's instructions. Briefly, after drug exposure, P388 cells (20000/well) were incubated with the Caspase-Glo Reagent in a white 96-well plate at 37°C for 90 min before recording luminescence with a Lumicount luminometer (Packard Instrument Company, Meriden, CT).

Immunoblot analysis

Whole cell lysates were prepared as previously described (14). Equal protein quantities (50 µg) were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Membranes were blocked in 5% powdered milk in TBS Tween 0.05% for 1 h at room temperature and

then incubated with primary antibodies specific for PARP1/2 (1:500, Santa Cruz, H-250), Puma (1:1000, Cell Signaling), Noxa (1:1000, Pro-science), Bid (1:250, Santa Cruz, C-20), Bad (1:1000, Sigma), Bim (1:1000, Sigma), Bax (1:500, Santa Cruz, N20), Bcl-2 (1:500, Santa Cruz, Δ c21), Mcl-1 (1:5000, Rockland), Bcl-xl (1:1000, Sigma, 2H12), caspase-9 (1:500, Santa Cruz, H-83), cleaved caspase-3 (1:500, Cell signaling, 5A1), caspase-2 (1:500, Santa Cruz, H-145), caspase-8 (1:500, Santa Cruz, D-8), XIAP (1:500, Stressgen, 2F1), cIAP2 (1:500, Santa Cruz, H-85), survivin (1:250, Santa Cruz, D-8), Fas-L (1:500, Santa Cruz, C-178), Fas (1:500, Santa Cruz, A20), GADD45- α (1:500, Santa Cruz, C-4), p21 (1:500, Santa Cruz, F-5), p53 (1:500, Santa Cruz, FL-393) and phospho-p53 (Ser 15) (1:1000, Cell Signaling). Secondary HRP-conjugated antibodies (BioRAD) were used at 1:2000 for 1 h at room temperature, and detection was carried out by enhanced chemiluminescence. Immunoblots with anti-actin (1:5000, Sigma) or anti-G3PDH antibodies (1:2000, Trevigen, Gaithersburg MD, USA) were used for standardization of protein loading. Alternatively, for analysis of cytochrome c release, cytosolic fractions were prepared using a method that has been described previously (16).

Cytofluorometric analysis of mitochondrial apoptotic events

To evaluate mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$), cells (5×10^5 /ml) were incubated for 20 min at 37°C with tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM; 125nM in PBS) ($\lambda_{em} = 573$ nm). Samples were stored on ice prior to cytofluorometric analysis on a FACScan cytofluorometer (Becton Dickinson). Control experiments were performed in the presence of 20 μ M carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (mCICCP) (1h, 37°C), an uncoupling agent that abolishes the $\Delta\psi_m$. For flow cytometric analysis of Bax activation, we used a procedure described elsewhere (15).

Immunofluorescence microscopy of p53

P388 cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min and washed twice in PBS. Cells were further permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min and washed twice in PBS with 2% FCS before incubation with a rabbit anti-p53 antibody (1:100; Santa Cruz, sc-6243) on ice overnight. After three washes in PBS, cells were incubated with AlexaFluor488-conjugated anti-rabbit antibody (1:500, Molecular Probes) for 1h at room temperature. The cells were washed three times in PBS and Hoechst 33342 dye was used for fluorescence counterstaining of nuclei. All samples were viewed and photographed with a fluorescence microscope (DMLR, Leica).

γH2AX analysis

The H2AX Phosphorylation Assay kit (Upstate, Charlottesville, VA) was used following the manufacturer's instructions. After drug exposure, P388 and P388 CPT5 cells (5×10^5 /ml) were washed twice, fixed and permeabilized. Cells were stained for 30 min at 4°C in the dark with the anti-phospho-histone H2AX-FITC conjugate, which recognizes H2AX phosphorylated at serine 139, or with normal mouse IgG conjugate as control. Cells were washed three times before counterstaining with propidium iodide (PI) for analysis of cell cycle as previously reported (16). Fluorescence was measured by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA). Logarithmic FITC fluorescence was plotted versus linear PI fluorescence, as described (17).

Cell free system

Nuclei and mitochondria were isolated from rat liver following a method previously described (13). Mitochondria (25 μg of protein) and/or nuclei (10×10^6) were resuspended in 50 μl of reaction buffer containing 20mM Hepes pH 7.4, 10mM KCl, 2mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM DTT, 250mM sucrose, 10mM succinate, 2mM ATP, 10mM creatine phosphate, 50 μg/ml creatine kinase, and protease inhibitor cocktail (Sigma). The reaction mix was exposed

to drugs at 37°C for 3h after which mitochondria and nuclei were removed by centrifugation at 12500 x g for 10 min at 4°C. Supernatants were kept at – 80°C until immunoblot analysis.

Results

Cell cycle distribution and nuclear apoptosis induced by Lam D in P388 cells

We previously reported that Lam D triggered the commitment step of the mitochondrial apoptotic cascade in leukemia cells (2). It was characterized by a rapid $\Delta\psi_m$ disruption followed by the appearance of a hypoploid DNA content (sub-G1) peak, a classical feature of late apoptosis, within 24 h. This pro-apoptotic effect was observed at the micromolar range of Lam D (Fig 1B and C). Thus, at 1 or 5 μ M, concentrations compatible with an *in vivo* antitumor activity (2), Lam D provoked a time-dependent accumulation of P388 lymphocytic leukemia cells in sub-G1 (Fig 1B). In parallel, we observed that Lam D at doses of 1 or 5 μ M induced typical internucleosomal DNA fragmentation, a hallmark for apoptosis (Fig 1C). Similar results were obtained when human Jurkat T lymphoma cells were incubated with Lam D (data not shown). At lower doses (< 0.5 μ M), we have previously demonstrated that Lam D can perturb cell cycle distribution with a marked arrest of the cells in S and G2/M phase, a phenomenon presumably attributable to its inhibition of topoisomerase I (3;4). The G2/M arrest induced by 0.2 μ M Lam D was not followed by any increase of cells in sub-G1 (Fig 1B) even after protracted exposure (less than 10% sub-G1 after 96h of exposure). To evaluate the effect on cell cycle induced by pro-apoptotic concentrations of Lam D, P388 leukemia cells were incubated with 5 μ M Lam D for different periods of time and analyzed by flow cytometry (Fig 1D). The appearance of cells in sub-G1 was not preceded by a prominent cell cycle arrest, although a slight increase of cells in S phase was observed after 14 h of incubation with Lam D. During apoptosis, activated effector caspases cleave various substrate proteins, including the nuclear enzyme PARP (18). We therefore assessed the effects of Lam D on PARP by immunoblotting (Fig 1E). Lam D promoted PARP cleavage, inducing the p85 proteolytic product. PARP cleavage was totally impeded by culturing P388 cells with the pan-caspase inhibitor z-VAD.fmk. Similar protection was observed when apoptosis was detected

by the % of cells in sub-G1 (2). Taken together, these results suggest that micromolar doses of Lam D may induce caspase-mediated apoptosis of leukemia cells, independently of cell cycle arrest.

Activation of the intrinsic caspase cascade in Lam D-induced cell death

To explore which caspases might be involved in Lam D-induced cell death in P388 cells, we analysed caspases processing by immunoblotting using antibodies recognizing caspase-8 (the apical caspase of the extrinsic pathway), caspase-9 (the apical caspase of the intrinsic pathway), caspase-2 (the initiator caspase of apoptosis induced by cellular stress, including DNA damage) and caspase-3 (the downstream effector caspase). Lam D induced cleavage of pro-caspase-9 as observed by appearance of several bands of lower molecular weights (Fig 2A). The time-dependent processing of caspase-9 was followed by the processing of caspase-3, occurring after 18 h of treatment with Lam D. This result was consistent with the canonical concept of the intrinsic pathway placing caspase-3 downstream of caspase-9. In contrast to caspase-9 and -3, incubation of cells with Lam D failed to process caspase-8 and -2 efficiently. To be able to correlate the processing of caspases (Fig 2A) with their activity, we next used the AMC-based peptide caspase substrates that act as fluorogenic indicators for caspase activities. The substrates Ac-DEVD.AMC (caspase-3/-7) and Ac-LEHD.AMC (caspase-9) were significantly cleaved by proteases activated in Lam D-treated P388 cells in a dose dependent manner (Fig 2B, left panels), confirming the results of immunoblot assays (Fig 2A). We also detected a weak IETDase activity after Lam D exposure, but could not detect any VDVDase (caspase-2) activity (Fig 2B, right panels). The Lam D-induced DEVDase and LEHDase caspase-like activities were markedly inhibited in the presence of the corresponding tetrapeptide caspase-specific inhibitor, demonstrating the specificity of these results. This was not observed for IETDase activity, questioning the validity of fluorimetric detection of caspase-8 activity in our model. The pre-treatment of cells with the pan-caspase

inhibitor z-VAD.fmk was also effective against Lam D-induced caspase-9 and -3 activities, as it was against Lam D-induced nuclear apoptosis (Fig 1E). Together, these results clearly implicate the involvement of the intrinsic caspase cascade in Lam D-triggered apoptosis.

Lam D promotes apoptosis through activation of mitochondria

Lam D induces mitochondrial membrane permeability as indicated by the release of cytochrome c from mitochondria and loss of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) (2). To determine the molecular orders between Lam D-mediated apoptotic events, leukemia P388 cells were pretreated with a panel of caspase inhibitors (z-VAD.fmk, z-VDVAD.fmk, z-IETD.fmk, z-LEHD.fmk and z-DEVD.cmk) and apoptotic events was assessed using the determination of $\Delta\psi_m$ and cells in sub-G1 (Fig 3A). z-DEVD. fmk, z-LEHD. fmk and the pan caspase inhibitor z-VAD.fmk largely suppressed Lam D-induced sub-G1 providing evidence that both caspase-3 and caspase-9 are functionally involved in Lam D-mediated apoptosis. However, in the same conditions, none of the caspase inhibitors succeeded to inhibit the Lam D-induced drop in $\Delta\psi_m$ (Fig 3A), nor did the pan-caspase inhibitor z-VAD.fmk inhibit the release of cytochrome c from the mitochondria (Fig 3B). Lam D-induced apoptosis was not inhibited by the broad-spectrum aspartyl and serine protease inhibitors pepstatin and PMSF, when used at their optimal concentrations (data not shown), confirming that only caspases were involved in Lam D-mediated apoptosis. These data indicate that the Lam D-induced caspase cascade (caspase-9 then caspase-3) operates downstream of mitochondria in P388 leukemia cells. To further determine whether Lam D triggers apoptosis essentially through the intrinsic pathway, experiments were performed to explore the role of Bcl-2, a suppressor protein of the mitochondrial intrinsic pathway of apoptosis. Therefore, P388 leukemia cells were transiently transfected with a plasmid encoding Bcl-2 protein or the plasmid lacking cDNA insert (as control) (19), treated with Lam D and scored for cells displaying apoptotic nuclei using Hoechst staining. As shown in figure 3C (right panel), treatment of control cells

by Lam D resulted in significant nuclear apoptosis (condensation) as compared to untreated cells. However, Lam D-induced nuclear apoptosis was markedly reduced in P388 cells overexpressing Bcl-2 (Fig 3C, right panel). Although cell death was slightly delayed in Lam D-treated cells expressing Bcl-2 (Fig. 3C, left panel, black squares and triangles), the number of viable cells after Lam D-treatment (Fig. 3C, left panel, squares and triangles) still decreased over time irrespectively of Bcl-2 expression level (Fig 3C left panel, and data not shown).

We next determined the ability of a small molecule Bcl-2 inhibitor, HA14-1, to reverse the effects of Bcl-2 on Lam D-induced nuclear apoptosis and drop in mitochondrial $\Delta\psi_m$. P388 cells synergistically incubated with 10 μ M HA14-1 and Lam D for 24 h had higher levels of cells in sub-G1 (Fig 3D, rings) and a more pronounced drop in $\Delta\psi_m$ (Fig 3D, bars) than those treated with Lam D alone (Fig 3D). Consistent with the results from cell-free system experiments (2;15), these data indicate that apoptosis induced by Lam D strongly relies upon mitochondria and mitochondrial proteins. Altogether, these data support the contention that Lam D triggers the intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis, which can be modulated by Bcl-2 protein.

The Fas-dependent extrinsic pathway is not required for Lam D-induced apoptosis

Several anticancer drugs were shown to activate both the intrinsic, mitochondria-mediated pathway as well as the extrinsic, death receptor-mediated pathway of apoptosis, particularly in leukemia cells (20). Therefore, we cannot exclude the existence of a pleiotropic mechanism for the pro-apoptotic influence of Lam D. Consequently, we tested whether the apoptotic response triggered by Lam D also involves the activation of the extrinsic death receptor pathway. Since it has been shown that some DNA-damaging drugs, including camptothecin, increase the expression of the death receptor Fas and its ligand, FasL, at the surface of cancer cells (21), we first tested whether we could see any change in the expression of Fas and FasL

after Lam D treatment. Time-course immunoblot analysis revealed that both Fas and FasL protein levels were not elevated after Lam D treatment (Fig 4A). Anticancer drugs can also activate the Fas pathway intracellularly by promoting the recruitment of Fas-associated protein with death domain (FADD) to Fas and thereby favour caspase-8 activation independently of any change in Fas/FasL expression (22). Thus, to determine whether the Fas pathway was required for Lam D-induced apoptosis, we used human Jurkat T leukemia cells lacking the caspase-8 adaptor protein FADD (FADD^{-/-}), and Jurkat cells deficient of caspase 8 (caspase-8^{-/-}). These cells were exposed to 5 μ M Lam D and the percentage of cells in sub-G1 was compared to the parental cell line (wild type Jurkat) (Fig 4B). As expected, lack of either FADD or caspase-8 abrogated apoptosis induced by the Fas agonistic monoclonal antibody CH-11 (Fig 4B, white bars). In contrast, Lam D promoted apoptosis in FADD^{-/-} cells as well as in caspase-8^{-/-} cells. Moreover, there was no significant difference in the kinetics or dose response of apoptotic death induction by Lam D when comparing FADD^{-/-} cells, caspase-8^{-/-} cells and wild-type Jurkat cells (data not shown). In addition, $\Delta\psi_m$ dissipation and mitochondrial cytochrome c release were observed in FADD^{-/-} cells and caspase-8^{-/-} cells after treatment with Lam D (Fig 4C), substantiating the prominent role of mitochondria (and the intrinsic apoptotic pathway) in the orchestration of Lam D-induced cell death. These results support the hypothesis that apoptosis in response to Lam D can occur independently of activation of the Fas/FasL death receptor pathway.

Lam D down-regulates expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and cIAP2, and activates the pro-apoptotic protein Bax in P388 cells

Because Bcl-2 protein is a critical regulator of Lam D-induced apoptosis (Fig 3C and D), we investigated the expression of Bcl-2 family members by immunoblotting at 2, 4, 8 and 18h of Lam D exposure (i.e. before completion of nuclear apoptosis). Figure 5A shows that the levels of the pro-apoptotic proteins Puma, Noxa, Bid, Bim and Bad were not modified after

treatment with 5 μ M Lam D, excluding a role of these proteins in apoptosis induced by Lam D. Although no up-regulation of Bax was found after Lam D exposure in P388 cells (Fig 5A), using a specific antibody which recognizes the mitochondrial-bound active form of Bax we observed that Lam D exposure leads to significant Bax activation in a time and dose dependent manner (Fig 5B). P388 leukemia cells expressed basal levels of the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1 and Bcl-xl proteins (Fig 5A) and Lam D induces a time-dependent reduction in the steady-state level of Bcl-2 beginning within 8h of treatment. A band corresponding to the full-length Bcl-2 disappeared but no cleaved fragments could be detected (Fig 5A). The effect of Lam D on expression of Bcl-2 was caspase-dependent since pre-treatment of P388 cells with z-VAD.fmk maintained a high level of Bcl-2 expression (Fig 5A). Conversely, Lam-D did not modulate the expression of Bcl-xl or Mcl-1. These results suggest that Lam D shifts the balance of Bcl-2-related anti- and pro-apoptotic proteins to favor apoptotic demise.

The IAP-family members XIAP, cIAP1, cIAP2 and survivin are anti-apoptotic proteins which inhibit caspases directly (23). These IAPs are expressed at high levels in P388 leukemia cells (Fig 5C). Notably, Lam D-induced caspase-9 and -3 activation correlated with a reduction in level of the inhibitor cIAP2, detected already 4 h post-Lam D exposure (Fig 5C). The Lam D-mediated reduction in cIAP2 levels was specific since the level of other IAPs such as XIAP and survivin remained unchanged (Fig 5C).

DNA damage responses following exposure to Lam D

Topoisomerase I inhibitors like camptothecin are known to cause DNA damage, involving the formation of double-strand DNA breaks which are recognized as deleterious lesions and trigger apoptosis (for review (24)). To explore DNA damage induced by Lam D, we used flow cytometry to detect the phosphorylated form of histone H2AX (γ H2AX), which is a good indicator of double-strand DNA breaks in chromatin. Cells were stained with PI for cell

cycle analysis to correlate expression of γ H2AX with cell cycle position using a multiparameter analysis (γ H2AX vs. DNA content) (Fig 6A). P388 cells exposed to Lam D displayed a significant increase in γ H2AX fluorescence (from 4% (control) to 55%) after a short incubation time (within 15 min) with a high response at 60 min (74%) (Fig 6A). Nearly identical changes in DNA damage as induced by Lam D were observed for cells treated with the prototype DNA topoisomerase I inhibitor, camptothecin (Fig 6A). It is evident from these multiparameter analyses that the Lam D-induced increase in γ H2AX expression was most prominent for cells in S-phase, a situation classically observed in response to topoisomerase I inhibitors ((25) and Fig 6A). In contrast, Lam D, as well as camptothecin, did not have any nuclear effect on the topoisomerase I-mutated cells, P388 CPT5 (Fig 6A), even upon long-term exposure (data not shown). Under these conditions, the double-strand breaks repair protein Rad51 was induced by Lam D at 8 hours exclusively in wild-type P388 cells (Fig 6B). Collectively, these data indicate that Lam D may act as a classical nuclear topoisomerase I inhibitor to promote DNA damage and repair in P388 cells.

Role of p53 in Lam D-induced apoptosis

The tumor suppressor p53 is generally activated in response to DNA damage in cancer cells. As shown in figure 6C, incubation of P388 cells with Lam D resulted in a time-dependent increase in the basal expression of p53 protein. Conversely, such increase in p53 expression was not observed in topoisomerase I- mutated cells P388 CPT5. Furthermore, we analyzed the subcellular localization of p53 by immunofluorescence microscopy (Fig. 6D). Compared to control cells, Lam D triggered a significant increase in p53 expression compatible with immunoblot results (Fig 6C and D). After Lam D treatment, p53 predominantly accumulated in the nucleus since no p53 immunoreactivity was detected in the cytoplasm or in mitochondria (Fig 6D). This nuclear accumulation was more evident in P388 cells with apoptotic morphology such as chromatin and cytoplasmic condensation. Moreover, incubation

of P388 cells with Lam D resulted in phosphorylation of p53 at Ser 15 (Fig 6D, right panel). Despite p53 phosphorylation at Ser15 and an increased level of nuclear p53 upon Lam D treatment, the p53-inducible gene products Puma, Noxa, Bax (Fig 5A), GADD45 and p21 (Fig 6E) were not induced in P388 cells, confirming that the P388 cell line does not produce a fully functional p53 protein (26). Consistent with these data we found that pifithrin- α , a chemical inhibitor of p53 transcriptional activity, was unable to impede apoptosis triggered by Lam-D in P388 cells (data not shown). However, we cannot rule out a role for p53 in Lam D-induced apoptosis since transcription-independent pro-apoptotic functions of p53 have been previously described (27). Thus, to complete these findings for the implication of p53 in Lam D cytotoxicity, we tested the pro-apoptotic effect of Lam D on cancer cell lines possessing different p53 status (Fig 7A and B). The wild type HCT116 TP53^{+/+} colon carcinoma cells, as well as the HCT116 TP53^{-/-} cells, having a disrupted p53 gene due to homologous recombination, both displayed a reduction in mitochondrial $\Delta\psi_m$ and an increased number of cells in sub-G1 upon Lam-D exposure (Fig 7A). However, it is to note that the kinetic and extent of sub-G1 were more pronounced after Lam D exposure in TP53^{+/+} cells suggesting that a functional p53 pathway might participate to Lam D-mediated apoptosis in HCT116 cells. The p53-null SAOS2 osteosarcoma cells were also sensitive to Lam D-induced apoptosis (Fig 7B). In strict contrast, the topoisomerase I inhibitor camptothecin was unable to kill p53-null SAOS2 cells. Indicating that camptothecin requires p53 to trigger the mitochondrial apoptotic pathway in these cells. Altogether these results indicate that intact p53 is not necessary for the apoptotic response triggered by Lam D.

We next examined the possibility that protein synthesis could be required for apoptosis following topoisomerase I-mediated DNA damage. Inhibition of protein synthesis by cycloheximide did not affect the appearance of nuclear and mitochondrial signs of apoptosis upon Lam D exposure (Fig 7C), whereas a significant inhibition was observed for the

dexamethasone-induced apoptosis, used as control, in P388 cells (Fig 7C). Finally, we studied the requirement of cell nucleus in Lam D-induced apoptosis. Hence, enucleated P388 cells (cytoplasts) was generated. Upon Lam D-treatment, both intact and enucleated P388 cells or cytoplasts displayed a loss of mitochondrial $\Delta\psi_m$ to the same extent (Fig 7D, left panel). Moreover, Lam D not only reduced the $\Delta\psi_m$ in intact cells and cytoplasts, but also triggered caspase activity irrespective of the presence of nucleus (Fig 7D, right panel). To further document that the cell nucleus was dispensable for the triggering of Lam D-induced apoptosis, we performed experiments using a cell-free system consisting of purified mitochondria combined with isolated P388 cell nuclei exposed to Lam D. Consistent with our previous data (2), Lam D directly stimulated cytochrome c release from isolated mitochondria in a dose dependent manner, even in the absence of nuclei (Fig 7E). As a control, the DNA damaging drug etoposide (10 μ M) needed the presence of nuclei to promote mitochondrial release of cytochrome c in this reconstituted cell free system. Together, these results demonstrate that apoptosis induced by Lam D is strictly dependent of mitochondria and can occur without protein synthesis and nuclear involvement.

Discussion

Almost a decade ago, the discovery of the antitumor activity of lamellarin D encouraged molecular studies aimed at deciphering how this natural product and synthetic derivatives were able to inhibit the growth of different cancer cells. This growth inhibition involves both decreased cell division (4) and induction of apoptosis (2), and it appears that these two antitumor actions are dose dependent. When used at very low doses (nano molar range), Lam D did not kill cancer cells but induced an accumulation of cells in S and G2/M phases, dependent on its inhibition of topoisomerase I (Fig 1B and (2)). Conversely, at higher doses of Lam D (micro molar range compatible with the xenograft assays (28)), leukemia cells displayed a potent apoptotic response without major effects on cell cycling (2). In cancer, the therapeutic goal is to trigger tumor-selective cell death (29) and the response of tumors to therapy mainly depends on their ability to undergo cell death (29). Over the last decades, the role of apoptosis in the cytotoxicity of anticancer drugs has become clearer (7). Different classes of anticancer drugs exert their cytotoxicities through a variety of primary molecular targets to ultimately complete cell death via common signaling pathways such as the death receptor–dependent (extrinsic) and mitochondria-dependent (intrinsic) pathways (29). Emerging evidence indicates that Lam D is targeted to different intracellular compartments. Lam D may function in the nucleus to inhibit topoisomerase I (4) as well as in the mitochondria resulting in mitochondrial membrane destabilization and leakage of cytochrome c (2). In principle, by hitting both targets, Lam D treatment might lead to apoptosis. The goal of this paper was to identify how Lam D promotes apoptosis of cancer cells, and to define the role of each target in this process.

Our data clearly indicate that Lam D activates the intrinsic, mitochondria-dependent apoptotic pathway in cancer cells. This is based on several evidences: (i) proteolytic activation of caspase-9, (ii) induction of caspase-independent cytochrome c release, (iii) modulation (via

overexpression or pharmacological inhibition) of the Bcl-2 protein influences the level of apoptosis induced by Lam D, and (iv) Lam D-induced cell death occurs independently of the extrinsic death-receptor mediated pathway. These observations are in agreement with our previous results defining mitochondria as the pro-apoptotic target for Lam D (2). We considered the possibility that Lam D by reducing the expression of anti-apoptotic proteins (*e.g.* Bcl-2) favors apoptosis through amplification of the mitochondria-dependent pathway. We observed a reduced expression of the Bcl-2 protein associated with a conformational activation of Bax. These Bcl-2 family proteins normally function to control the mitochondrial release of cytochrome c (11). However, our results show a reduction in Bcl-2 level long after the onset of cytochrome c release (2). Based on these results, we can assume that caspase-mediated cleavage of Bcl-2 represents a feedback loop for the amplification of mitochondrial cytochrome c release during Lam D-induced apoptosis. In addition to Bcl-2 family proteins, we also noticed that Lam D reduced levels of cIAP2, a molecule belonging to another family of anti-apoptotic proteins, so called IAP. IAP family members are generally overexpressed in cancer and their down-regulation contributes to an increased sensitivity to chemotherapeutic drugs. cIAP2 inhibits caspase-9 and caspase-3, thereby blocking the intrinsic caspase cascade downstream of mitochondria. It is conceivable that the capacity of Lam D to activate the intrinsic pathway downstream of mitochondria was also amplified by its inhibitory effect on cIAP2. The mechanisms of cIAP2 reduction were independent of caspases (data not shown). cIAP2 is subjected to regulation by the second mitochondrial activator of caspase (Smac/Diablo), a protein that is released from mitochondria during apoptosis (23). So, it is possible that the reduced levels of cIAP2 might be a downstream consequence of mitochondrial membrane permeabilization, and hence the release of Smac/Diablo. Further studies should clarify the mechanisms responsible for cIAP2 reduction.

The nucleus offers a panel of potential targets for anticancer drug design. Most conventional chemotherapeutic drugs are nucleus-targeted (genotoxic) agents which have been designed to interact with DNA or DNA-associated proteins such as topoisomerases (30). These anticancer drugs damage the nucleus and cause cellular responses including cell cycle arrest, activation of repair processes and apoptosis (30). Since Lam D has been described as a potent inhibitor of topoisomerase I (4), we explored the signal transduction pathways dependent on topoisomerase I and activated by Lam D. As a true topoisomerase I inhibitor, Lam D induced a time-dependent DNA damage response assessed by staining for γ -H2AX and Rad51 in P388 cells. In response to Lam D-induced DNA damages, levels of activated, Ser15 phosphorylated, p53 rise markedly. Immunoblotting analysis of downstream targets of p53, including GADD45, P21, Bax, Puma and Noxa, did not reveal any significant increases in protein expression. One possible explanation is that P388 cells do not respond to p53-mediated apoptosis due to mutations in the p53 binding site as it has been suggested (26). While transcriptional activation by p53 plays a role in both cell cycle arrest and apoptosis, transcription-independent activities of p53 also seem important, particularly to the apoptotic response. Thus, p53 can be translocated to mitochondria to cause cell death in response to DNA damage (for review (9)). Because of this, one hypothesis would be that the early mitochondrial permeability observed after Lam D exposure could be a consequence of p53 translocation to mitochondria. However, immunostaining did not indicate any p53 translocation to mitochondria in P388 cells (Fig 6D). Furthermore, in p53 mutated or null cells, mitochondria in themselves appear sufficient to trigger apoptosis upon Lam D exposure. Indeed, although we were able to detect a moderate dose-dependent increase of the pro-apoptotic effect of Lam D in wild-type p53 expressing cells when compared to p53 $-/-$ cells (Fig 7A), this effect of p53 was limited and transient since no further increase in apoptosis was observed after 48 h of treatment with Lam D. Its functional role could be to further

amplify the mitochondrial apoptotic pathways. These results indicate that p53 is not critical for the completion of Lam D-induced apoptosis. Interestingly, this characteristic distinguishes Lam D from CPT, the prototypic topoisomerase I poison.

These results prompted us to further explore whether Lam D-induced DNA damage might generate other nuclear signaling pathways contributing to apoptosis in leukemia cells. Using enucleated cells and cell-free system assays, our results demonstrate that when Lam D was targeted to mitochondria, cells underwent apoptosis. Hence, its nuclear targeting seemed dispensable. These results raise the possibility of "double hits" of Lam D, one directly on the mitochondria to trigger apoptosis, and the other located in the cell nucleus, resulting in DNA damage, cell cycle arrest and DNA repair. Like Lam D, betulinic acid is a mitochondria-targeting drug, and also an inhibitor of nuclear topoisomerase I (31). Moreover, betulinic acid triggers apoptosis by a direct effect on mitochondria, independent of its nuclear action (32). Thus, Lam D triggers an apoptotic pathway different from those previously identified for standard genotoxic chemotherapeutic drugs such as topoisomerase I inhibitors (30). Unlike camptothecin, Lam D exerts a second mode of action, bypassing the nucleus and directly triggering apoptosis *via* the mitochondria by permeabilizing mitochondrial membranes allowing cell death proteins to exit. This mechanism of action may enable Lam D to be effective in cells resistant to other chemotherapeutic agents. Indeed, a major concern with conventional chemotherapeutic agents is that they induce the intrinsic apoptotic pathway through mitochondria in an indirect fashion and, in chemoresistant tumor cells, these pathways are frequently interrupted upstream of mitochondria by various defects, such as p53 mutations (in more than 50 % of cancer cells in humans), Bcl-2 overexpression or inactivation of the Fas pathway in T cells (33). Thus, in theory, direct targeting of the mitochondria may circumvent drug resistance caused by most of the apoptotic defects. As a result, mitochondriophilic agents, like Lam D, may prove to be highly efficient in killing cancer cells

normally resistant to treatment. In recent years, mitochondria have emerged as a promising target for cancer therapy (34) and clinical evaluation of several drugs targeting mitochondria-related proteins of the Bcl-2 family (GX15-070, oblimersen sodium, ABT-737) are ongoing (35).

In summary, we provide strong evidences that, given its mitochondrial tropism, Lam D bypasses the resistance of cancer cells to apoptosis as shown by: (i) Lam D is able to prompt apoptosis in cancer cells regardless of their p53 and Bcl-2 status, (ii) Lam D efficiently kills camptothecin-resistant cancer cells, and (iii) resistance to receptor-mediated cell death may be circumvented by Lam D. Corroborating these findings, the cytotoxic action of Lam D is fully maintained in multidrug-resistant cells (3). These results define mitochondria as the central mediator of Lam D-induced apoptosis and suggest that even when essential components of the apoptotic pathways are inactivated, like in chemoresistant cancer cells, Lam D still remains active. This study provides the basis for new strategies establishing mitochondria as a valuable target in chemoresistant cancer cells, reinforcing the potential interest of mitochondriophilic drugs for cancer therapy. Targeting mitochondria may confer a solid advantage against drug resistance in cancer cells, providing that a selectivity for tumor vs. normal mitochondria can be delineated. It will be therefore essential to identify the molecular target(s) of Lam D in mitochondria. Studies are ongoing in our laboratories.

Acknowledgements

We thank Dr. Bert Vogelstein for kindly providing the human colon cancer HCT116 cells and Dr. Steve Lancel (EA2689, Faculté de Médecine, Lille) for critical reading.

Reference List

1. Bailly C. Lamellarins, from A to Z: a family of anticancer marine pyrrole alkaloids. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2004; 4:363-378.
2. Kluza J, Gallego MA, Loyens A, et al. Cancer cell mitochondria are direct proapoptotic targets for the marine antitumor drug lamellarin D. *Cancer Res* 2006; 66:3177-3187.
3. Vanhuysse M, Kluza J, Tardy C, et al. Lamellarin D: a novel pro-apoptotic agent from marine origin insensitive to P-glycoprotein-mediated drug efflux. *Cancer Lett* 2005; 221:165-175.
4. Facompre M, Tardy C, Bal-Mahieu C, et al. Lamellarin D: a novel potent inhibitor of topoisomerase I. *Cancer Res* 2003; 63:7392-7399.
5. Tardy C, Facompre M, Laine W, et al. Topoisomerase I-mediated DNA cleavage as a guide to the development of antitumor agents derived from the marine alkaloid lamellarin D: triester derivatives incorporating amino acid residues. *Bioorg Med Chem* 2004; 12:1697-1712.
6. Baunbaek D, Trinkler N, Ferandin Y, et al. Anticancer alkaloid lamellarins inhibit protein kinases. *Mar Drugs* 2008; 6:514-527.
7. Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2008; 9:1002-1011.
8. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006; 12:440-450.
9. Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Current Opinion in Cell Biology* 2005; 17:631-636.
10. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997; 34:9-19.
11. Gupta S, Kass GE, Szegezdi E, Joseph B. The mitochondrial death pathway: A promising therapeutic target in Diseases. *J Cell Mol Med* 2009; in press.
12. Martoriati A, Doumont G, Alcalay M, et al. *dapk1*, encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic checkpoint, is a transcription target of p53. *Oncogene* 2005; 24:1461-1466.
13. Marchetti P, Zamzami N, Joseph B, et al. The novel retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid can trigger apoptosis through a mitochondrial pathway independent of the nucleus. *Cancer Res* 1999; 59:6257-6266.
14. Kluza J, Marchetti P, Gallego MA, et al. Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells. *Oncogene* 2004; 23:7018-7030.

15. Gallego MA, Ballot C, Kluza J, et al. Overcoming chemoresistance of non-small cell lung carcinoma through restoration of an AIF-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2007; 27:1981-92.
16. Gallego MA, Joseph B, Hemstrom TH, et al. Apoptosis-inducing factor determines the chemoresistance of non-small-cell lung carcinomas. *Oncogene* 2004; 23:6282-6291.
17. Huang X, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. *Methods Mol Biol* 2006; 314:73-80.
18. Timmer JC, Salvesen GS. Caspase substrates. *Cell Death Differ* 2007; 14:66-72.
19. Tamiji S, Beauvillain JC, Mortier L, et al. Induction of apoptosis-like mitochondrial impairment triggers antioxidant and Bcl-2-dependent keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 2005; 125:647-658.
20. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256:42-49.
21. Shao RG, Cao CX, Nieves-Neira W, et al. Activation of the Fas pathway independently of Fas ligand during apoptosis induced by camptothecin in p53 mutant human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2001; 20:1852-1859.
22. Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, et al. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 2004; 200:353-365.
23. Zhang HG, Wang J, Yang X, Hsu HC, Mountz JD. Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene* 2004; 23:2009-2015.
24. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:789-802.
25. Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z. DNA damage induced by DNA topoisomerase I- and topoisomerase II-inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis. *Cell Cycle* 2003; 2(6):614-619.
26. Ishiguro K, Shyam K, Penketh PG, Sartorelli AC. Role of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in the cytotoxic activity of cloretazine. *Mol Cancer Ther* 2005; 4:1755-1763.
27. Steele AJ, Prentice AG, Hoffbrand AV, et al. p53-mediated apoptosis of CLL cells: evidence for a transcription-independent mechanism. *Blood* 2008; 112:3827-3834.
28. Elices M, Grant W, Lubner-Narod J, et al. Lamellarins, novel marine compounds showing efficacy in a panel of human tumor xenografts. 2005; *Am. Assoc. Cancer Res. poster #645*
29. Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. *Adv Cancer Res* 2005; 94:143-196.

30. Sordet O, Khan QA, Kohn KW, Pommier Y. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3:271-290.
31. Eiznhamer DA, Xu ZQ. Betulinic acid: a promising anticancer candidate. *IDrugs* 2004; 7:359-373.
32. Ganguly A, Das B, Roy A, et al. Betulinic Acid, a Catalytic Inhibitor of Topoisomerase I, Inhibits Reactive Oxygen Species Mediated Apoptotic Topoisomerase I DNA Cleavable Complex Formation in Prostate Cancer Cells but Does Not Affect the Process of Cell Death. *Cancer Res* 2007; 67:11848-11858.
33. Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 2004; 23:2934-2949.
34. Armstrong JS. Mitochondria: a target for cancer therapy. *Br J Pharmacol* 2006; 147:239-248.
35. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15:1126-1132.

Figure legends

Figure 1: Nuclear apoptosis induced by Lam D in P388 cells. (A) Structure of Lam D. (B) Kinetics of nuclear signs of apoptosis. P388 cells were cultured in the presence of Lam D (0.2 μ M, 1 μ M, 5 μ M) and at the end of the indicated times, the percentage of subdiploid cells (sub-G1) was determined using flow cytometric analysis. Data are representative of three independent experiments (mean \pm SD). (C) P388 cells were treated or not treated (Control, Co.) with 1 or 5 μ M of Lam D for 24 or 36 h and internucleosomal DNA fragmentation was assessed by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. (D) Kinetics of the effects of pro-apoptotic doses of Lam D on P388 cell cycle distribution. Cells were incubated with 5 μ M Lam D for the indicated times and DNA content was analyzed by flow cytometry using PI staining. Data are mean values of four independent experiments (SD less than 10 %). (E) P388 cells were cultured for 18 h with 5 μ M Lam D alone or in combination with 50 μ M z-VAD.fmk. After treatment, cells were harvested, lysed, then immunoblotted using anti-PARP antibody.

Figure 2: Lam D triggers caspase activation *via* the intrinsic pathway of apoptosis. (A) P388 cells were incubated for the indicated times with or without 5 μ M Lam D. Whole-cell lysates were subjected to SDS-PAGE, blotted and probed with antibodies recognizing caspase-2, cleaved caspase-3, caspase-9 and caspase-8. Arrows indicates cleaved products. (B) Lam D-induced caspase-like protease activities. Lam D-treated P388 cells were tested for caspase activity by using different caspase substrates: Ac-DEVD.AMC (DEVDase), Ac-IETD.AMC (IETDase), Ac-LEHD.AMC (LEHDase) and Ac-VDVD.AMC (VDVDase). Where indicated, cells were also treated with inhibitors of caspases, i.e. z-VAD.fmk (50 μ M), z-VDVAD.fmk (50 μ M), z-IETD.fmk (50 μ M), z-LEHD.fmk (50 μ M) and z-DEVD.fmk (50 μ M). Activities were determined at 18 h post-treatment with Lam D. Relative fluorescence

units were measured and results are expressed as fold increase of control (untreated cells). Error bars displays mean +/-SD (n = 3).

Figure 3: Mitochondrial permeability precedes caspase activation and is modulated by

Bcl-2 protein in Lam D-induced apoptosis (A) Effect of caspase inhibitors on Lam D-induced apoptosis. P388 cells were cultured in the presence of 5 μ M Lam D and various inhibitors of proteases, *i.e.* PMSF (1mM), pepstatine (10 μ M), z-VAD.fmk (50 μ M), z-VDVAD.fmk (50 μ M), z-IETD.fmk (50 μ M), z-LEHD.fmk (50 μ M) and z-DEVD.fmk (50 μ M). At 24 h post-treatment, $\Delta\psi_m$ and sub-G1 were determined by flow cytometry. Results obtained in samples treated with Lam D and various inhibitors were compared with those obtained after Lam D treatment alone (90 % $\Delta\psi_m$ low and 35% sub-G1). Results are expressed as the percentage of suppression of this control response (% of suppression = 100 (Y-X) /Y, where X and Y correspond to the % of $\Delta\psi_m$ or sub-G1 cells in samples treated with Lam D alone (Y) or in association with inhibitors (X)).(B) z-VAD.fmk does not prevent the induction of cytochrome c release by Lam D. P388 cells were treated under the same conditions as in (A), cytosolic protein fractions were prepared and analyzed by immunoblotting for cytochrome c release. Four independent immunoblots were quantified on a densitometer and intensities (mean +/- SD) were expressed in arbitrary units. (C) Left panel. Bcl-2 overexpression delays Lam D-induced viability loss. The viability of control P388 cells (white symbols) and of Bcl-2 overexpressing P388 cells (black symbols) treated with 2 μ M (square) or 5 μ M (triangle) Lam D or kept untreated (round), are shown. The number of viable cells were determined using Trypan blue exclusion assay. Viability is expressed as the percentage of viable cells before Lam D exposure (time = 0). Right panel. Bcl-2 overexpression delays signs of nuclear apoptosis. Condensation of chromatin was visualized using Hoechst staining after treatment with 5 μ M Lam D. (D) The small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 acts with Lam D to increase mitochondria-dependent apoptosis. P388 cells

were treated with Lam D (at indicated concentrations) and/or 10 μ M HA14-1 for 24 h, after which the percentage of cells displaying a loss of $\Delta\psi_m$ and sub-G1 was determined by flow cytometry. (means +/- SD of 3 separate experiments in triplicate).

Figure 4: Lam D induces cell death through a Fas independent pathway

(A) Expression of Fas and Fas ligand (Fas L) in response to Lam D exposure. P388 cells were incubated for the indicated times with or without 5 μ M Lam D, and whole-cell lysates were subjected to immunoblotting for detection of Fas and Fas L. G3PDH served as a loading control. (B) Wild type, FADD-deficient and caspase-8 deficient Jurkat T cells were treated with anti-Fas Ab (500ng/ml) or Lam D (5 μ M) for 24 hours, cells were stained for sub-G1 and analyzed by flow cytometry. (C) Lam D induced the mitochondrial pathway of apoptosis in wild type, FADD-deficient and caspase-8 deficient Jurkat T cells. After 12 h of treatment with 5 μ M Lam D, cytosolic fractions were analyzed by immunoblotting using cytochrome c antibody and the percentage of cells with a drop in $\Delta\psi_m$ ($\Delta\psi_m^{\text{low}}$) were measured by flow cytometry.

Figure 5: Lam D shifts the balance of Bcl-2 related anti- and pro-apoptotic proteins to favor apoptotic demise.

(A) Expression of pro- and anti-apoptotic proteins were monitored by immunoblot. P388 cells were treated with 5 μ M of Lam D or left untreated (Control; Co.). After indicated times, immunoblot analysis for Puma, Noxa, Bax, Bid, Bad, Bim, Bcl-2, Mcl-1 and Bcl-xl were performed. Alternatively, P388 cells were treated for 18h with 5 μ M Lam D in the presence or absence of 50 μ M z-VAD.fmk and immunoblotted using Bcl-2 antibody. Equal protein loading was controlled by actin antibody.(B) Bax activation was assessed by flow cytometry using conformation-specific anti-Bax antibody (solid line). Secondary antibody alone was used as negative control (dashed line). (C) Expression of inhibitors of apoptosis proteins (XIAP, cIAP2, survivin) were examined by immunoblotting as in (A).

Figure 6: Lam D-induced DNA damage and p53 expression depends on the inhibition of nuclear topoisomerase I

(A) Multiparameter distribution representing expression of γ H2AX vs. DNA content of wild type P388 cells (upper) or topoisomerase I mutated P388 cells, P388 CPT5 (lower), kept untreated (Control; Co.), treated with 5 μ M Lam-D for 15 or 60 min, or treated with the well-known DNA topoisomerase I inhibitor camptothecin (5 μ M CPT) for 60 min. Based on difference in DNA content, G1, S and G2/M cell populations were defined. Numbers in percentage represents the γ H2AX positive cells gated. Data are representative of three independent experiments. (B) Immunoblot analysis of the DNA repair protein Rad51 in P388 and P388 CPT5 cells treated with 5 μ M Lam D for indicated times. Actin served as loading control. (C) Immunoblot analysis of p53 protein in P388 and P388 CPT5 cells treated with 5 μ M Lam D for indicated times. Actin served as loading control (D) (left panel) Immunofluorescence staining of p53 in untreated P388 cells (Control cells, Co.) and in P388 cells 20 h post-Lam D treatment (5 μ M). Cells were stained with DAPI to display nuclear morphology. Original magnification x40. (D) (right panel) Time course of p53 activation during Lam D treatment. P388 cells were treated with 5 μ M Lam D for 0-18 h and whole-cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-phosphor-Ser15 p53 antibody. (E) Immunoblot analysis of p53 downstream effectors p21 and GADD45 was assessed on P388 cells incubated with 5 μ M Lam D for indicated times. Actin was used as loading control.

Figure 7: p53-dependent and nuclear-dependent signaling pathways are not required for Lam D-induced apoptosis.

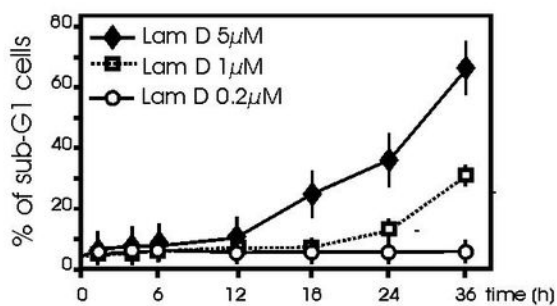
(A) TP53 $+/+$ and TP53 $-/-$ HCT116 colon carcinoma cells were incubated with Lam D (1 or 5 μ M) for indicated times before determination of cells in sub-G1. Camptothecin (CPT; 5 μ M 24h) was used as a control for p53-dependent apoptosis. Results (mean \pm SD) are representative of at least five independent experiments. (B) The SAOS2 osteosarcoma cell line (p53 null) was incubated with Lam D for 24h before determination of sub-G1 and $\Delta\psi$ m. Camptothecin (CPT; 5 μ M 24h) was used as a control for p53-dependent

apoptosis. Results (mean +/- SD) are representative of three independent experiments (C) Protein synthesis is dispensable for Lam D-triggered apoptosis. P388 cells were incubated with either 5 μ M Lam D or 1 μ M dexamethasone (DEX) alone or in the presence of 1 μ M cycloheximide (CHX). After 4 h of culture, changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was assessed by the use of TMRM. Alternatively, after 12h of Lam D-treatment the percentage of cells in sub-G1 was determined. Results (mean +/- SD) are representative of three independent experiments. (D) Comparison of enucleated P388 cells (cytoplasts) and intact P388 cells in response to Lam D. Cytoplasts or intact P388 cells were treated with Lam D at indicated concentrations for 6 h. Mitochondrial membrane potential was determined by flow cytometry using TMRM and the values are relative MFI +/- SD of three independent experiments. (right panel) Detection of pan-caspase activity with FITC-VAD.fmk. Cytoplasts and P388 control cells were incubated for 15 h with or without 5 μ M Lam D and caspase activity was assessed by flow cytometry. Results are representative of two independent experiments. (E) Lam D induces cytochrome c release in a cell free-system. (Upper box) Mitochondria isolated from P388 cells (0.5mg/ml final concentration) were incubated for 90 min at 37°C in the absence (Control, CO) or presence of Lam D (at 0.5, 2 and 5 μ M) or 10 μ M etoposide (Eto.). (Lower box) Conditions as in upper box, except that nuclei (2x 10⁶/ml) isolated from p388 cells were added to the samples. At the end of the incubation time the reaction mixture was centrifuged and supernatants were immunoblotted for the detection of cytochrome c release.

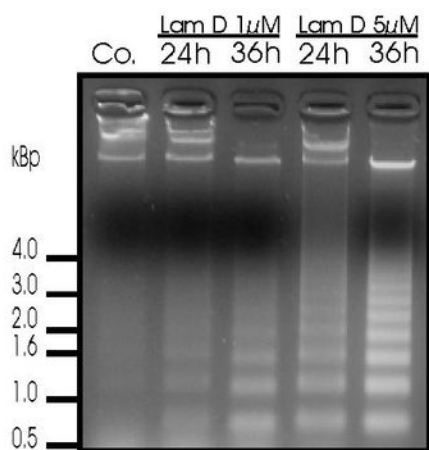
A



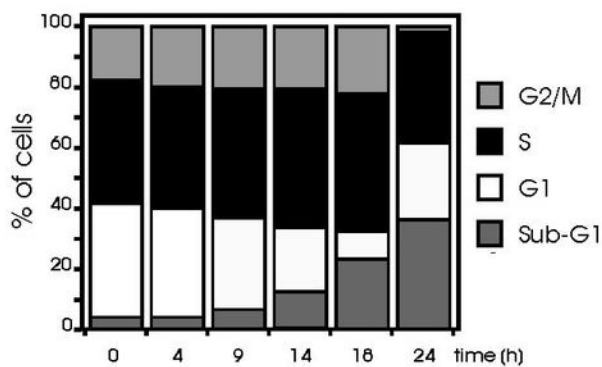
B



C



D



E

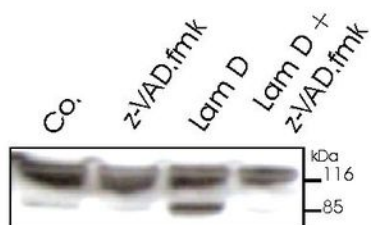
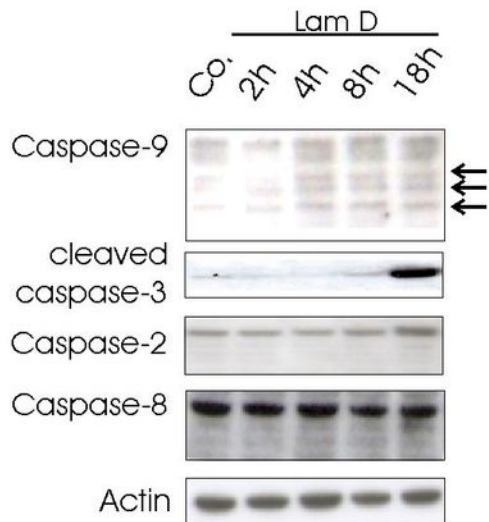


Fig 1

A



B

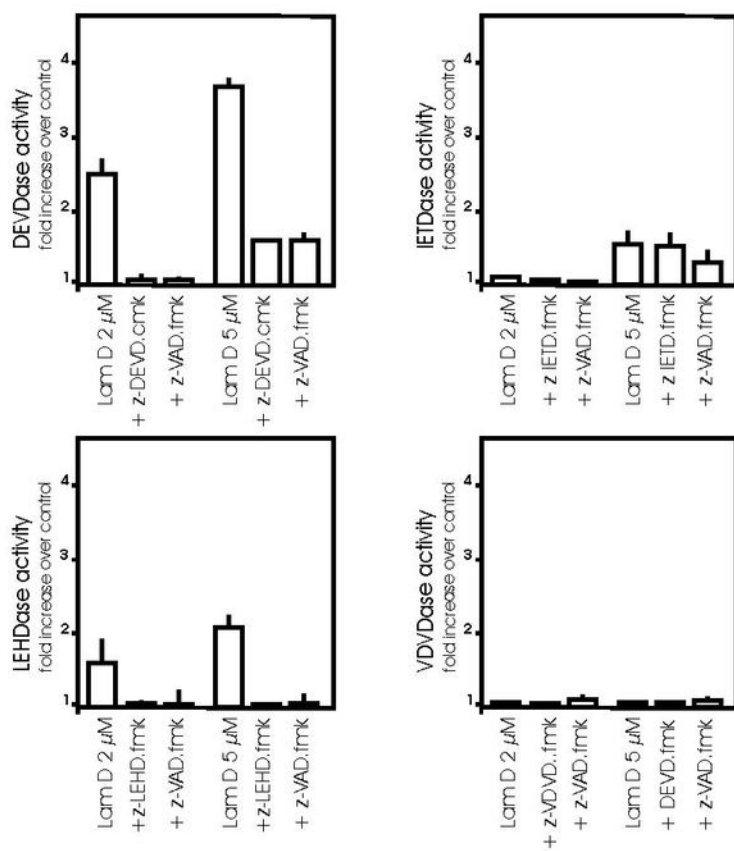
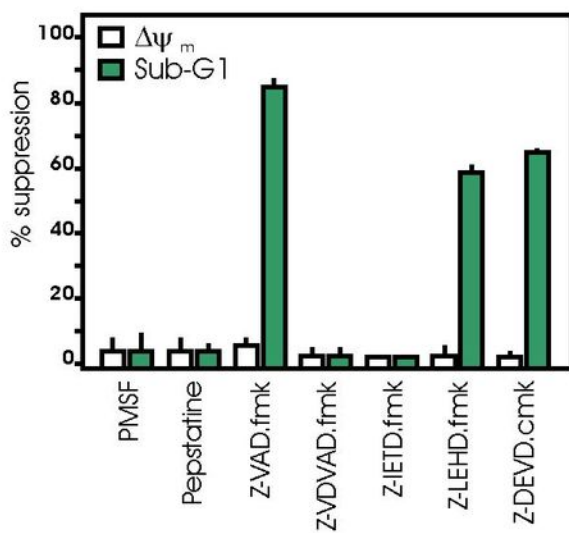
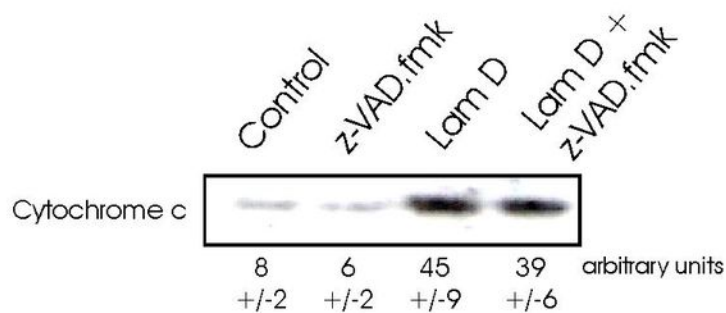


Fig 2

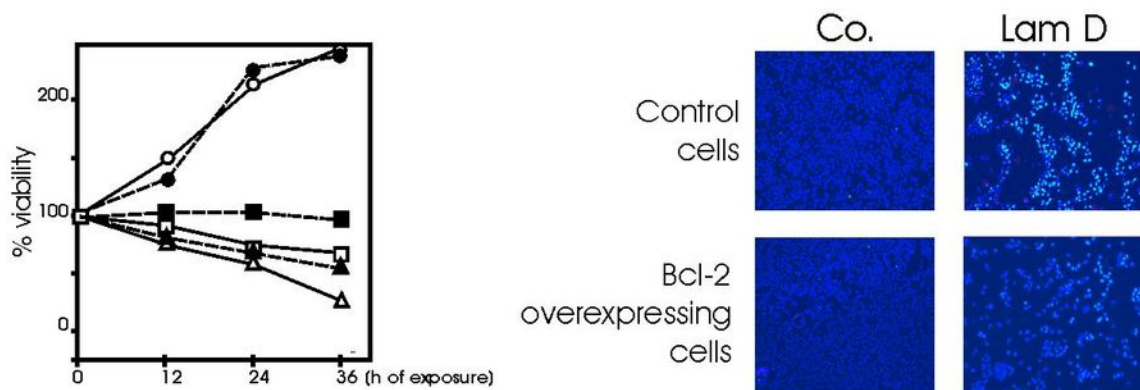
A



B



C



D

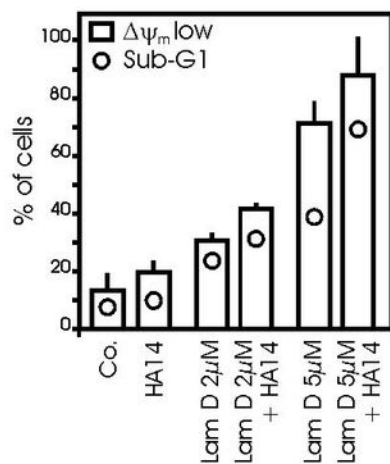
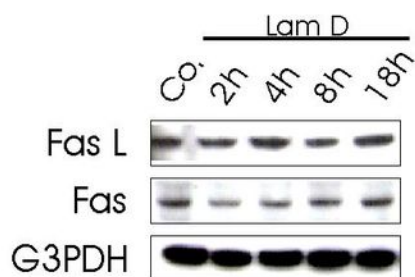
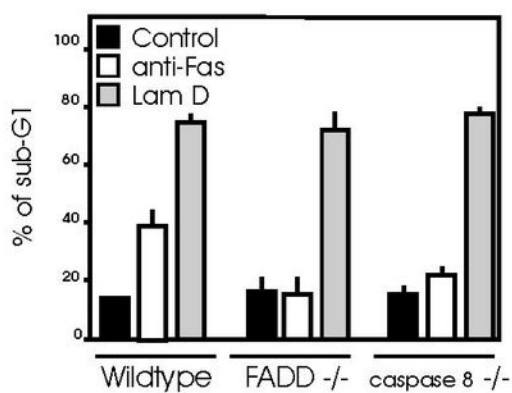


Fig 3

A



B



C

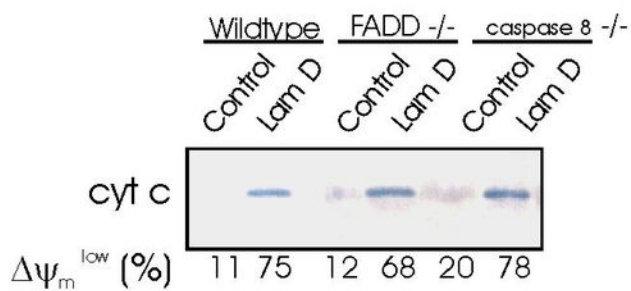
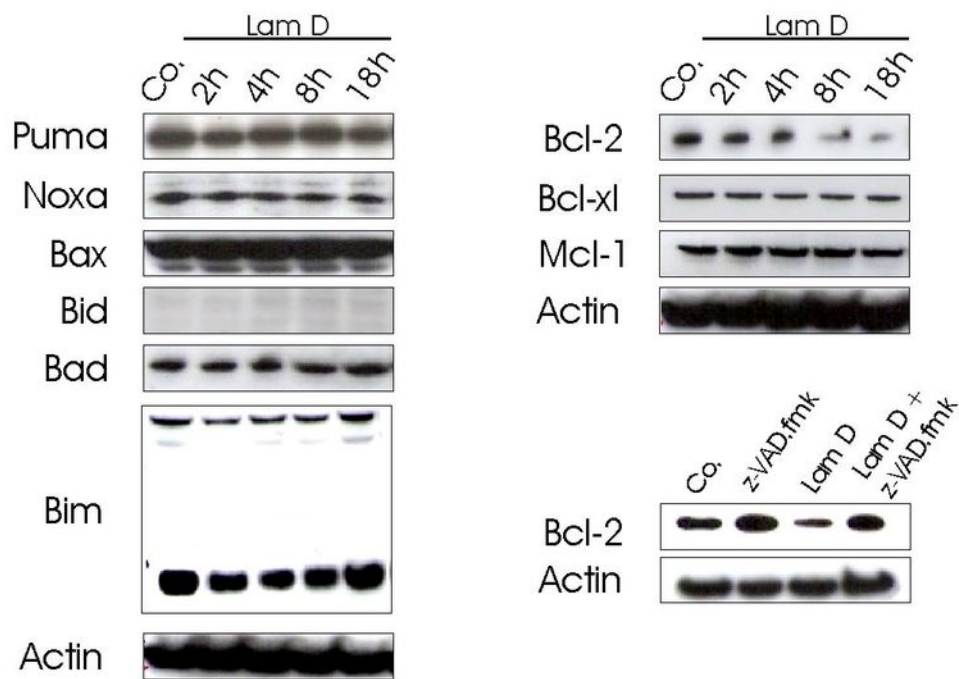
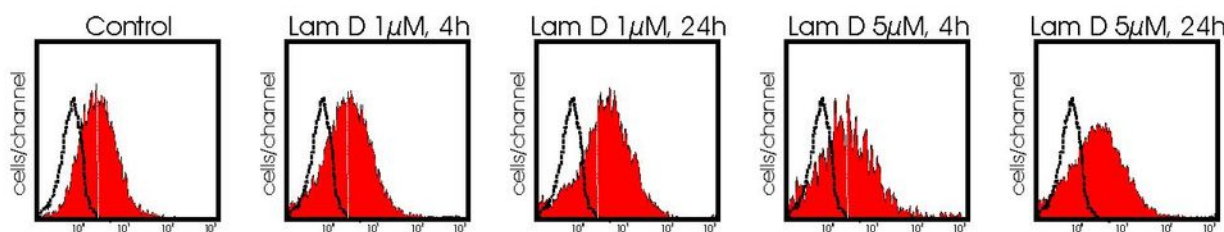


Fig 4

A



B



C

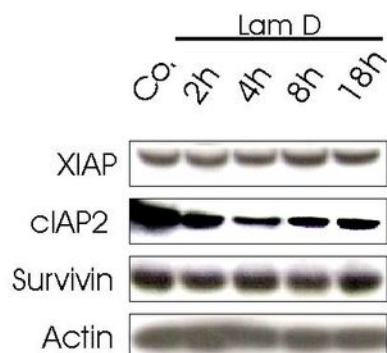
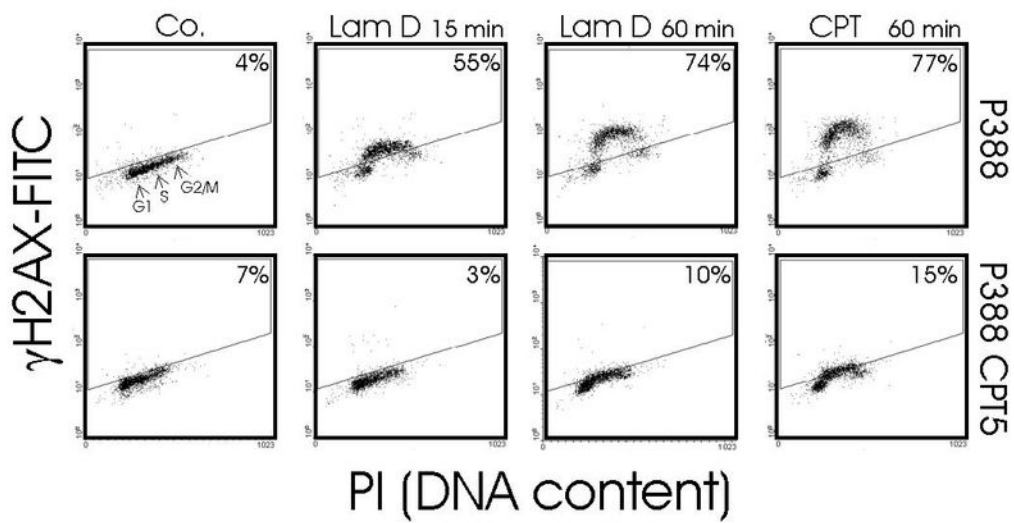
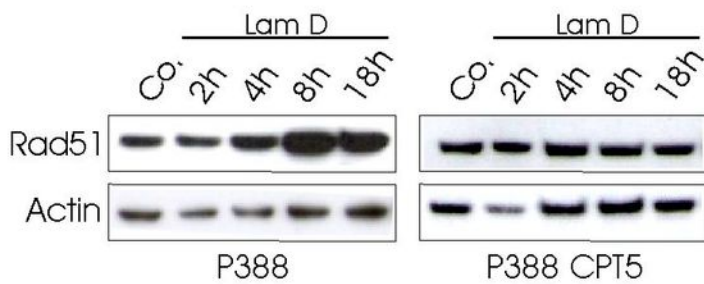


Fig 5

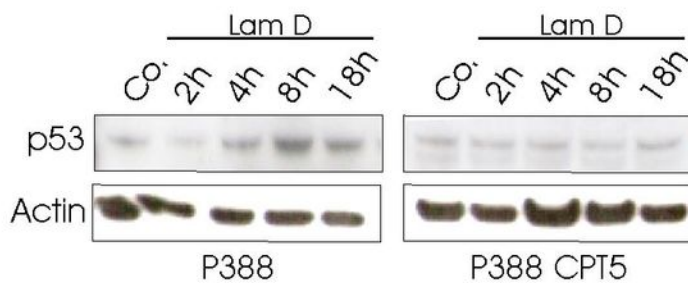
A



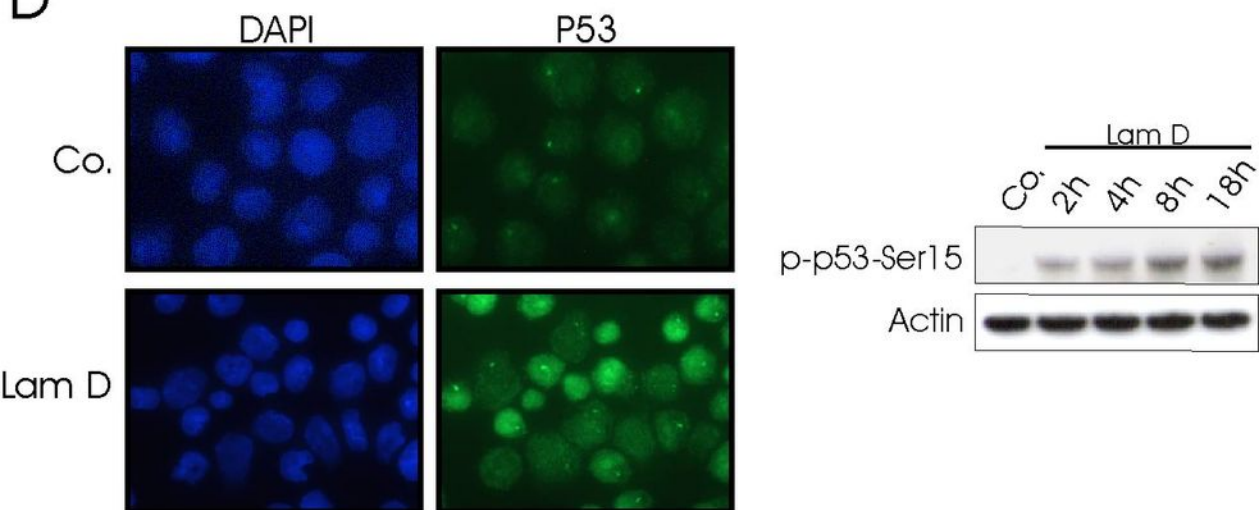
B



C



D



E

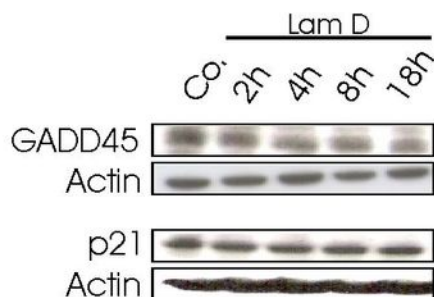
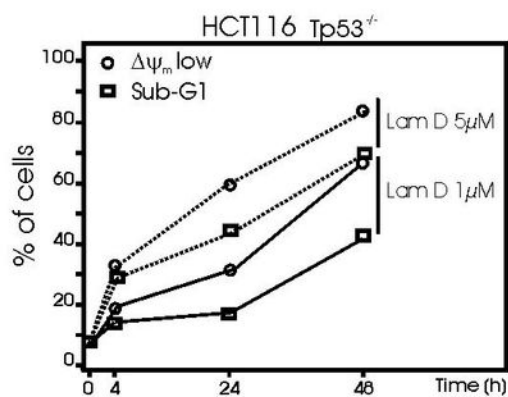
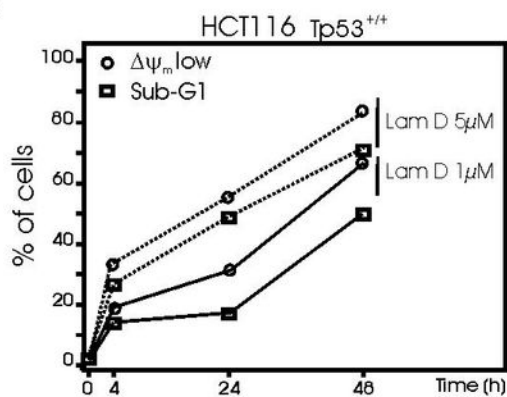
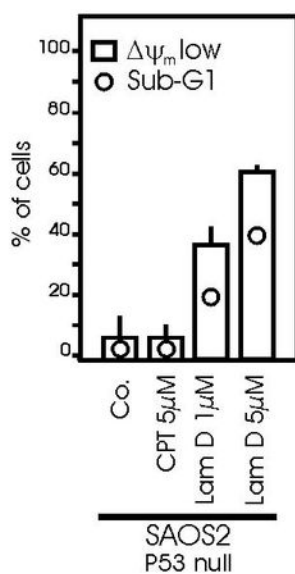


Fig 6

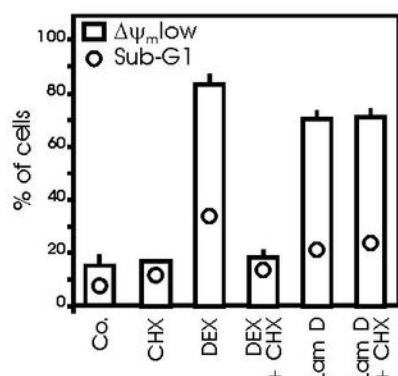
A



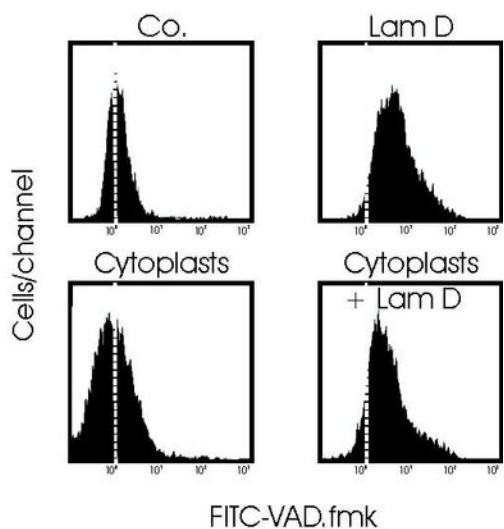
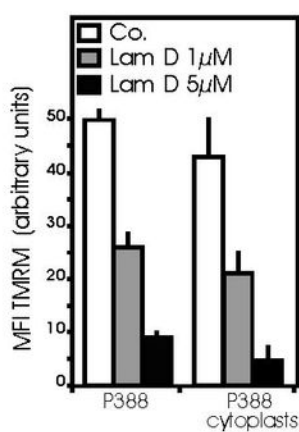
B



C



D



E

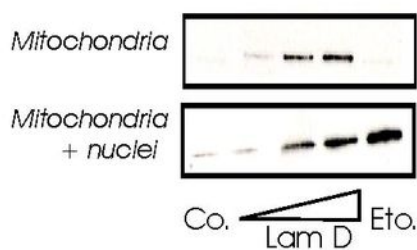


Fig 7

DISCUSSION

DISCUSSION.

Les résultats de notre travail confirment le rôle primordial de la mitochondrie dans l'apoptose des cellules tumorales et définissent la mitochondrie comme une cible pro-apoptotique extrêmement efficace. En outre, l'utilisation des Lamellarines comme « outils pharmacologiques » nous a permis de comprendre comment restaurer l'apoptose dans les cellules de NSCLC chimiorésistantes. A la lumière de ces résultats, il nous semble important de discuter, en prenant comme exemple les Lamellarines, des espoirs et des limites du ciblage des mitochondries pour le traitement des cancers. En d'autres termes, nous souhaitons soulever la question suivante : Les Lamellarines pourraient-elles constituer une nouvelle classe d'agents anticancéreux utilisables en clinique ?

Espoirs et limites du ciblage de la mitochondrie pour le traitement des cancers.

La Lamellarine-D a d'abord été décrite comme un inhibiteur de topoisomérase-1 (*Facompré & al, 2003*). La Lamellarine-D cible également la mitochondrie (*Kluza & al, 2006 ; Article 2*). Par ailleurs, d'autres cibles tumorales ont été récemment décrites telles que les kinases CDK1, CDK5, GSK-3 et PIM-1 (*Baunbaeck & al, 2008*). Le ciblage mitochondrial permet à la Lamellarine-D d'induire l'apoptose dans des lignées où la topoisomérase-1 nucléaire est mutée (*Kluza & al, 2006*), suggérant que ces deux activités peuvent probablement être dissociées. En effet, les concentrations de Lamellarine-D qui induisent un effet inhibiteur des topoisomérases-1, de l'ordre du nanomolaire, sont insuffisantes pour provoquer la perméabilisation des mitochondries (*Article 2 & Article en préparation*). Comme la Lamellarine-D, d'autres molécules possèdent simultanément une cible mitochondriale et une cible nucléaire. Par exemple, l'étoposide, à faibles concentrations (<10 µM), agit classiquement tel un inhibiteur de topoisomérase-2 générant des dommages de l'ADN suivis de la translocation de la caspase-2 pour induire ensuite la libération mitochondriale de cytochrome-c (*Robertson & al, 2000-2002*). A l'inverse, à fortes concentrations, l'étoposide induit directement la TP mitochondriale. Le CD437, un rétinoïde atypique, possède à faibles concentrations (de l'ordre du nanomolaire) une forte affinité pour les récepteurs nucléaires RAR γ tandis qu'à fortes concentrations (de l'ordre du micromolaire) celui-ci induit la TP de mitochondries isolées. L'ensemble de ces données pourraient avoir une explication triviale : les effets nucléaires seraient les effets spécifiques des molécules à

l'origine de leur activité *in vivo* tandis que les effets mitochondriaux seraient des effets mitochondriotoxiques non spécifiques. Plusieurs arguments s'opposent à cette vision mitochondriotoxique :

➤ Le CD437 ne déstabilise pas les membranes lipidiques de liposomes, mais perméabilise spécifiquement les protéoliposomes qui contiennent la translocase mitochondriale ANT. La Lamellarine-D ne perméabilise pas les membranes des microsomes (données non montrées). Nous envisageons de tester cette molécule sur les protéoliposomes-ANT (collaboration Dr. Catherine Brenner).

➤ Seules les concentrations élevées de Lamellarine-D (de l'ordre du micromolaire) qui provoquent l'effet mitochondrial direct sont compatibles avec un effet antitumoral observé sur souris xéno greffées (*Elices & al, 2005*).

➤ La Lamellarine de synthèse, le PM31379, qui a été sélectionnée pour son activité antitumorale sur diverses tumeurs xéno greffées et plus particulièrement dans le cancer du colon (*Elices & al, 2005*) est incapable d'inhiber la topoisomérase-1 mais exerce un puissant effet inducteur direct de la perméabilité mitochondriale.

L'ensemble de ces données démontre que la cible mitochondriale est probablement pertinente dans l'effet antitumoral des nouveaux agents anticancéreux potentiels.

Puisque la Lamellarine-D est le chef de file d'une nouvelle famille d'agents anticancéreux potentiels, il nous semble également intéressant de vérifier les effets mitochondriaux d'autres Lamellarines. Dans cette famille, nous avons découvert que la Lamellarine-M cible également directement la mitochondrie. Comme la Lamellarine-D, la Lamellarine-M provoque des altérations mitochondriales fonctionnelles mais elle se distingue par l'absence d'induction de gonflement des mitochondries suggérant que si ces deux Lamellarines naturelles visent effectivement la mitochondrie, leur cible moléculaire est peut-être distincte.

Efficacité pro-apoptotique supérieure des agents ciblant la mitochondrie : un avantage incontestable in vitro.

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, les traitements anticancéreux peuvent activer différentes voies initiatrices de l'apoptose engendrant des réponses cellulaires complexes pour aboutir à la mort des cellules tumorales. En conséquence, la plupart des traitements anticancéreux conventionnels n'agissent non pas directement au niveau de la mitochondrie pour provoquer la mort des cellules tumorales, mais ceux-ci activent des relais

moléculaires situés en amont, qui eux-mêmes peuvent converger vers la mitochondrie pour provoquer la mort cellulaire (pour revue *Marchetti & al, 2002*). On conçoit alors que ces étapes moléculaires précédant la phase mitochondriale constituent une période propice au développement de mécanismes de résistance à l'apoptose induite par les traitements anticancéreux. Par exemple, les mutations inactivatrices de p53, rencontrées dans plus de 50 % des cancers humains sont associées à une résistance à l'induction de l'apoptose induite par les génotoxiques (pour revue *Marchetti & al, 2002*). Une régulation négative des voies apoptotiques extrinsèques soit par sous-expression des récepteurs de mort, soit par surexpression de c-FLIP, a été impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par le méthotrexate, le cisplatine ou la doxorubicine (pour revue *Marchetti & al, 2002*).

A l'inverse, des agents pro-apoptotiques ciblant directement la mitochondrie peuvent s'avérer particulièrement efficaces puisque ceux-ci échapperaient aux phénomènes de résistance des voies apoptotiques situées en amont de la mitochondrie. Ainsi, nous démontrons clairement que les Lamellarines restent capables d'induire la mort des cellules tumorales résistantes à la plupart des stimuli létaux. C'est le cas i) des lignées de NSCLC, U1810, défailtantes dans la voie apoptotique dépendante des caspases (*Joseph & al, 2001*). Dans les cellules U1810, l'effet mitochondrial de la Lamellarine de synthèse, le PM031379, permet de restaurer l'apoptose en provoquant la fuite cytosolique du facteur AIF et sa translocation nucléaire par production de ROS mitochondriaux (*Article 1*) ; ii) de la mort induite par la Lam-D dans les lignées résistantes à l'inhibiteur de topoisomérase-1 de référence, la camptothécine (*Kluza & al, 2006 ; Article 2*) ; iii) de la mort induite par la Lam-D des lignées dépourvues de protéine pro-apoptotique p53 ou possédant une forme mutée de p53 (*Article 2*) ; iv) de l'apoptose induite par la Lam-D de lignées leucémiques qui surexpriment Bcl-2 (*Article-2*) ; v) de l'apoptose induite dans des lignées leucémiques déficientes dans la voie apoptotique extrinsèque telles que les lignées dépourvues de l'adaptateur FADD ou dépourvues de caspase-8 (*Article 2*). Ces résultats sont à rapprocher de ceux démontrant que la cytotoxicité de la Lam-D n'est pas influencée par la présence de pompes Pgp (*Vanhuyse & al, 2005*). Ainsi, nos résultats confirment que le mode d'action mitochondrial direct des agents mitochondriophiles confère un avantage par rapport aux traitements anticancéreux classiques, leur permettant ainsi d'induire l'apoptose dans des cellules généralement chimiorésistantes.

Bien que les substances mitochondriophiles constituent une arme contre les cellules tumorales chimiorésistantes, des mécanismes de résistance à ces composés ont néanmoins aussi été décrits. A ce titre, il est surprenant de constater que la lignée de NSCLC U1810 soit résistante

à l'apoptose induite par la substance naturelle, la Lamellarine-D, tandis qu'elle est sensible au dérivé de synthèse, le PM031379 (*Article 1*). La résistance à la Lamellarine-D des NSCLC est de localisation post-mitochondriale puisque la Lamellarine-D est capable d'induire la perméabilisation des membranes mitochondriales externe et interne (*Article 1*). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus avec la substance mitochondriophile d'origine naturelle, l'acide bétulinique. Ainsi, une lignée d'astrocytome humain est particulièrement résistante à l'induction de l'apoptose par l'acide bétulinique. Comme pour la Lamellarine-D, le niveau de résistance se situe en aval des événements mitochondriaux puisque la chute de potentiel de membrane et la libération de cytochrome-c sont observées après incubation avec l'acide bétulinique. L'explication de cette résistance est que cette lignée présente une isoforme particulière de la pro-caspase-9 qui agirait comme un dominant négatif (*Ceruti & al, 2005*). On conçoit en effet que les altérations des voies apoptotiques au niveau mitochondrial et/ou post-mitochondrial aient un impact négatif sur l'effet pro-apoptotique de substances mitochondriophiles. Cependant la résistance à l'apoptose en aval des mitochondries n'est probablement pas un obstacle majeur à la mort induite par les substances mitochondriophiles car : (i) les altérations des voies post-mitochondriales réduisant l'activité des molécules mitochondriophiles sont comparativement assez rares par rapport aux altérations rencontrées sur les voies apoptotiques en amont des mitochondries (*Johnstone & al, 2002*) ; (ii) l'effet pro-apoptotique de la Lam-D dépasse le frein apoptotique représenté par la surexpression mitochondriale de Bcl-2 (*Article 2*) ; (iii) il est possible que les altérations mitochondriales (fonctionnelles et structurales) induites par certains agents mitochondriophiles contribuent à un « point de non retour » pour la cellule tumorale qui devient irrémédiablement condamnée à mourir (*Green & Amarante-Mendes, 1998*) bien que cette notion soit controversée (*Chipuk & al, 2006*).

L'absence de sélectivité antitumorale des agents qui ciblent les mitochondries semble être une limite insurmontable.

La mitochondrie est une cible directe de nombreuses substances pharmacologiques (cf. introduction). Cependant, certains aspects des interactions drogues-mitochondries sont encore sous-estimés à cause de l'extrême complexité de la physio(patho)logie mitochondriale. Le rôle bioénergétique des mitochondries fait de cet organe un acteur crucial des grandes fonctions cellulaires (mort cellulaire, mitose ou différenciation) et est étroitement lié à des fonctions essentielles d'anabolisme, d'équilibre redox, d'homéostasie calcique *etc...* Cette singularité des mitochondries doit attirer notre attention à la fois sur les possibilités

thérapeutiques mais également toxiques des substances mitochondriophiles. Les détracteurs des molécules mitochondriophiles mettent souvent en avant leurs craintes concernant l'absence de sélectivité antitumorale de ces composés transformant ainsi ces substances en molécules « globalement » mitochondriotoxiques. Il est à noter que cet argument peut également s'appliquer à la quasi-totalité des substances génotoxiques qui touchent indifféremment l'ensemble des cellules prolifératives. Puisqu'un certain nombre de substances ciblant la mitochondrie sont en essais précliniques ou cliniques, il est important d'être conscient des effets indésirables dus aux interactions drogues-mitochondries. Par exemple, les essais cliniques avec la substance mitochondriophile MKT-077 ont été stoppés prématurément devant l'apparition de toxicité et également l'apparition de myopathie mitochondriale (*Propper & al, 1999*). Dans le même ordre d'idée, certains dérivés de synthèse de la Lamellarine-D se sont avérés être cardio-toxiques chez le rat probablement par leurs effets mitochondriaux (données fournies par PharmaMar).

Néanmoins, ces résultats ne devraient pas rejeter en bloc l'intérêt potentiel de la mitochondrie comme cible antitumorale mais plutôt susciter la réflexion afin d'accroître l'index thérapeutique.

Cibler sélectivement la mitochondrie tumorale : le concept de « mitocans ».

Pour accroître l'index thérapeutique, la substance mitochondriophile antitumorale doit sélectivement cibler les mitochondries des cellules tumorales. Une piste de recherche est de tirer parti des différences existantes entre les mitochondries de cellules normales et de cellules tumorales. Dans ce cas, identifier et comprendre les caractéristiques mitochondriales « tumeur-spécifiques » et les cibles moléculaires sont des éléments clé pour maximiser l'index thérapeutique des agents anticancéreux mitochondriophiles. Sur ce principe, plusieurs auteurs ont proposé le terme de « mitocan » pour désigner une classe de drogues prometteuses qui tirent partie des spécificités des mitochondries tumorales et ciblent seulement les mitochondries (mito) des cellules cancéreuses (*Ralph & al, 2006*). Schématiquement, les différences entre les mitochondries des cellules tumorales et des cellules normales peuvent se diviser en deux groupes : différences fonctionnelles et expression « spécifique » de protéines mitochondriales.

Cibler sélectivement la mitochondrie tumorale en exploitant ses spécificités fonctionnelles.

✓ Le potentiel de membrane mitochondriale est significativement plus élevé dans les cellules de carcinomes en comparaison avec celui des cellules épithéliales normales (*Jonhson*

& al, 1980-1981 ; Summerhayes & al, 1982). En conséquence, les substances mitochondriophiles cationiques devraient posséder un tropisme tumoral préférentiel. L'élévation du potentiel de membrane mitochondriale semble corrélée à une malignité accrue (résistance à l'apoptose et progression tumorale) (Heerdt & al, 2003-2005). La raison de cette augmentation du potentiel de membrane mitochondriale des cellules tumorales semble être dépendante du métabolisme tumoral. En effet, les cellules cancéreuses produisent la plupart de leur ATP par glycolyse (cf. paragraphe suivant) et elles présentent en général une activité OXPHOS réduite, laquelle coïncide avec une dissipation moindre du gradient de protons mitochondrial $\Delta\mu\text{H}^+$. L'accroissement du gradient de protons contribue au potentiel de membrane mitochondriale élevé ($\Delta\Psi\text{m}$) observé dans une grande variété de cellules de carcinomes. De plus, des ratios élevés d'ATP/ADP et de NADH/NAD⁺ dus à l'inhibition de l'activité de l'ATP synthase et une concentration élevée des substrats de la chaîne respiratoire semblent également jouer un rôle dans le maintien du potentiel de membrane des cellules tumorales. La différence de $\Delta\Psi\text{m}$ entre cellules normales et cellules malignes est de l'ordre de 60mV. Ceci suggère alors que les agents lipophiles cationiques cytotoxiques dont l'accumulation dans les cellules dépend du $\Delta\Psi\text{m}$, pourraient avoir des effets sélectifs pour les cellules cancéreuses. Ceci a été décrit pour la molécule antitumorale cationique, le N-méthylpyridinium ou F16. Elle s'accumule dans les mitochondries et entraîne leur dysfonctionnement *via* la dissipation du $\Delta\Psi\text{m}$ et déclenche la transition de perméabilité (Fantin & Leder, 2004). Son effet mitochondriotoxique est à l'origine de l'induction de l'apoptose ou de la nécrose selon les cellules cancéreuses ciblées. Cette molécule inhibe sélectivement la prolifération de lignées tumorales mammaires ou de tumeurs xénotransplantées chez la souris (Fantin & al, 2002), en particulier celles surexprimant le proto-oncogène *erb-2/neu* ou d'autres oncogènes tels *c-myc* et *v-Ha-ras*. Il est également possible que la constatation de la sélectivité relative du dérivé de synthèse de la Lam-D, le PM31379, pour les cellules tumorales de sein, de poumon ou des leucémies (Article 2 ; Kluzza & al, 2006) résulte de la présence d'une charge cationique sur la molécule à pH physiologique. Des molécules cationiques lipophiles à charge délocalisée ou DLCs sont sensibles au $\Delta\Psi\text{m}$ supérieur des cellules tumorales et s'accumulent alors sélectivement dans leurs mitochondries (Modica-Napolitano & Aprille, 2001). Les membres de la famille des DLCs sont variés d'un point de vue structural, et de manière non surprenante leurs cibles mitochondriales sont aussi très différentes. Ils sont actuellement à différents stades d'essais précliniques et cliniques pour leur potentielle utilisation dans le tropisme mitochondrial de drogues dans les cellules

tumorales. Ils constituent une stratégie unique pour délivrer des drogues préférentiellement aux tumeurs, épargnant ainsi les cellules saines dans l'espoir de réduire les toxicités associées aux drogues. De la même manière, les cations triphenylphosphonium lipophiles (TPP⁺) s'accumulent rapidement dans les mitochondries des cellules tumorales. Initialement utilisés comme sondes pour l'évaluation du $\Delta\Psi_m$, les TPP⁺ sont devenus des motifs d'adressage avec lesquels des molécules relevantes sont conjuguées dans le but de cibler leur incorporation dans la mitochondrie (Min & al, 2004, Madar & al, 2007 ; Wang & al, 2007).

✓ Le métabolisme bioénergétique des cellules tumorales est singulier. Dans les années 30, il a été démontré que le métabolisme des cellules cancéreuses dépendait surtout du glucose, même en présence d'oxygène en excès (Warburg, 1930). Cet effet connu sous le nom d'effet Warburg indique que les cellules cancéreuses synthétisent de l'ATP principalement par glycolyse « aérobie », mécanisme lié à la consommation de fortes concentrations en glucose et à la production de lactate. Les cellules cancéreuses peuvent ainsi s'adapter aux conditions d'hypoxie du microenvironnement tumoral par un mécanisme de réduction de la respiration mitochondriale et le passage vers le métabolisme glycolytique (King & al, 2006 ; Robey & Hay, 2006). En outre, l'acidification locale du microenvironnement de la tumeur peut faciliter son pouvoir invasif. Les cellules cancéreuses expriment de forts taux d'enzymes de glycolyse, y compris les transporteurs de glucose ou l'hexokinase II, enzyme glycolytique de localisation mitochondriale (Pelicano & al, 2006). Dans les cellules tumorales, l'hexokinase II qui augmente la glycolyse empêche simultanément la perméabilité de la membrane mitochondriale externe quand elle s'associe au canal VDAC de la membrane externe mitochondriale. Cette interaction est prédominante dans les cellules tumorales car elle est favorisée par deux situations fréquemment rencontrées dans les cancers. Il s'agit de la surexpression d'isoformes d'hexokinase (HKII en particulier) se liant à la mitochondrie (Mathupala & al, 2006) et par l'activation de la voie Akt qui stimule l'interaction entre l'hexokinase et VDAC (Robey & Hay, 2006). Aussi, l'hexokinase II s'avère une cible antitumorale particulièrement intéressante puisque son inhibition non seulement supprime la glycolyse aérobie, principale source d'énergie des cellules tumorales, mais favorise également la perméabilisation mitochondriale conduisant à la mort cellulaire. (Pelicano & al, 2006 ; Robey & Hay, 2006). En exploitant cette propriété, le méthyljasmonate, une substance hydrophobe dérivée des plantes, induit spécifiquement la mort des cellules tumorales *in vitro* et dans des modèles précliniques *in vivo* (Goldin & al, 2008). En effet, le méthyljasmonate se lie à l'HKII et rompt la formation des complexes HKII-VDAC, favorisant ainsi la

perméabilisation des mitochondries tumorales (Goldin & al, 2008). Malheureusement ces effets mitochondriaux spécifiques sont observés à des concentrations élevées de méthyljasmonate (de l'ordre du millimolaire). On peut espérer que de nouveaux agents capables de rompre la liaison HKII-VDAC de manière plus efficace seront synthétisés. Ainsi récemment, l'analogie peptidique du domaine de liaison de l'HK à VDAC (HXK2VBD) a été fusionné à la séquence d'internalisation de l'homéoprotéine d'*Antennapedia*. Cette construction inhibe la localisation à la mitochondrie de HK et sensibilise les cellules aux inducteurs de l'apoptose en impliquant Bax. (Abu-Hamad S & al, 2008).

Cibler sélectivement la mitochondrie tumorale en exploitant ses spécificités structurales.

Plusieurs protéines mitochondriales (ou isoformes) sont spécifiquement exprimées ou surexprimées dans les cellules tumorales et constituent ainsi autant de cibles pour accroître la spécificité des agents mitochondriophiles.

✓ Cibler les protéines de la famille de Bcl-2.

Les protéines de la famille de Bcl-2 sont souvent surexprimées dans les mitochondries des cellules tumorales et en particulier dans certaines leucémies. Plusieurs approches, dont certaines en essais cliniques, ont été développées pour interférer avec les membres de la famille Bcl-2.

- *La stratégie basée sur l'utilisation d'antisens Bcl-2* : les oligonucléotides antisens ont été conçus pour bloquer l'expression de ces protéines anti-apoptotiques. Les études pionnières se sont focalisées sur la protéine Bcl-2 elle-même (Reed & al, 1990). Puis par la suite, une série d'oligonucléotides antisens dirigés contre Bcl-2 et Bcl-xl a été synthétisée. A ce jour, l'oblimersen (AS Bcl2, G3139, Genasense, Genta, Berkeley Heights, NJ), un oligonucléotide antisens 18-mer phosphorothioate, cible les six premiers codons de l'ARNm de Bcl-2. C'est l'agent le plus avancé en clinique de sa catégorie. Dans les études précliniques, l'oblimersen seul a un effet cytostatique sur la croissance des xénogreffes de cancer du sein et de mélanome et a un effet synergique en combinaison avec la dacarbazine (Jansen & al, 1998). En combinaison avec un agent anticancéreux conventionnel, il diminue l'expression de Bcl-2 et potentialise la voie apoptotique mitochondriale conduisant à la mort des cellules de cancer gastrique et de cancer du sein (Kim & al, 2004 ; Emi & al, 2005 ; Labi & al, 2008). Bien qu'avancé en essais cliniques (phase III) avec des effets secondaires tolérables (Letai, 2005), l'efficacité de l'Oblimersen est variable. Dans les leucémies lymphocytaires chroniques

(LLC), la fludarabine et le cyclophosphamide combinés à l'oblimersen entraînent une réponse significativement améliorée chez les patients (Letai, 2005). Néanmoins, on doit tenir compte également des effets non spécifiques des antisens lors de l'analyse de son efficacité thérapeutique dans les essais cliniques. La production de ROS, la production d'IFN γ et l'action immuno-stimulatrice par l'intermédiaire d'un motif cytosine-phosphate-guanosine (CpG) dans les oligonucléotides antisens pourraient contribuer à ses effets anticancéreux (Labi & al, 2008 ; Kim & al, 2007).

- *La stratégie des BH3 mimétiques.* Une autre approche pour provoquer la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe est de cibler l'interface de dimérisation entre les membres anti-apoptotiques et les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. L'analyse mutationnelle a démontré l'importance du domaine BH3 pour la dimérisation des protéines Bcl-2 (Letai & al, 2002). Basée sur cette notion, une série de petites molécules peptidomimétiques dites peptides BH3-mimétiques, bloquant l'hétérodimérisation entre les membres pro- et anti- apoptotiques de cette famille, a été générée. Ces BH3-mimétiques dérivent non seulement des protéines BH3-only telles Bad et Bid, mais aussi des protéines à multi-domaines Bax et Bak (Moreau & al, 2003). Des peptides BH3-mimétiques induisent l'oligomérisation de Bax et Bak, la perméabilisation de la MME et la libération de cytochrome-c conduisant à la mort des cellules cancéreuses, comme les cellules de carcinome squameux de la tête et du cou (Shangary & al, 2002 ; Li & al, 2007). L'avantage majeur de cette approche par rapport à l'antisens, réside dans la possibilité de cibler l'ensemble des inhibiteurs d'apoptose de la famille Bcl-2. Il s'agit sans doute du développement le plus important dans le domaine des molécules mitochondriophiles antitumorales. Ainsi, des drogues « BH3-mimétiques » naturelles et synthétiques ont été identifiées :

*L'Antimycine-A, précédemment caractérisée comme un inhibiteur de la chaîne de transport des électrons (complexe III) se lie au domaine BH3 de Bcl-xl et Bcl-2 et induit l'apoptose des cellules surexprimant Bcl-2 et Bcl-xl (Tzung & al, 2001). Un énantiomère dépourvu d'activité inhibitrice de la respiration conserve sa capacité à induire la mort cellulaire dans le même contexte, démontrant qu'il s'agit là de deux propriétés distinctes de l'Antimycine-A. Les analyses de docking moléculaire indiquent que l'Antimycine-A cible la poche de liaison BH3 des molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Tzung & al, 2001).

*D'autres composés naturels comme la Tetrocarcine-A, métabolite secondaire dérivé d'*Actinomyces sp.* (Nakashima & al, 2000), la Chelerythrine (Chan & al, 2003 ; Zhang & al, 2006), la Sanguinarine, alcaloïde benzophenanthridine d'origine végétale, l'acide gambogique dérivé de résines gamboges de l'arbre *Garcinia hanburyi* (Zhai & al, 2008) et certains polyphénols comme le Gossypol extrait de graine de coton, l'Apogossypol et la Purpurogalline (Kitada & al, 2003), provoquent la mort cellulaire en se liant à Bcl-2 et Bcl-xl, inhibant ainsi leurs fonctions anti-apoptotiques. Les études de RMN avec Bcl-xl révèlent que le Gossypol et la Purpurogalline entrent en compétition au niveau de la poche de liaison BH3 (Kitada & al, 2003). Alors que certains de ces composés agissent comme de vrais « BH3-mimétiques », d'autres semblent inhiber les membres de la famille Bcl-2 sans cibler la poche de liaison BH3 en elle-même. Par exemple, la Chelerythrine et la Sanguinarine se lient respectivement au sillon BH et à la région BH1 de Bcl-xl, à l'opposé de la fente de liaison BH3 qui est ciblée par les autres inhibiteurs connus de Bcl-xl (Zhang & al, 2006).

L'activité antitumorale du (-)Gossypol est associée à de nombreux mécanismes d'action dont à son effet direct sur la mitochondrie (Benz & al, 1990). De manière intéressante, le Gossypol se lie à Bcl-2 et Bcl-xl avec une affinité relativement élevée (Kitada & al, 2003). Il augmente l'efficacité des radiations dans des xénogreffes de cancers de la prostate hormono-résistants (Xu & al, 2005). De toutes les molécules de cette catégorie précédemment énoncées, seul le Gossypol, sous une forme orale, est en essais cliniques (phase I/II) pour le traitement de patients souffrant de cancers du sein métastatiques résistants (Van Poznak & al, 2001) et pour le traitement de patients atteints de glioblastome multiforme en association avec le Témazolamide, un alkylant, avec ou sans radiothérapie.

*HA14-1 ou éthyl 2-amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)-4H-chromène-3-carboxylate a été identifié par chimie computationnelle en utilisant la structure tridimensionnelle connue de Bcl-2 (Wang & al, 2000). Première petite molécule inhibitrice de Bcl-2, HA14.1 se lie à la poche hydrophobe à la surface de Bcl-2 et est capable d'induire l'apoptose dépendante des caspases dans plusieurs lignées cellulaires tumorales.

*D'autres petites molécules non-peptidiques antagonistes de Bcl-2 ou Bcl-xl sont en développement, tel le dérivé du *diazocine dioxyde*, le NSC365400 et le composé thiazolidine BH3I2. Ce dernier est un inhibiteur de peptide BH3 se liant à Bcl-xl.

*Un nouveau BH3-mimétique 072RB, de localisation mitochondriale (Ponassi & al, 2008) entraîne la mort de lignées leucémiques et de cellules dérivées de patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës. L'administration intraveineuse du 072RB dans des xénogreffes

murines d'AML humaines retarde la croissance des cellules leucémiques sans toxicité apparente pour le tissu sain.

*GX15-003 et GX15-070 (Obatoclax), induisent l'apoptose dans les cellules B isolées d'échantillons de leucémies lymphoblastiques chroniques (*Campas & al, 2006*). Le GX15-070 favorise le relargage de cytochrome-c hors des mitochondries isolées de cellules leucémiques. L'apoptose induite par cet agent est précédée de la dissociation de Bak à partir de Mcl-1 et de la formation d'un complexe actif Bak/Bax. L'apoptose est réduite mais non prévenue en l'absence de Bax/Bak ou Bim, suggérant que l'Obatoclax dispose de cibles supplémentaires contribuant en sa cytotoxicité (*Konopleva & al, 2008*).

*Récemment l'ABT-737, une petite molécule inhibitrice des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w, a été synthétisé. Il présente une affinité de liaison deux à trois fois supérieure à celle des autres composés précédemment énoncés. L'ABT-737 est capable de rompre les interactions protéine-protéine intracellulaires de la famille Bcl-2. Les études mécanistiques révèlent que l'ABT-737 n'initie pas directement le processus apoptotique, mais potentialise les effets des signaux de mort. Il exerce une cytotoxicité synergique avec les agents chimiothérapeutiques et les radiations (*Oltersdorf & al, 2005*). L'ABT-737 potentialise la mort cellulaire induite par TRAIL en libérant Bim et Bax de leurs sites de liaison et en favorisant les changements conformationnels de Bax induits par TRAIL dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines (*Huang & Sinicrope, 2008*). Par ailleurs, l'ABT-737 stimule l'activité de la vincristine, du L-ASP et de la Dexaméthasone dans les leucémies lymphoblastiques *in vitro* et *in vivo* (*Kang & al, 2007*). Il induit aussi l'apoptose dans les cellules de leucémies myéloïdes chroniques présentant divers mécanismes de résistance aux drogues (*Kuroda & al, 2008*), dans les lymphomes, les lignées de SCLC, ainsi que dans les cellules primaires issues de patients et dans les modèles animaux (*Vogler & al, 2008*). En plus de rompre l'interaction entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, d'autres mécanismes d'action de l'ABT-737 ont récemment été décrits. L'ABT-737 induit à la fois la perméabilisation des MME et MMI, conduisant à un gonflement de la matrice mitochondriale et à la rupture consécutive de la MME, permettant ainsi un efflux rapide du cytochrome-c hors de l'EIM (*Vogler & al, 2008*). Comme l'ABT-737, son dérivé actif oralement, l'ABT-263, se lie avec une forte affinité à Bcl-2, Bcl-xl, et Bcl-w. L'ABT-263 est en essais cliniques dans le traitement des lymphomes, des cancers pulmonaires à petites cellules, et des leucémies lymphocytaires chroniques (*Vogler & al, 2008*).

Tandis que ces approches fortes prometteuses sont en cours d'évaluation, d'autres stratégies plus inattendues manipulant Bcl-2 sont en cours de développement. Par exemple, l'idée de convertir les propriétés anti-apoptotiques de Bcl-2 en propriétés pro-apoptotiques a été émise (Kolluri & al, 2008). La boucle non structurée de Bcl-2 qui lie le domaine BH3 au domaine BH4, définit une importante cible pour la conversion de Bcl-2 en une molécule pro-apoptotique. Le récepteur nucléaire Nur77 convertit Bcl-2 en se liant à cette boucle (Lin & al, 2004). Récemment, un peptide « convertisseur de Bcl-2 » et dérivant de Nur77, composé de 9 acides aminés (NuBCP-9) a été identifié et présente la capacité d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*. NuBCP-9 agit comme un « switch moléculaire » délogeant le domaine BH4 de Bcl-2, explosant alors son domaine BH3, ce qui en retour bloque l'activité anti-apoptotique de Bcl-xl (Kolluri & al, 2008).

✓ Cibler les protéines du pore de TP spécifiques des mitochondries tumorales.

Plusieurs molécules appartenant au pore de TP sont exprimées différenciellement sur les mitochondries des cellules tumorales en comparaison aux cellules normales. Les cellules cancéreuses modifient l'expression des isoenzymes de l'ANT, réduisant l'expression de l'isoforme pro-apoptotique ANT1 et augmentant l'expression de l'isoforme anti-apoptotique ANT2 (Giraud & al, 1998). La surexpression de l'isoforme II de l'ANT a été retrouvée dans plusieurs types de cellules tumorales comme les cancers du rein tandis qu'elle est normalement réprimée dans les cellules quiescentes (Giraud & al, 1998 ; Barath & al, 1999). De même une surexpression du récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), ou de sa protéine associée, Prax-1, caractérise les cellules tumorales (Decaudin, 2004). Des taux élevés d'expression du PBR sont corrélés avec l'agressivité des tumeurs (Venturini & al, 1999 ; Beinlich & al, 2000 ; Maaser & al, 2001-2005). Enfin, une expression importante de la créatine kinase mitochondriale est présente dans les cancers du sein. Sur la base de ces constatations, plusieurs approches antitumorales ont été développées.

L'isoquinoline carboxamide PK11195 et l'indole acétamide FGIN-1-27 sont de puissants antagonistes du PBR des mitochondries tumorales. Ils induisent l'apoptose ou sensibilisent les cellules à son induction en impliquant la voie mitochondriale et potentialisent l'apoptose induite par la doxorubicine, l'étoposide, la dexaméthasone dans diverses lignées cancéreuses (Hirsch & al, 1998). Fait marquant, il facilite la neutralisation de l'effet anti-apoptotique de Bcl-2 et Bcl-xl. Dans ces modèles, le PK11195 contribue à l'initiation de la TP probablement en changeant la conformation du pore de TP. Son activité chimio-sensibilisante peut

également être corrélée à un effet direct sur la mitochondrie tumorale mais indépendant du PBR (*Gonzalez-Polo & al, 2005*). Dans les cellules cancéreuses colorectales, la stimulation pro-apoptotique de PK11195 ne dépendrait pas obligatoirement de son effet sur le PBR mais d'un stress oxydatif (*Maaser & al, 2005*). De plus, le PK11195 peut sensibiliser les cellules leucémiques et de myélomes à l'apoptose sans interagir avec le PBR. (*Walter & al, 2005*). Cependant, la réponse cellulaire observée pour des concentrations en PK11195 de l'ordre du micromolaire, communément attribuée à la modulation du PBR, est probablement la conséquence de l'inhibition de la F1/F0-ATPase, récemment proposée comme cible du PK11195 (*Cleary & al, 2007*). Les ligands synthétiques du PBR tel que le Ro5-4864 induisent spécifiquement l'apoptose des cellules tumorales *in vitro* (*Decaudin 2004, Decaudin & al, 1998-2002*). Il potentialise l'inhibition de la croissance tumorale provoquée par l'étoposide et l'isophosphamide dans des modèles de xéno greffes de SCLC (*Decaudin & al, 2002*). Les ligands au PBR ont été conjugués à la Gemcitabine pour augmenter la sélectivité de cet agent antitumoral (*Guo & al, 2001*).

Des agents comme la lonidamine, le CD437 le trioxide d'arsenic (As_2O_3), induisent un changement conformationnel de l'ANT, favorisant l'ouverture du pore (*Belzacq & al, 2001 ; Ravagnan & al, 1999 ; Notario & al, 2003 ; Marchetti & al, 1999*). Cependant aucun de ces agents ne sont spécifiques de l'ANT2 et ils ne sont donc a priori pas ciblés aux mitochondries tumorales. De manière intéressante, la sous-expression de l'ANT2 par ARN interférence sensibilise spécifiquement les cellules tumorales aux chimiothérapies (Le Bras 2006).

Ainsi les différences entre mitochondries de cellules cancéreuses et de cellules normales semblent être suffisamment nombreuses et devraient être prises en compte pour réévaluer la mitochondrie comme cible antitumorale.

Les Lamellarines pourraient-elles constituer une nouvelle classe d'agents anticancéreux potentiels ?

Au vu de la littérature et de nos travaux, plusieurs arguments expérimentaux militent en faveur ou en défaveur de l'utilisation potentielle des Lamellarines comme agents anticancéreux.

Pour résumer, les arguments favorables à l'utilisation des Lamellarines sont les suivants :

- Les Lamellarines, par leur activité mitochondriale directe, sont de puissants inducteurs d'apoptose des cellules tumorales *in vitro* (Articles 1 et 2). Cet effet pro-apoptotique est observé à des concentrations de l'ordre du micromolaire, concentrations compatibles avec la dose efficace utilisée dans les modèles de xénogreffes *in vivo*.
- Les Lamellarines contournent les voies classiques de résistance des cellules tumorales à l'induction de l'apoptose (mutation inactivatrice de p53, présence de PgP, surexpression de Bcl-2, voie dépendante des caspases inefficace) (Articles 1 et 2).
- A dose sub-létale (de l'ordre du nanomolaire), les Lamellarines sont des inhibiteurs de la topoisomérase-1 induisant un arrêt définitif de la prolifération cellulaire (Facompré & al, 2003 ; Article 2 et données non présentées).
- Les Lamellarines possèdent de multiples cibles dans la cellule tumorale (mitochondrie, topoisomérase-1, kinases) (Article 2 ; Facompré & al, 2003 ; Baunbaek & al, 2008)

A l'inverse, deux arguments ne permettent pas une utilisation antitumorale des Lamellarines en l'état. Il s'agit :

- d'une faible sélectivité pour les cellules tumorales à l'origine d'altérations structurales des mitochondries des cardiomyocytes *in vivo*.
- de l'induction de la sénescence des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* lorsque la Lamellarine-D est utilisée à doses sub-létales (données personnelles). En effet, des données du laboratoire montrent que la Lam-D par son effet nucléaire dépendant de la topoisomérase-1 induit la sénescence de lignées tumorales. Le rôle de la sénescence dans le cancer peut être à double tranchant. La sénescence cellulaire, par son arrêt définitif du cycle, peut-être un mécanisme de sauvegarde suppresseur des tumeurs (Ohtani & al, 2009). A l'inverse, la sénescence ne conduisant pas à la destruction de la cellule tumorale, permet la persistance dans l'organisme de cellules potentiellement dangereuses et de ce fait, la sénescence cellulaire ne constitue pas l'effet attendu d'une chimiothérapie.

Peut-on améliorer l'effet antitumoral des Lamellarines ?

Afin d'améliorer l'efficacité des Lamellarines, au moins deux possibilités sont possibles :

- soit développer des dérivés synthétiques ciblés au noyau (et donc privilégier l'effet inhibiteur de topoisomérase-1) pour s'affranchir de l'effet mitochondriotoxique,
- soit privilégier un ciblage des mitochondries tumorales.

Cette première approche a été effectuée récemment en synthétisant un bioconjugué formé de la Lamellarine-D liée à un peptide qui contient la séquence d'adressage nucléaire de type NLS (Pla & al, 2009). La distribution nucléaire exclusive de certains bioconjugués se traduit par un gain d'efficacité sur quelques lignées *in vitro* et une réduction de toxicité vis-à-vis de fibroblastes (Pla & al, 2009).

A l'inverse, on pourrait s'imaginer utiliser les capacités mitochondriophiles des Lamellarines en synthétisant des bioconjugués ciblant certaines cellules tumorales en s'inspirant des approches utilisant des peptides chimériques. Ainsi, le Mastoparan, un petit peptide isolé du venin de guêpe, est capable d'induire la MPT *via* son interaction avec VDAC par un mécanisme régulé par la cyclophiline-D (Pfeiffer & al, 1995). Le peptide (KLAKLAK)₂, structurellement similaire au Mastoparan, induit directement la perméabilisation des membranes mitochondriales (Ellerby & al, 1999). Récemment, conjugué à un anticorps monoclonal spécifique anti-CD19, le (KLAKLAK)₂ tue sélectivement les lignées lymphoïdes B, encourageant une thérapie antitumorale sélective des hémopathies malignes (Marks & al, 2005). De plus, le (KLAKLAK)₂ a été fusionné aux peptides de ciblage des récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales angiogéniques dans les tumeurs (avec le motif « homing » RGD-like des vaisseaux sanguins tumoraux (Ellerby & al, 1999) ou à la surface des vaisseaux de la prostate (Arap & al, 2002), ou avec un peptide inhibiteur de la kinase du récepteur ErbB2 (Fantin & al, 2005). Dans ce cas, ces peptides chimériques sont transloqués à la mitochondrie où ils induisent la perméabilisation de la MME spécifiquement dans la population cellulaire ciblée. Le peptide inhibant la kinase d'ErbB2 réduit également la croissance tumorale de xénogreffes de tumeurs mammaires humaines surexprimant HER-2 dans les souris SCID.

L'autre possibilité serait d'utiliser les Lamellarines mitochondriophiles à des concentrations sub-toxiques pouvant sensibiliser les cellules à d'autres stimuli apoptotiques. Par exemple, les cellules HeLa prétraitées avec des inhibiteurs de la CRM sont plus sensibles à l'apoptose induite par Fas à des concentrations inférieures (Asoh & al, 1996).

Quoiqu'il en soit, de nombreuses études complémentaires seront nécessaires pour savoir quelle(s) cible(s) des Lamellarines faut-il privilégier afin que des dérivés puissent être un jour utilisables dans le traitement des cancers.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES.

L'ensemble de ces travaux nous a permis de montrer :

- l'efficacité pro-apoptotique des Lamellarines, y compris dans des cellules chimiorésistantes,
- un rôle primordial de la mitochondrie dans l'apoptose induite par les Lamellarines.

De plus, les Lamellarines utilisées comme outils pharmacologique, nous ont permis d'apporter des connaissances fondamentales sur l'apoptose de lignées de carcinomes pulmonaires chimiorésistantes.

Alors qu'une réponse fait naître à son tour d'autres questions, dont certaines ont été abordées au laboratoire, nous en formulerons les principales comme suit :

- Quelles sont les cibles mitochondriales des Lamellarines ?
- Quelles sont les voies impliquées dans la sénescence induite par la Lam-D ?

AUTRES TRAVAUX

**APOPTOSIS-RELATED MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION DEFINES HUMAN
MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS WITH IMPAIRED IMMUNO-
STIMULATORY CAPACITIES.**

Laurent Castera⁺, Anne Sophie Hatzfeld-Charbonnier⁺, Caroline Ballot, Florence Charbonnel, Edith Dhuiège, Thierry Velu⁺⁺, Pierre Formstecher, Laurent Mortier* and Philippe Marchetti*

Inserm U837 and Plate-forme de Biothérapie, Faculté de Médecine Université de Lille II, Place de Verdun 59045 Lille Cedex France et Centre de Biologie Pathologie CHRU Lille

⁺⁺ Department of Medical Oncology, Erasme Hospital, Université Libre de Bruxelles, Route de Lennik 808, 1070 Brussels, Belgium

⁺ LC & A-S HC contributed equally to this paper.

Journal of Cellular & Molecular Medicine, 2008 May, 2.

La mort des cellules dendritiques (DC) peut potentiellement influencer les réponses immunitaires en affectant la durée de stimulation des lymphocytes. Dans ce travail, nous rapportons que les DC dérivées des monocytes matures en culture manifestent des dommages mitochondriaux précoces (dans les 24h), caractérisés par la chute du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) et la libération mitochondriale des facteurs pro-apoptotiques, suivies de la production de ROS et de l'activation des caspases. Les DC présentant des altérations mitochondriales sont alors condamnées à mourir par apoptose ou nécrose. Les analyses de macroarrays (validées par QRT-PCR et immunoblot), montrent la surexpression du membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, Bim, alors que plusieurs molécules anti-apoptotiques sont sous-exprimées. De manière étonnante, les cellules dendritiques pré-apoptotiques (caractérisées par un faible $\Delta\Psi_m$) présentent un phénotype modifié associé à une sous-expression de HLA-DR et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Par ailleurs, les DC à faible $\Delta\Psi_m$ viables sont incapables d'activer les cellules T allogéniques, indiquant que les DC pré-apoptotiques ont perdu certaines de leurs compétences immuno-stimulatrices bien avant que tout signe de mort ne soit détectable. L'altération de la respiration mitochondriale avec la roténone entraîne les mêmes modifications des fonctions immunitaires des DC. Ces données indiquent une forte implication de l'intégrité mitochondriale dans les compétences immuno-stimulatrices des DC. La détermination du $\Delta\Psi_m$ pourrait ainsi être un paramètre utile pour sélectionner des cellules dendritiques pleinement fonctionnelles pour la vaccination antitumorale.

Apoptosis-related mitochondrial dysfunction defines human monocyte-derived dendritic cells with impaired immuno-stimulatory capacities

Laurent Castera^{a,†}, Anne Sophie Hatzfeld-Charbonnier^{a,†}, Caroline Ballot^a,
Florence Charbonnel^a, Edith Dhuiege^a, Thierry Velu^{a,b}, Pierre Formstecher^a,
Laurent Mortier^{a,‡}, Philippe Marchetti^{a,*}

^a Inserm U837 and Plate-forme de Biothérapie, Faculté de Médecine Université de Lille II 1,
Place Verdun Lille Cedex France et Centre de Biologie Pathologie CHRU Lille, France

^b Department of Medical Oncology, Erasme Hospital, Université Libre de Bruxelles,
Route de Lennik, Brussels, Belgium

Q1

Received: December 7, 2007; Accepted: April 21, 2008

Q2

Abstract

The death of dendritic cells (DCs) can potentially influence immune responses by affecting the duration of DC stimulation of lymphocytes. Here, we report that cultured mature monocyte-derived DCs manifest early mitochondrial damage (*i.e.* within 24 hrs), characterized by mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) disruption and mitochondrial release of pro-apoptotic factors, followed by ROS production and activation of caspases. Afterwards, DCs with mitochondrial alterations are condemned to undergo apoptosis and necrosis. Macroarray analysis results (validated by QRT-PCR and immunoblotting), showed up-regulation of the pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, Bim, while expression of several anti-apoptotic molecules was down-regulated. Importantly, pre-apoptotic DCs (characterized by a low $\Delta\psi_m$) showed a modified phenotype, with down-regulation of HLA-DR and of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86. Moreover, sorted viable low $\Delta\psi_m$ DCs were unable to activate allogeneic T cells, indicating that pre-apoptotic DCs have already lost some of their immuno-stimulatory capabilities long before any detectable signs of death occur. Perturbations to mitochondrial respiration with rotenone identified the same modifications to DC immune functions. These data indicate a strong requirement for mitochondrial integrity for the immuno-stimulatory capacities of DC. Determining $\Delta\psi_m$ could be a useful parameter to select 'fully' functional DCs for anti-tumour vaccines.

Q3

Q4

Keywords: apoptosis • DC longevity • immunotherapy

Introduction

A delicate balance between cell death by apoptosis and cell survival is a key mechanism for proper regulation of the immune system. Apoptosis has to take

place constantly to counterbalance immune cell activation and proliferation. Hence, lymphocyte apoptosis is at the heart of the homeostatic regulation of the immune system. However, lessons from animal models indicate that death of other immune cell types may also be critical for the maintenance of correct immune responses. As dendritic cells (DCs) are the main antigen presenting cells, with an unequalled capacity for eliciting immune responses, the control

*Correspondence to: Philippe MARCHETTI, M.D., Ph.D.,
Inserm U 837, 1 Place Verdun,
F- 59045 Lille Cedex, France
Tel.: +00-33-3-20-62-69-52
Fax: +00-33-3-20-62-68-84
E-mail: philippe.marchetti@lille.inserm.fr

Q5

† P.M. and L.M. share the co-seniorship of this paper.
‡ L.C. and A.S.H.C. contributed equally to this paper.

Q6 © 2008 The Authors

Journal compilation © 2008 Foundation for Cellular and Molecular Medicine/Blackwell Publishing Ltd

doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00358.x

1 of their number and lifespan might also influence the
2 regulation of the immune system. Consequently,
3 much attention has been paid recently to the role of
4 DC apoptosis in the maintenance of proper immune
5 control. In mice, spontaneous death in DCs regulates
6 the immune response [1]. As a result, DCs with an
7 increased lifespan induce a stronger immune
8 response [1–3]. In transgenic mice selectively
9 expressing apoptosis inhibitors in their DCs, defec-
10 tive DC apoptosis leads to DC accumulation which,
11 in turn, induces lymphocyte over-activation, resulting
12 in the onset of systemic autoimmunity [4].
13 Conversely, one can imagine that accelerated clear-
14 ance of DCs by apoptosis reduces their duration for
15 stimulating lymphocytes, thereby, leading to a less
16 effective immune response.

17 Nuclear alterations accompanying apoptosis are
18 late events of the apoptotic cascade and occur
19 under the control of two canonical apoptosis path-
20 ways. The extrinsic apoptosis pathway is mediated
21 by death receptors, such as the receptors for Fas
22 and tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-
23 inducing ligand (TRAIL), and caspase-8, *i.e.* the
24 major initiator caspase in this pathway. Several
25 death receptors, including Fas, are expressed in
26 monocyte-derived DCs. However, DCs are known to
27 be resistant to Fas-induced cell death through the
28 constitutive expression of FLICE-like inhibitory pro-
29 tein (FLIP), a strong inhibitor of apoptosis initiated
30 by death receptors [5].

31 The intrinsic apoptosis pathway requires mito-
32 chondrial-specific signalling. Mitochondria initiate
33 apoptosis through mitochondrial outer membrane
34 permeabilization and the release of apoptogenic fac-
35 tors (*e.g.* cytochrome *c*, AIF or Smac/Diablo) from
36 the mitochondrial intermembrane space, leading to
37 cell death through caspase-dependent and -inde-
38 pendent pathways. Signalling cascades can also
39 affect the inner mitochondrial membrane permeabili-
40 ty in apoptosis and necrosis. As a consequence,
41 cells also exhibit a loss of electrical potential across
42 the inner membrane which is quantifiable by means
43 of potentiometric dyes, a measure that precedes
44 signs of nuclear apoptosis and cell death [6].
45 Mitochondrial dysfunction, characterized by marked
46 reduction in mitochondrial membrane potential
47 ($\Delta\psi_m$), is an early step of ongoing DC death that can
48 be triggered by many cytotoxic stimuli [7–13]. Inner
49 and outer mitochondrial membrane permeabilization
50 is tightly regulated by the opposing actions of pro-

and anti-apoptotic Bcl-2 family members. Compelling
evidence indicates that mitochondria-related proteins
of the Bcl-2 family are crucial DC death sensors [9,
12, 14–16], substantiating the importance of mito-
chondria in DC apoptosis.

Owing to their critical role in the induction of anti-
gen-specific T-cell responses, DCs are increasingly
used in active immunotherapy of malignant diseases.
Currently, much effort is being applied to engineering
DCs for active vaccines, which appears to be a prom-
ising approach for the development of anti-tumour
immune responses. The most frequently described
method for obtaining DCs is their *ex vivo* generation
from peripheral blood cells, such as monocytes.
Generally, these monocyte-derived DCs are subject-
ed to a process of maturation prior to their adminis-
tration to patients. Several reports recently advocat-
ed that the immuno-stimulatory properties of
DC-based vaccines are limited by their short lifespan
[16, 17]. In this context, unveiling the mechanisms
regulating mature monocyte-derived DC death is
fundamental for developing a better understanding of
their effects on immune functions. Therefore, we
examined the mechanisms of spontaneous apopto-
sis of DCs by focusing on an early event, mitochon-
drial dysfunction, and clarified the consequences of
commitment to apoptosis on DC immuno-stimulatory
functions. Rapid commitment of DCs to apoptosis
was associated with impaired capacity to induce an
immune response long before the loss of DC viabili-
ty. These insights are important for further under-
standing DC depletion, as well as for the direct quan-
titative evaluation of ongoing apoptosis in clinically
used DCs. We propose that mitochondrial alterations
in DCs should be considered, and exploited, for anti-
tumour vaccine development.

Materials and methods

Reagents

Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* serotype
0111:B4 (LPS), propidium iodide (PI), rotenone and car-
bamoyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (mCICCP)
were obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier,
France). GMCSF and IL4 were from ProSpec-Tany Techno
Gene Ltd. (Le Perray en Yvelines, France). The 5-(and-6)-
carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE)

Q7

Q8

1 was from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Z-VAD-fmk
2 was from Bachem (Budendorf, Switzerland). The 3,3'-
3 dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6(3)), hydroethidine
4 (HE), chloromethyl-X-Rosamine (CMX-ROS) were pur-
5 chased from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).
6 FITC-VAD-fmk was from Promega (Madison, WI, USA).

8 DC generation

10 DCs were generated from monocytes issued from buffy
11 coats taken from healthy donors, as previously described
12 [18]. For maturation, DCs were then cultured with 1 µg/ml
13 LPS for 18 hrs in the presence of GMCSF (800 U/ml) and
14 IL4 (100 U/ml) in six-well plates at 10⁶ cells/ml.
15 Alternatively, DCs were subjected to maturation with
16 10 µg/ml poly (I:C) (Sigma) or 5 µg/ml anti-CD40 mAb
17 (Diaclone, Besançon, France). Afterwards, mature DCs
18 were washed, analysed or further cultured for 4 days in
19 complete RPMI.

21 Detection of cell death

23 Assessment of PS exposure was performed by the binding
24 of annexin V-FITC, using the protocol outlined in the FITC-
25 Q9 Annexin kit (BD Pharmingen). The frequency of hypoploid
26 cells (sub-G1 cells) was assessed, as described previous-
27 ly [19]. DNA fragmentation (10 × 10⁶ cells/lane) was deter-
28 mined by horizontal agarose gel electrophoresis, following
29 published methods [19]. Measurement of the specific activ-
30 ity of caspases was performed with Caspase-Glo 3/7,
31 Caspase-Glo 8 and Caspase-Glo 9 assay kits (Promega)
32 following the manufacturers' instructions.

34 Cytofluorometric assessment 35 of ΔΨ_m and ROS production

37 ΔΨ_m was measured by means of DiOC6(3) or CMX-ROS,
38 as described [20]. Pilot experiments indicated that both flu-
39 orochromes were reliable probes to monitor ΔΨ_m in DCs
40 (not shown) and so the choice of fluorochrome used
41 depended on its fluorescence spectrum in order to permit
42 its use in combination with other fluorescent dyes.
43 DiOC6(3) produces a single fluorescent emission peak col-
44 Q10 lected through the FL1 detector (525± 5 nm band pass fil-
45 ter allowing combination with the supravital fluorochrome
46 PI (5 µg/ml in PBS just before analysis) or with HE (1 µM in
47 PBS, 15 min. at 37°C) to measure ROS production, both of
48 which emitted fluorescence signals detected through the
49 FL3 detector (620 ± 5 nm band pass filter). Samples were
50 stored on ice before cytofluorometric analysis. Control

experiments were done in the presence of 10 µmol/l
mCICCP, an uncoupling agent that abolishes ΔΨ_m, for
15 min. at 37°C. For all cytofluorometric experiments, a min-
imum of 10,000 cells were analysed on a Coulter XL
cytometer (Beckman-Coulter). Assessment of DC viability
and ΔΨ_m simultaneously allowed sorting of the viable pop-
ulation of DC in relation to their ΔΨ_m [21]. Immediately after
staining, DCs were sorted flow cytometrically on a Coulter
ALTRA cell sorter. The standard mode 'ultimate purity' was
used to sort DCs with high purity. The sorter was operated
at 10 psi with sheath fluid. Sort gates were placed around
viable (PI or YOPRO negative cells), ΔΨ_m high or ΔΨ_m low
DC populations. The purity of sorted cell populations was
checked by immediate re-analysis and was always >98%. Q11

Mitochondrial calcium retention capacity

For determination of mitochondrial calcium loading, a pro-
cedure described previously [22] was used with some mod-
ifications. At the times indicated, 2 × 10⁶ DCs were sus-
pended in 1 ml of buffer (150 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄,
1 mM MgCl₂, 5 mM succinate, 5 mM Tris, pH 7.4) and per-
meabilized with 0.002% digitonin. Calcium concentration
changes were continuously recorded in a multi-port meas-
urement chamber (NOCHM-4, WPI, Aston, UK) equipped
with calcium-sensitive and reference electrodes. At the end
of the incubation period, 10 µM CaCl₂ pulses were per-
formed with a micro-syringe injector adapted to a Micro4
pump controller (UMPII and Micro-4, WPI).

Immunofluorescence microscopy

Sub-cellular distribution of AIF and cyt c was revealed by
immunofluorescence staining and nuclei counterstained
with Hoeschst 33342 following published methods [19].

Cell surface immunostaining

All FITC-conjugated mAbs used were purchased from
Becton Dickinson, (Le Pont de Claix, France). FITC-conju-
gated antimouse IgG was from Jackson Immunoresearch
(West Baltimore, MD, USA). For the simultaneous assess-
ment of surface markers and ΔΨ_m, DCs were first stained
with 50 nM CMX-ROS at room temperature for 30 min. (flu-
orescence was collected through the FL3 detector) and
then stained with appropriate dilutions of FITC-conjugated
anti-CD1a, anti-HLA-DR, anti-CD86, anti-CD80, anti-
CD11c or anti-CD83 antibodies for 30 min. on ice prior to
flow cytometric analysis.

Allogenic naïve T-cell response

T-cell activation was assessed by flow cytometry measuring CFSE fluorescence intensity as described previously [18]. Second, IFN- γ , IL-4 and IL-10 production by T cells co-cultured with DCs was measured in day 5 co-culture supernatants by ELISA (Diaclone).

Apoptosis gene superarray

DCs were collected immediately after maturation (D0) or cultured for 24 hrs in complete RPMI as above (D1). After removing the supernatant, total RNA was extracted using the Qiagen RNeasy mini Kit Qiagen SA (Courtaboeuf, France). RNA samples were checked for quality using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Samples were frozen at -80°C until use in superarray. For analysis, 3 μg of RNA was reverse-transcribed with Biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics, Meylan, France) using a SuperArray TrueLabeling-RT Enzyme kit (SuperArray, Inc., Frederick, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. The resulting biotinylated cDNA probe mixture was allowed to hybridize overnight to the Q Series Human Apoptosis (Cat no: HS-002, SuperArray, Inc. [see www.superarray.com for detail]) at 60°C overnight. Data were acquired and analysed according to the manufacturer's protocol. All signal intensities were PUC18 plasmid DNA (negative control) background subtracted and normalized to cyclophilin A spots (positive control). Scatter plots were made from normalized signals. The relative expression level of each gene was based on the ratio of cyclophilin A. Changes in gene expression were illustrated as a fold increase/decrease. Experiments were repeated three times.

Q12 Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

The PCR was carried out with the LC FastStart Masterplus SYBR green I kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) using 200 ng of cDNA in a 10 μl final volume, 0.5 μM of each primer (final concentration). Primers used for qPCR were: CFLAR (sense) 5'-GTGTG-GATCAGACTCACTCAGGG-3', (forwards) 5'-CATAGTTCTGA-ATAAAAAACATCTTTGGC-3', MCL1 (sense) 5'-GCAGC-GCAACC ACGAGA-3' (forwards) 5'-CTAATGGTTCGATG-CAGCTTTCT-3', BCL2L1 (sense) 5'-CATGGCAGCAGTA-AAGCAAG-3' (forwards) 5'-ACAATGCGACCCAGTTT-AC-3', BCL2L11 (sense) 5'-AAGACAGGAGCCCAGCA-CC-3' (forwards) 5'-TCTTCGGCTGCTTGGTAATTATTC-

3', RIPK2 (sense) 5'-AACGTCTGCAGCCTGGTATAGC-3' (forwards) 5'-TTGAGGTCCTGTAGGCTTGGA-3', TNFRSF6 (sense) 5'-TCTTTCTCAGGCATCAAAGCAT-3' (forwards) 5'-TGGAGAGGTGGCAAAGCTCTA-3', GADD45A (sense) 5'-TGCGAGAACGACATCAACAT-3' (forwards) 5'-TGATCCATGTAGCGACTTTC-3', TNFSF10 (sense) 5'-CTGTG TGGCTGTAACCTACGTGTACTT-3' (forwards) 5'-TTCTAACGAGCTGACGGAGTTG-3', CHEK1 (sense) 5'-AGAATAGAGCCAGACATAGG-3' (forwards) 5'-TCTTCAG AAGTTCTGGAGCA-3', 18S F-TCCCAGTAAGTGCGGGT-CA-3' (forwards) 5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3'. Quantitative PCR was performed with a Lightcycler (Roche Applied Science). The cycling protocol consists of pre-incubation at 95°C for 10 min., followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 sec., annealing at 60°C for 20 sec. and extension at 72°C for 25 sec. Fluorescence was measured at the end of each extension phase. Immediately after amplification, melting curve data analysis (for dimer primer detection) was performed by measuring the fluorescent signal during the following cycling profile: 95°C for 0 sec., 65°C for 15 sec., 95°C for 0 sec. and 40°C for 30 sec. For each sample, the average crossing-point value (number of cycles at which each sample reached a threshold fluorescence value) was calculated from triplicate reactions and is indicated as cycle threshold (Ct). Expression of apoptotic genes are calculated relative to 18s mRNA levels by the comparative ΔCt method. Ct value for the apoptotic genes and for 18S was measured. The relative transcript levels were calculated as $x = 2^{-\Delta\text{Ct}}$, in which $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gene}} - \text{Ct}_{18\text{s}}$. Each Ct value was determined from three parallel real-time PCRs.

Immunoblotting

To obtain whole-cell lysates, Laemmli's loading buffer (100 $\mu\text{l}/10^6$ cells) was added to harvested cells and samples were boiled for 5 min. Alternatively, the cytosolic protein fraction was obtained according to procedures previously described [19]. The release of mitochondrial proteins has been tested on cytosolic protein fractions whereas other immunoblotting were performed on whole-cell lysates. For all, 50 μg of protein was loaded onto 12% polyacrylamide gels, electrophoresed, transferred and detected as previously described [19]. Membranes were incubated with one of the following primary antibodies overnight at 4°C : either anti-cytochrome c (1:1000, clone 7H8.2C12, Pharmingen), anti-AIF (1:1000, sc-13116, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-Bcl-X (1:1000, clone L-19, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-Bcl-2 (1:1000, clone 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-FLIP (1:1000, clone H-202, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-Bim (1:1000, clone H-191, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-Bax (1:1000, clone N-20, Santa Cruz Biotechnology Inc.),

Q13

1 anti-Bad (1:1000, clone H-168, Santa Cruz Biotechnology
 2 Inc.), anti-Smac/Diablo (1:500 from Calbiochem (San
 3 Diego, USA)), anti-caspase 3 (1:250 from Cell Signaling
 4 [Saint Quentin en Yvelines, France]), anti-XIAP (1:1000
 5 from Stressgen [Michigan, Germany]), or anti-cytochrome
 6 c oxidase (subunit IV 1:500 from Molecular Probes Inc.).
 7 Membranes were stripped and re-probed with anti-actin or
 8 anti G3PDH antibodies (1:1000 from Sigma) to check for
 9 equal loading.

10 **Statistical analysis**

11 Data were analysed using GraphPad Prism version 3.00
 12 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For compar-
 13 ison of two subgroups of DCs ($\Delta\psi_m$ high DCs *versus*
 14 $\Delta\psi_m$ low DCs), a two-tailed Wilcoxon rank test was
 15 employed. Values of $P < 0.05$ were considered statisti-
 16 cally significant. Kolmogorovi-Smirnov statistical analysis of
 17 flow cytometric data were used according to Expo 32 soft-
 18 ware (Beckman-Coulter).
 19
 20

21 **Results**

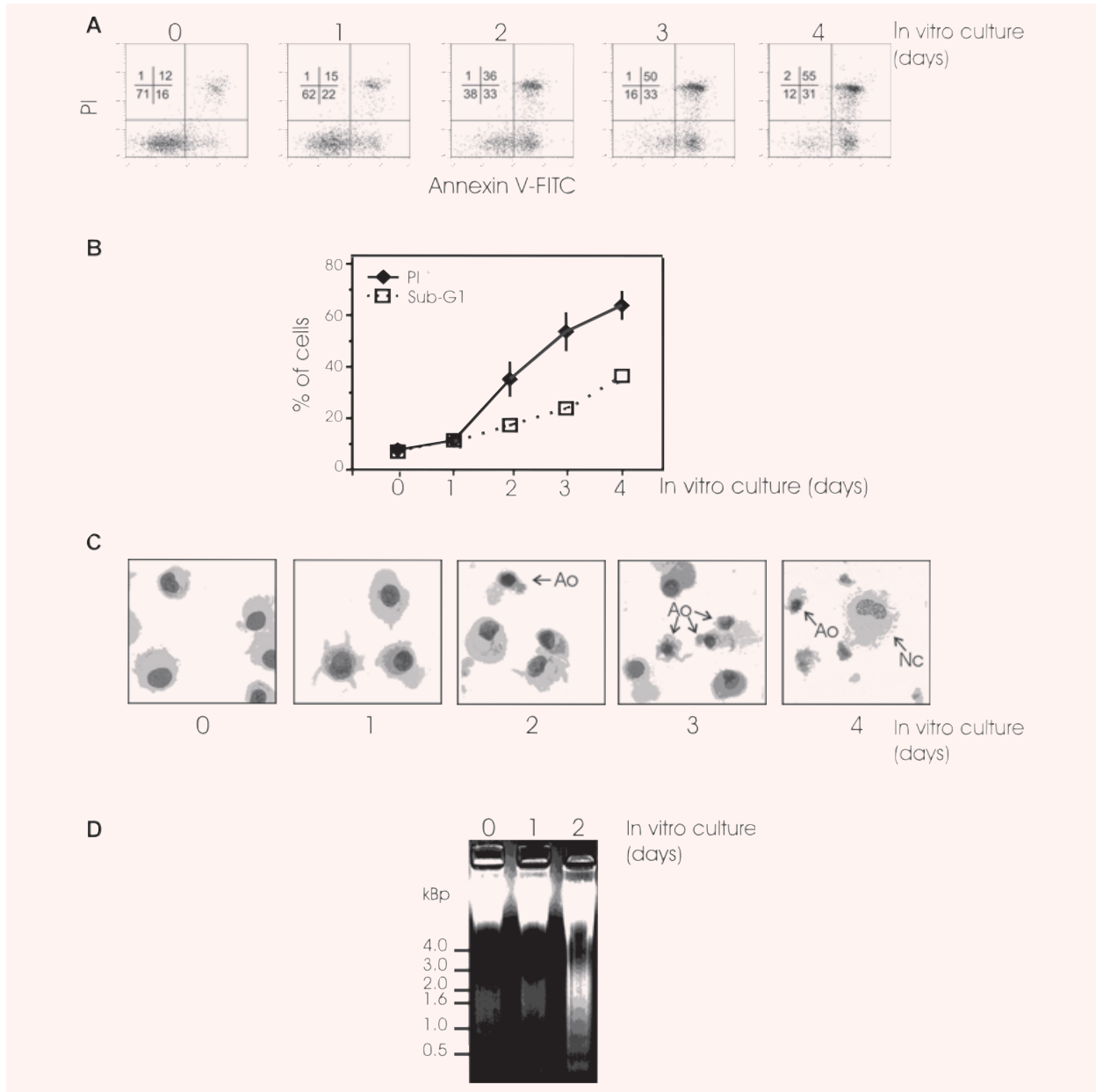
22 **Characteristics of spontaneous DC** 23 **death in culture**

24 The levels of spontaneous cell death in monocyte-
 25 derived DCs were first determined. We cultured
 26 freshly matured human monocyte-derived DCs for up
 27 to 4 days in complete medium (RPMI including 10%
 28 foetal calf serum) and every day an aliquot of cells
 29 was examined by dual staining flow cytometry with
 30 annexin V and the vital dye PI. Annexin V-positive
 31 and PI-negative cells were identified as apoptotic
 32 DCs and cells that were both PI-positive and annex-
 33 in V-positive identified as dead DCs (secondary
 34 necrosis) (Fig. 1A). The number of apoptotic DCs
 35 increased during the first days of culture (up to
 36 2 days). This was followed by a plateau phase,
 37 although the number of dead cells then steadily
 38 increased, and after 4 days of culture approximately
 39 50% of DCs were dead (Fig. 1A). Kinetic studies of
 40 sub-G1 cells and PI uptake, respectively, indicated
 41 that the apoptotic percentage was lower than the
 42 percentage of dead (PI-positive) cells (Fig. 1B), con-
 43 firming the results obtained with annexin V/PI
 44 (Fig. 1A). Additionally, the microscopic images of
 45 cells stained with MGG demonstrated the significant
 46
 47
 48
 49
 50

presence of apoptotic DCs (*i.e.* condensed nuclei and
 shrunken cytoplasm) occurring after 2 days of culture
 (Fig. 1C). This observation of apoptotic cells was con-
 firmed by the presence of the electrophoretic pattern
 of DNA laddering (Fig. 1D). Contrasting with the pres-
 ence of apoptotic features, cellular signs of primary
 necrosis, such as cells with loose nuclei and swollen
 cytoplasm, were found in 10–20% of DCs in associa-
 tion with cell debris later, *i.e.* at day 4 of culture
 (Fig. 1C). Thus, freshly matured monocyte-derived
 DCs underwent constitutive cell death characterized
 by hallmarks of apoptosis, as well as necrosis.

51 **Apoptotic pathways involved in** 52 **spontaneous DC death**

53 To further explore the mechanism of constitutive
 apoptosis in DCs, we sought to investigate the role of
 effector caspases as well as mitochondria, two main
 contributors to classical apoptosis. As previously
 reported [23], we observed significant caspase-3/-7-
 like activity as early as day 0, and which increased
 twofold after 1 day of culture (Fig. 2A, left part) *i.e.*
 before the appearance of nuclear apoptosis (Fig. 1).
 This increase was maintained for up to 4 days of cul-
 ture. This profile was accompanied by enhancement
 of the proteolytic activation of caspase-3 (Fig. 2A,
 right part). The mitochondrion is a key regulator that
 controls cell life and death by releasing several
 death-promoting factors into the cytosol [24]. To
 examine the involvement of mitochondria in DC
 death, cytosolic extracts were prepared at various
 times from DCs in culture and subjected to
 immunoblotting. The immunoblotting results indicat-
 ed that the pro-mitochondrial factors cytochrome c,
 AIF and Smac/Diablo were substantially raised in
 cytosolic fractions at day 1 of culture (Fig. 2B). Sub-
 cellular distribution of cyt c and AIF was also moni-
 tored by immunofluorescence microscopy confirming
 the spontaneous release of proapoptotic proteins
 (Fig. 2B). The cytosolic accumulation of cytochrome
 c and AIF was not abrogated by z-VAD.fmk (Fig. 2B)
 at concentrations that completely block caspase
 activity (Fig. 2A), suggesting that caspases must act
 downstream of the mitochondrial signals. However, it
 is to note that cytosolic accumulation of
 Smac/Diablo was slightly attenuated in z-VAD.fmk
 treated cells, a result previously observed in other
 cell types [25].



41 **Fig. 1** Spontaneous death of freshly matured human monocyte-derived DCs. Immediately after maturation, human
 42 monocyte-derived DCs were cultured under standard conditions for 4 days and an aliquot of cells was collected every
 43 day for cell death determination (0, 1, 2, 3 or 4 days of culture). **(A)** Flow cytometric analysis of Annexin V-FITC bind-
 44 ing and PI staining in cultured DCs at different incubation times (days). The percentage of DCs in each quadrant is
 45 indicated. Similar results were obtained from five separate donors. **(B)** Flow cytometric determination of the percent-
 46 age of sub-G1 cells obtained by cell cycle evaluation and the percentage of PI permeable cells (PI⁺) at different cul-
 47 ture intervals (days) is shown. Mean \pm S.D. from 5 independent experiments are shown. **(C)** When indicated, cyto-
 48 spin preparations of DCs were stained with May-Grundwald-Giemsa to evaluate general DC morphology (Ao: Apoptotic cell;
 49 Nc: Necrotic cell). Micrographs were taken under a transmission electron microscope (original magnification $\times 630$).
 50 Two independent experiments gave similar results. **(D)** Agarose gel electrophoresis of DC DNA before (0) and after
 (1 or 2 days) culture. Two independent experiments gave similar results.

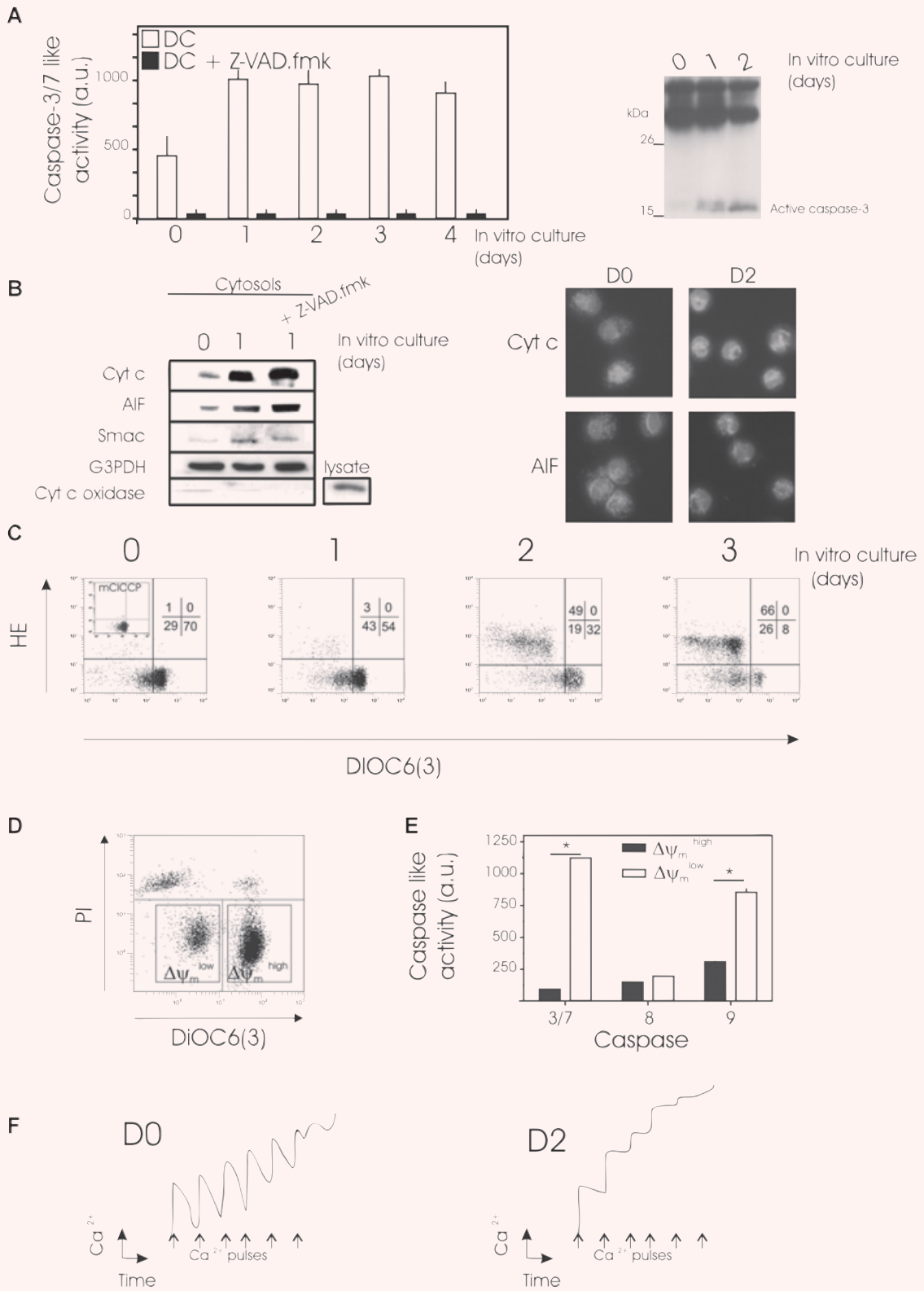




Fig. 2 Spontaneous DC death involves caspase activation and mitochondrial dysfunction. Immediately after maturation, human monocyte-derived DCs were cultured under standard conditions for 4 days and an aliquot of cells was collected every day (0, 1, 2, 3 or 4 days of culture) for determination of caspase activation (**A**) and mitochondrial dysfunction (**B, C, D**). (**A**) Caspases 3/7 activity was measured (left part) as described in Materials and Methods. When indicated, DCs were exposed for 1 hr to z-VAD-fmk (100 μ M) as a positive control for caspase inhibition. Mean \pm S.D. from three independent experiments are shown. Active caspase 3 was identified by Western blotting (right part). Three independent experiments gave similar results. (**B**) Cytosolic protein fractions were obtained and cytochrome C, AIF and Smac(Diablo mitochondrial release in DCs was evaluated by Western blotting. (left part). When indicated, DCs were treated for 24 hrs with z-VAD-fmk (100 μ M). Equal loading was checked by probing with anti-G3PDH antibody. Blots were also probed for cyt c oxidase to exclude mitochondria contamination in the cytosol. As a control for detection of cyt c oxidase, a total lysate was loaded. Fluorescence images (right part) of immunostaining with cytochrome c (green) or AIF (green) and nuclear Hoechst 33342 staining (blue) of DCs at day 0 (D0) or day 1 (D1) of culture. Original magnification \times 630. (**C**) Simultaneous assessment of $\Delta\psi_m$ and ROS production performed with DiOC6(3) and HE. As a control, DCs were incubated with the protonophore mCICCP (100 μ M, 15 min., 37°C) as a negative control for DiOC6(3) staining. One representative experiment of four is shown. (**D** and **E**). Mature DCs were cultured for 36 hrs under standard conditions, and cells then stained with DiOC6(3) and PI before flow cytometric analysis. Same results were obtained with CMX-ROS and YOPRO-1 staining. These flow cytometric parameters were used for sorting (**D**). The left square depicts the viable sorted $\Delta\psi_m$ low subpopulation and the right square represents the $\Delta\psi_m$ high counterparts. (**E**) Determination of caspase activity in $\Delta\psi_m$ -sorted populations as shown in D. Caspases -3/7, -8, and -9 activity was estimated after short-term culture of sorted viable $\Delta\psi_m$ high and low DC subpopulations (**E**). Mean \pm S.D. from three independent experiments are shown. *Statistically significant between purified $\Delta\psi_m$ low and $\Delta\psi_m$ high subpopulations. (**F**) Mitochondrial calcium retention capacity. At day 0 (D0, left panel) or day 2 (D2, right panel) of culture, DCs were permeabilized with digitonin and calcium uptake measured with a calcium-sensitive electrode after the addition of calcium (each 10 μ M CaCl_2 pulse [arrows] was detected as a peak in calcium concentration). Three independent experiments gave similar results.

In many models of apoptosis, the release of mitochondrial pro-apoptotic factors is accompanied by a step-wise dysregulation of mitochondrial functions. This mitochondrial dysfunction is characterized by a loss of $\Delta\psi_m$, followed by the subsequent generation of ROS resulting from uncoupling of the respiratory chain [26]. We performed a kinetic analysis of the appearance of these mitochondrial alterations in cultured DCs (Fig. 2C). At the times indicated, an aliquot of DCs was stained with the potential-sensitive dye DiOC6(3) and with the ROS reactive compound HE (Fig. 2C). As shown in Fig. 2C, disruption of $\Delta\psi_m$ measured by the reduction of DiOC6(3) uptake (increase in the% of DiOC6(3) low cells), occurred in a substantial proportion of DCs after 1 day of culture. This population had the same flow cytometric pattern of DCs treated with the protonophore mCICCP, a substance that abolishes $\Delta\psi_m$ that was used as a positive control (inset in Fig. 2C, left panel). The spontaneous loss of $\Delta\psi_m$ in cultured DCs was followed by enhanced ROS formation (at day 2) detected by the oxidation of HE to the fluorescent product ethidium (HE^+ cells) (Fig. 2C).

Thus, mature DCs first disrupt their $\Delta\psi_m$ and then hyper-produce ROS, the same sequence of events that has previously been observed in a variety of different models of cell death [27].

A double-staining procedure was developed to simultaneously assess DC $\Delta\psi_m$ and cell viability (Fig. 2D) using the combination of DiOC6(3) and PI (Fig. 2D). All non-viable DCs (PI- marked DCs) had low $\Delta\psi_m$ (DiOC6(3) low), whereas viable DCs (PI-negative) contained two distinct subpopulations, one that exhibited a reduction in $\Delta\psi_m$ comparable with non-viable DCs and one that displayed high $\Delta\psi_m$ (Fig. 2D). Alternatively, the potentiometric fluorochrome CMX-ROS and the vital dye YOPRO-1 were used and gave the same result (not shown). These data indicate that the $\Delta\psi_m$ collapse occurs at an early stage of spontaneous DC death, before the loss of viability.

This double-staining procedure allowed us to sort the viable population of DCs in relation to their $\Delta\psi_m$. Thus, to univocally show that $\Delta\psi_m$ low DCs indeed exhibit features of apoptosis, we purified viable (PI-negative) DC populations based on $\Delta\psi_m$ in a fluorescence cell sorter followed by short-term culture.

1 Low caspase-3/-7, -9 and -8 activities were found in
 2 DCs that still had a high $\Delta\psi_m$, whereas DCs that had
 3 lost their $\Delta\psi_m$ showed significantly higher caspase-
 4 3/-7 and caspase-9 activities (Fig. 2E), demonstrat-
 5 ing that apoptosis induction occurs predominantly in
 6 cells with a low $\Delta\psi_m$. As previously reported [23],
 7 caspase-8 activity remained at low levels in both sub-
 8 populations of DCs. Moreover, when $\Delta\psi_m^{\text{high}}$ and
 9 $\Delta\psi_m^{\text{low}}$ fractions were stained with annexin V, we
 10 observed that almost all of the DCs sorted for
 11 $\Delta\psi_m^{\text{high}}$ (>95%) were annexin V negative whereas
 12 many (75 +/- 10%) of the DCs sorted for $\Delta\psi_m^{\text{low}}$
 13 were Annexin V positive. These data, which confirm
 14 previous observations, indicate that $\Delta\psi_m$ low DCs are
 15 primed for spontaneous apoptosis.

16 To test whether mitochondrial dysfunction meas-
 17 ured by $\Delta\psi_m$ reduction was also associated with per-
 18 turbations in mitochondrial calcium homeostasis, we
 19 evaluated the calcium retention capacity of digitonin-
 20 permeabilized DCs with a calcium-sensitive elec-
 21 trode. The accumulation of calcium into mitochondria
 22 was assessed after repeated 10 μM CaCl_2 pulses
 23 until mitochondrial permeability transition (MPT)
 24 occurred and the accumulated calcium was released
 25 (Fig. 2F). After 2 days of culture (in comparison to day
 26 0), DCs showed a markedly reduced mitochondrial
 27 ability to accumulate calcium and a decreased
 28 threshold level of calcium uptake, which is necessary
 29 for MPT to occur. Taken together, these data indicate
 30 that mitochondrial dysregulation appears at an early
 31 stage of constitutive DC apoptosis.

32 Regulation of constitutive DC death

33 To determine whether the caspase family of proteas-
 34 es is necessary for $\Delta\psi_m$ disruption and cell death,
 35 cells were incubated with z-VAD.fmk, a generalized
 36 irreversible caspase inhibitor. The z-VAD.fmk failed to
 37 prevent spontaneous $\Delta\psi_m$ disruption (Fig. 3A, left
 38 panel), confirming that caspases must act down-
 39 stream of the mitochondrion. The z-VAD.fmk, at con-
 40 centrations that completely block caspase activity,
 41 only delayed but did not prevent spontaneous DC
 42 death (Fig. 3A, right panel). We also asked whether
 43 the spontaneous reduction of $\Delta\psi_m$ and nuclear
 44 apoptosis could be reversed if a survival stimulus
 45 was applied (Fig. 3B). Thus, when the level of
 46 cytokines (GM-CSF + IL-4) was maintained in the cul-
 47 ture medium, $\Delta\psi_m$ disruption and DC death were

significantly delayed during the first days of incuba-
 tion, confirming the close association between the
 onset of death and mitochondrial dysfunction in DCs.
 However, this protective effect disappeared after
 4 days of culture, even when cytokines were used at
 higher concentrations (data not shown).

To test the influence of maturation on sponta-
 neous DC death, it was important to document the
 rate of death for different maturation agents stimulat-
 ing DCs. Figure 3C illustrates that both $\Delta\psi_m$ disrup-
 tion and death occurred in Poly I:C-stimulated DCs to
 an extent very similar to LPS-matured DCs. Con-
 versely, maturation with agonistic antibodies to
 CD40 significantly reduced the occurrence of DC
 death after 3 days of culture, but was unable to pre-
 vent spontaneous mitochondrial dysfunction
 (Fig. 3C). As a consequence, it appears plausible
 that DCs characterized by a low $\Delta\psi_m$ are irreversibly
 programmed to die.

Changes in apoptotic gene expression profile during constitutive DC death

To gain new insights into the molecular processes
 that regulate mature DC apoptosis, we screened
 96 apoptotic genes for changes in their expression
 profile. Using the apoptosis macroarray, we were
 able to identify 9 genes that were differentially
 expressed (1.5-fold difference) after 1 day in cul-
 ture (Fig. 4A and B). Expression of genes encoding
 eight molecules diminished over 24 hrs in culture
 (Fig. 4), whereas we found that expression of the
 pro-apoptotic gene BIM was significantly increased
 (Fig. 4A and B). QPCR supported the macroarray
 results for c-FLIP, Mcl-1, Bcl-X, Bim, Rip-2, Fas,
 Gadd45 and TRAIL, with minor differences only in
 scale of the down-regulation and up-regulation lev-
 els observed (Fig. 4B). On the basis of these
 results, the levels (relative to β -actin) of some
 important apoptosis-related proteins were assayed
 by Western blot analysis. The anti-apoptotic proteins
 c-FLIP and XIAP were down-regulated in DCs at
 day 1 of culture compared with day 0 (Fig. 4C). It
 is known that the susceptibility of DCs to apoptotic sig-
 nals is regulated, in part, by the relative levels and
 competing dimerizations between Bcl-2 family mem-
 bers [28]. After 1 day of DC culture, the pro-apoptot-
 ic protein, Bim, was also markedly increased, corre-
 lating with the mRNA profile; however, no change in

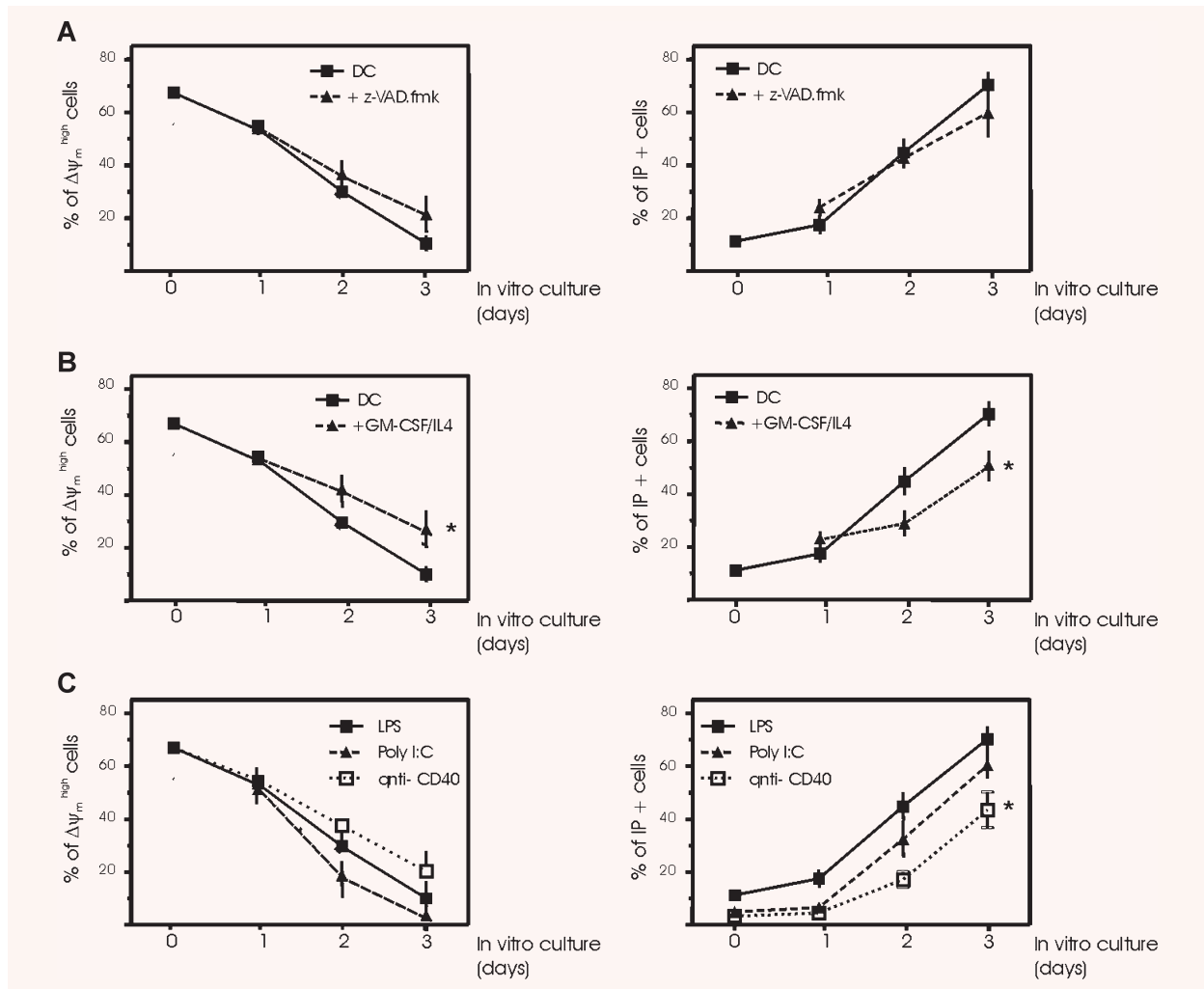


Fig. 3 Regulation of spontaneous DC death. Immediately after maturation, human monocyte-derived DCs were cultured for 4 days in the presence or absence of 100 μM z-VAD.fmk added every day (A) or culture medium supplemented every 2 days with 800 U/ml GM-CSF and 100 U/ml IL-4 (B). Aliquots of cells were collected every day (0, 1, 2, 3 or 4 days of culture) for determination of $\Delta\Psi_m$ (DiOC6(3) staining) and cell death (PI uptake). Mean \pm S.D. from 5 independent experiments are shown. (C) Effects of maturation factors on spontaneous DC death. DCs were induced to mature by the addition of 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 18 hrs or 10 $\mu\text{g/ml}$ poly I:C or 5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD40 mAb and then mature DCs cultured for 4 days, with an aliquot of cells collected every day (0, 1, 2, 3 or 4 days of culture) for determination of $\Delta\Psi_m$ (DiOC6(3) staining) and cell death (PI uptake). Mean \pm S.D. from five independent experiments are shown.

other Bcl-2 family protein concentrations was evident (Fig. 4C). These data correlate well with the apoptotic phenotype determined in the previous experiments (Figs 1–3). These results indicate spontaneous modulations in the expression of apoptosis-related genes in DCs likely accounts for facilitating spontaneous mitochondrial dysfunction and cell death to occur.

Correlation between $\Delta\Psi_m$ reduction and DC phenotypes and immuno-stimulatory functions

In a further series of experiments we attempted to correlate mitochondrial perturbations, as assessed by CMX-ROS staining, with the phenotype of mature

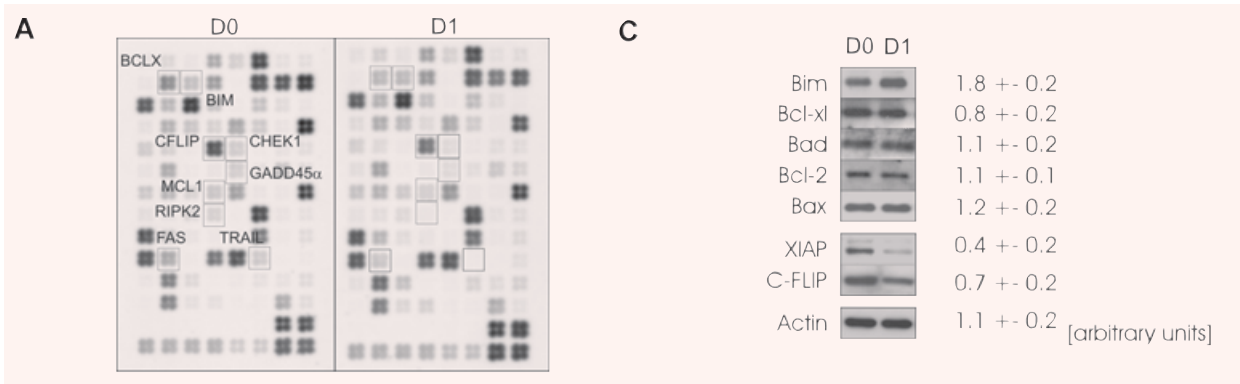


Fig. 4 Analysis of apoptosis-related gene expression during constitutive DC death. Apoptosis-related gene expression was analysed either immediately after maturation of human monocyte-derived DCs (day 0, D0) or at day 1 (D1) of standard culture (A). Gene expression changes were assessed by comparative filter cDNA macroarray measurements using a representative apoptosis array of mature DCs at day 0 and day 1 of culture as the example. One representative image of three independent experiments with separate donors is shown. (B) Expression changes of one up-regulated and seven down-regulated genes in DCs cultured for 24 hrs (D1) compared to DCs harvested immediately after

maturation (D0). Similar changes were seen when DCs were compared *via* cDNA macroarray (black bars, $n = 3$) and Q-PCR (white bars, $n = 6$) (see Materials and Methods for details). (C) Analysis of DC apoptosis protein expression by Western blotting immediately after maturation (D0) or at day 1 (D1) of standard culture. The expression of several Bcl-2 members (Bim, Bcl-xl, Bad, Bcl-2, Bax) and the inhibitors of apoptosis, XIAP and c-FLIP, was analysed. Actin was used as a standard for equal loading of protein. One of four independent experiments with separate donors is represented. Four independent immunoblottings were scanned on a densitometer and the relative expression of proteins was determined. The intensity of the values obtained (mean \pm S.E.M.) were expressed in arbitrary units.

DCs. Viable DCs were gated according to their forward/side scatter (FS/SS) properties. The combined assessment of antigenic phenotype and $\Delta\psi_m$ revealed that expression of the co-stimulatory molecules, *i.e.* HLA-DR, CD86 and CD80, was significantly different between high and low $\Delta\psi_m$ subpopulations of DCs (Fig. 5A and B). Although the $\Delta\psi_m$ low subpopulation did not display morphological signs of late apoptosis (*e.g.* cytoplasmic shrinkage), their expression of HLADR, CD80, and CD886 was significantly lower than that observed for $\Delta\psi_m$ high subpopulations of DCs (Fig. 5A and B). Conversely, both subpopulations of cells expressed similar levels of CD1a, CD11c and CD83, DC-specific markers, irrespective of their $\Delta\psi_m$ (Fig. 5A and B).

A more sophisticated approach was then used to corroborate these findings. Using the double-stain-

ing procedure described above, viable DCs were separated by cell sorting at day 2 of culture into two subpopulations, consisting of cells possessing either low or high $\Delta\psi_m$. Each DC subpopulation purified with different $\Delta\psi_m$ values was then tested for their immuno-stimulatory functions (Fig. 5C and D). We first assessed the impact of $\Delta\psi_m$ on the capacity of mature monocyte-derived DCs to induce the proliferation of T cells in a mixed allogeneic leucocyte reaction (Fig. 5C). Therefore, $\Delta\psi_m$ high DCs or $\Delta\psi_m$ low DCs were co-cultured with allogeneic naive CD4⁺ T cells for 5 days and the percentage of CFSE low T cells then estimated by flow cytometry. The $\Delta\psi_m$ low DCs were far less potent in inducing T-cell proliferation than $\Delta\psi_m$ high DCs (Fig. 5C). We next evaluated the capacity of both low and high $\Delta\psi_m$ DC subpopulations to induce

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

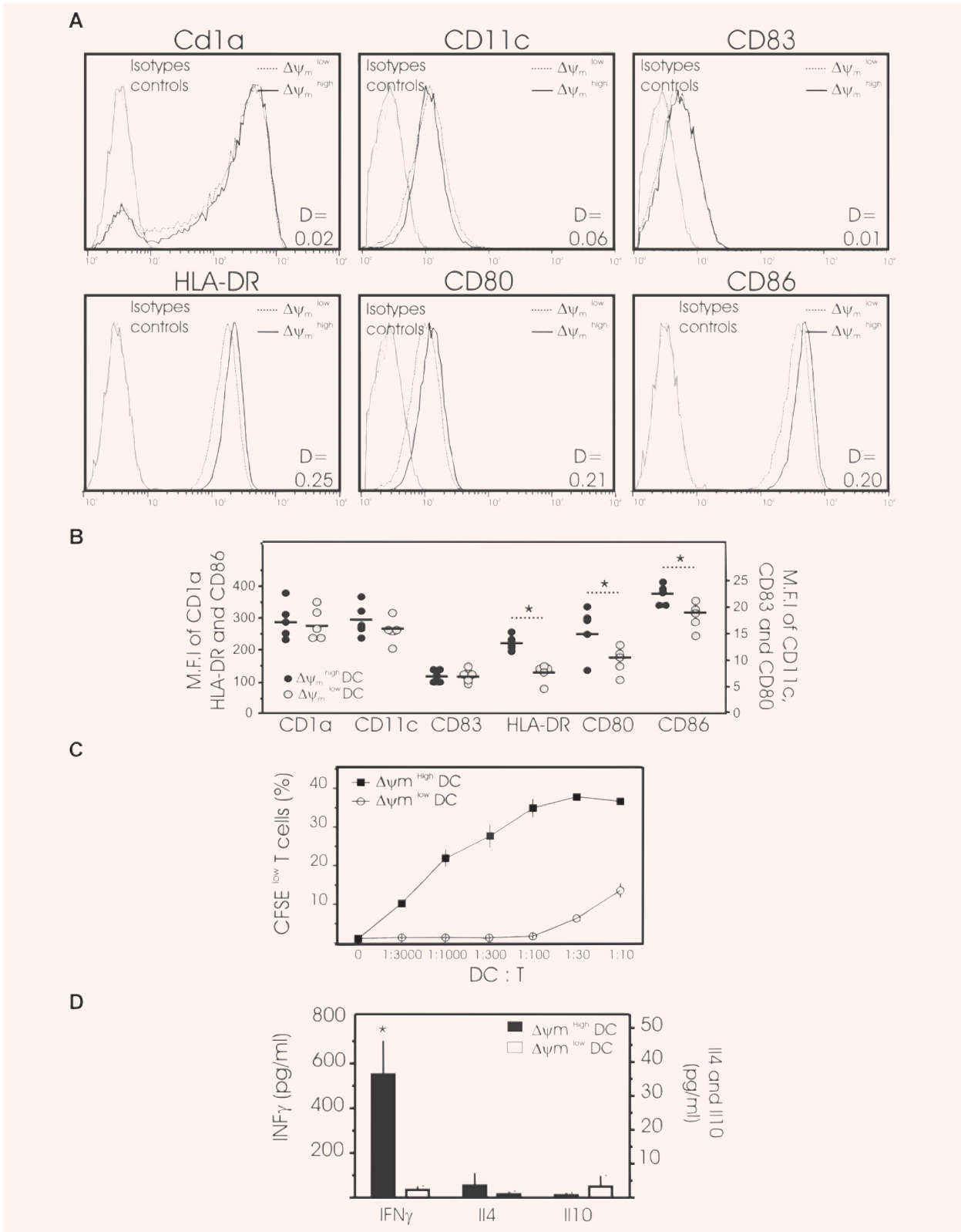




Fig. 5 Phenotypic and functional properties of DCs as a function of their $\Delta\psi_m$. **(A)** Representative histograms showing the surface expression of CD1a, CD11c, CD83, HLA-DR, CD80 and CD86 on two subpopulations of mature DCs obtained from one donor: DCs with high $\Delta\psi_m$ (black line) and DCs with low $\Delta\psi_m$ (dotted line) (isotype controls = grey lines). Mature DCs were cultured for 48 hrs then harvested for the simultaneous determination of surface markers and $\Delta\psi_m$ using the potentiometric dye CMX-ROS. Dead cells and debris were gated out according to their forward-angle and right-angle light scattering properties. One of 4 independent experiments is presented. D values by Kolmogorov–Smirnov analysis between $\Delta\psi_m$ high and low subpopulations of DCs are shown. **(B)** Pooled data depicting the expression (MFI) of CD1a, CD11c, CD83, HLA-DR, CD80 and CD86 by $\Delta\psi_m$ high and low subpopulations of DCs as in **(A)** (Data are from five separate donors, circles represent single individuals and horizontal bars represent group mean values. $*P < 0.05$ between the two groups). **(C, D)** Allo-stimulatory capacity of mature $\Delta\psi_m$ high and $\Delta\psi_m$ low DCs in activating allo-reactive T cells in an MLR assay. After 48 hrs of culture, mature DCs were stained with CMX-ROS and YOPRO and subpopulations of viable DCs with high $\Delta\psi_m$ and low $\Delta\psi_m$ sorted flow cytometrically. Then a graded number of $\Delta\psi_m$ high or $\Delta\psi_m$ low DCs were co-cultured with allogeneic, naïve CD4⁺ T cells stained with CFSE. **(C)** After 5 days of co-culture, T-cell proliferation was determined by the percentage of CFSE low cells. The typical representation of proliferation curves determined at a different stimulator:responder ratio ranging from 1:3000 to 1:10 (DC:T) is shown. Three independent experiments gave similar results. **(D)** The secretion of IFN γ , IL4 and IL10 was measured by ELISA in the supernatants of T cells cultured for 5 days with viable $\Delta\psi_m$ high DCs (solid bar) or viable $\Delta\psi_m$ low DCs (open bar) sorted flow cytometrically (ratio 1 DC:10 T). Mean \pm S.D. of three independent experiments with separate donors is shown. ($*P < 0.05$ between the two subpopulations).

T-cell cytokine production in a mixed allogeneic leucocyte reaction. $\Delta\psi_m$ low or $\Delta\psi_m$ high DC subpopulations were seeded with purified naïve CD4⁺ CD45RA⁺ T cells for 5 days, and the resultant culture supernatants analysed for production of IL-4, IL-10 and IFN- γ . Consistent with their inability to promote T-cell proliferation (Fig. 5C), the $\Delta\psi_m$ low DC subpopulation was unable to induce T-cell cytokine production (Fig. 5D). In contrast, the $\Delta\psi_m$ high DC subpopulation significantly induced secretion of the Th1 cytokine, IFN- γ . Secretion of the Th2 cytokines IL-4 and IL-10 was not detected (Fig. 5D). As a consequence, the correlation between mitochondrial parameters and the activation of T cells appears to be coherent. Stimulated by these observations, we tested whether perturbations of mitochondrial function caused by rotenone, a specific inhibitor of mitochondrial respiratory chain complex I, might impair DC phenotype and immuno-stimulatory functions (Fig. 6). Incubation of DCs with rotenone for 4 hrs greatly reduced $\Delta\psi_m$ (Fig. 6A), decreased HLA-DR, CD80, and CD86 expression (Fig. 6B), and significantly reduced T-cell proliferation and IFN γ secretion (Fig. 6C). Overall, these results suggest that mitochondrial integrity is required for DC immune functions.

Discussion

Apoptosis represents the natural fate of end-stage differentiated cells including, presumably, monocyte-derived DCs. Apoptosis of DCs is probably a down-regulatory mechanism to halt excessive activation of the immune system. In this sense, splenic mouse DC trigger apoptosis soon after interaction with Ag-specific T cells [29]. The state of DC differentiation is a determining factor of their susceptibility to apoptosis induced by diverse stimuli [7]. Pathogen- and T-cell-derived maturation confers resistance to environmental (e.g. treatment with glucocorticoids or UVB [12, 30]) and intrinsic death signals in DCs (such as Fas, TNFR1, and TRAIL [31]) by up-regulating anti-apoptotic factors [15, 32, 33]. Accordingly, we and others [10] found that spontaneous DC death, as measured by PI staining, was not important until after 3 days of culture. However, we observed the spontaneous appearance of closely associated changes including mitochondrial dysfunction, at early time points of incubation, when nuclear apoptosis was not yet evident. Thus, these mitochondrial changes appear to precede cell shrinkage, loss of plasma membrane viability and nuclear apoptosis, confirming previous similar findings for thymocytes and lymphocytes [34].

1 Bcl-2 family members regulate the lifespan of DCs
2 [15]. We observed up-regulation of the pro-apoptotic
3 BH3 protein of the Bcl-2 family, namely Bim, after 24
4 hrs of culture and no changes in the protein levels of
5 any other Bcl-2 family members tested. Stimulation
6 with LPS induced significant up-regulation of Bim,
7 which is a crucial factor for spontaneous apoptosis in
8 mice DCs [1]. Bim induces $\Delta\Psi_m$ loss and
9 cytochrome c release in isolated mitochondria [35].
10 Thus, high correlations between Bim and death-
11 inhibitory members of the Bcl-2 family may reflect an
12 indication of commitment to death. Concomitantly,
13 natural inhibitors of caspases, the proteins XIAP and
14 c-FLIP, were down-regulated, suggesting that cas-
15 pase activation requires the release of several phys-
16 iological 'brakes' in DC apoptosis control. We
17 observed a decrease in XIAP protein content in DCs
18 without a significant change in XIAP mRNA levels,
19 suggesting that XIAP degradation occurs in sponta-
20 neous DC death. The observed XIAP protein degra-
21 dation is presumably dependent on the release of
22 Smac/Diablo from mitochondria. This observation
23 underlines the major role of mitochondria (and the
24 mitochondrial Bcl-2 family of proteins) as the
25 upstream regulator of spontaneous DC death.
26 Interestingly, it has been demonstrated that, upon
27 TLR engagement, an autocrine loop of IL-10 limited
28 the longevity of DCs through the dynamic modula-
29 tion of Bcl-2 protein expression, thus providing a
30 rational explanation of mitochondrial involvement in
31 DC death [36]. Environmental changes may also
32 influence spontaneous DC death. Deprivation of
33 growth factors causes mouse DCs to undergo apop-
34 totic cell death within 48 hrs [33]. With monocyte-
35 derived DCs from the same donor, the kinetics of
36 apoptosis was delayed more than 24 hrs according
37 to the batch of serum used for culture (not shown).
38 Similar findings have been previously described with
39 different batches of serum-free medium [37].
40 Nevertheless, in all cases, we observed exactly the
41 same sequence of events, beginning with mitochon-
42 drial membrane changes.

43 With these facts in mind, we postulated that mitochon-
44 drial dysfunction represents a hitherto
45 unrecognized mechanism for premature impairment
46 of DC immune functions. We demonstrated an
47 important correlation between mitochondrial dys-
48 function and the ability of DCs to activate naïve T
49 cells. Although the exact causal relationship
50 remains elusive, specific reduced expression of

HLA and the co-stimulatory molecules CD80 and
CD86 on $\Delta\Psi_m$ low DCs appears involved. It is note-
worthy that when mature Langerhans cells sponta-
neously undergo apoptosis in culture, this process
is also accompanied by reduced expression of var-
ious surface molecules, including CD86 [38].
Interestingly, it has been demonstrated that mito-
chondrial ROS are involved in the up-regulation of
CD80 and CD86 in monocyte-derived DCs [39].
Balancing the mitochondrial membrane potential is
important for ATP synthesis. Depolarization of mito-
chondrial transmembrane potential leads to disrup-
tion of respiratory chain function and ATP synthesis.
It is generally assumed that cell proliferation and its
associated metabolism are energy demanding
processes, in contrast to the relatively low metabo-
lic rate of quiescent cells, such as T lymphocytes,
and probably also mature DCs. Nevertheless, the
requirement of mitochondrial bioenergetics for DC
differentiation, maturation and function warrant fur-
ther investigation. Irrespective of these unknowns,
the present results place a new emphasis on the
putative role of mitochondria in the control of DC
immune functions.

These results may also be of potential clinical rel-
evance. Spontaneous apoptosis of DCs occurs *in vivo*
and a higher percentage of apoptotic blood
DCs is observed in patients with breast cancer
compared to healthy volunteers [40]. In a unique
experimental system employed to follow the migra-
tion and fate of DCs, DCs migrated into draining
lymph nodes then disappeared rapidly (by 48 hrs)
from the lymph nodes, probably by apoptosis [41].
The lifespan of antigen-bearing DCs has been esti-
mated to be as short as 3 days [29, 42]. Thus, it is
tempting to speculate that mitochondrial dysfunc-
tion in early DC apoptosis could be a plausible
immune escape mechanism responsible for the fail-
ure of DC-based immunotherapy for cancer.
Consequently, the assessment of mitochondrial
membrane potential may allow for a direct estima-
tion of pre-apoptotic DCs available for use and,
thus, may provide a useful tool for the *in vitro/ex vivo*
evaluation of DC-based vaccines before injec-
tion. The estimation of this mitochondrial parameter
exposes a potentially significant subpopulation of
pre-apoptotic DCs with impaired immuno-stimula-
tory capacities at a moment at which conventional
tests addressing their viability fail to yield function-
ally positive results.

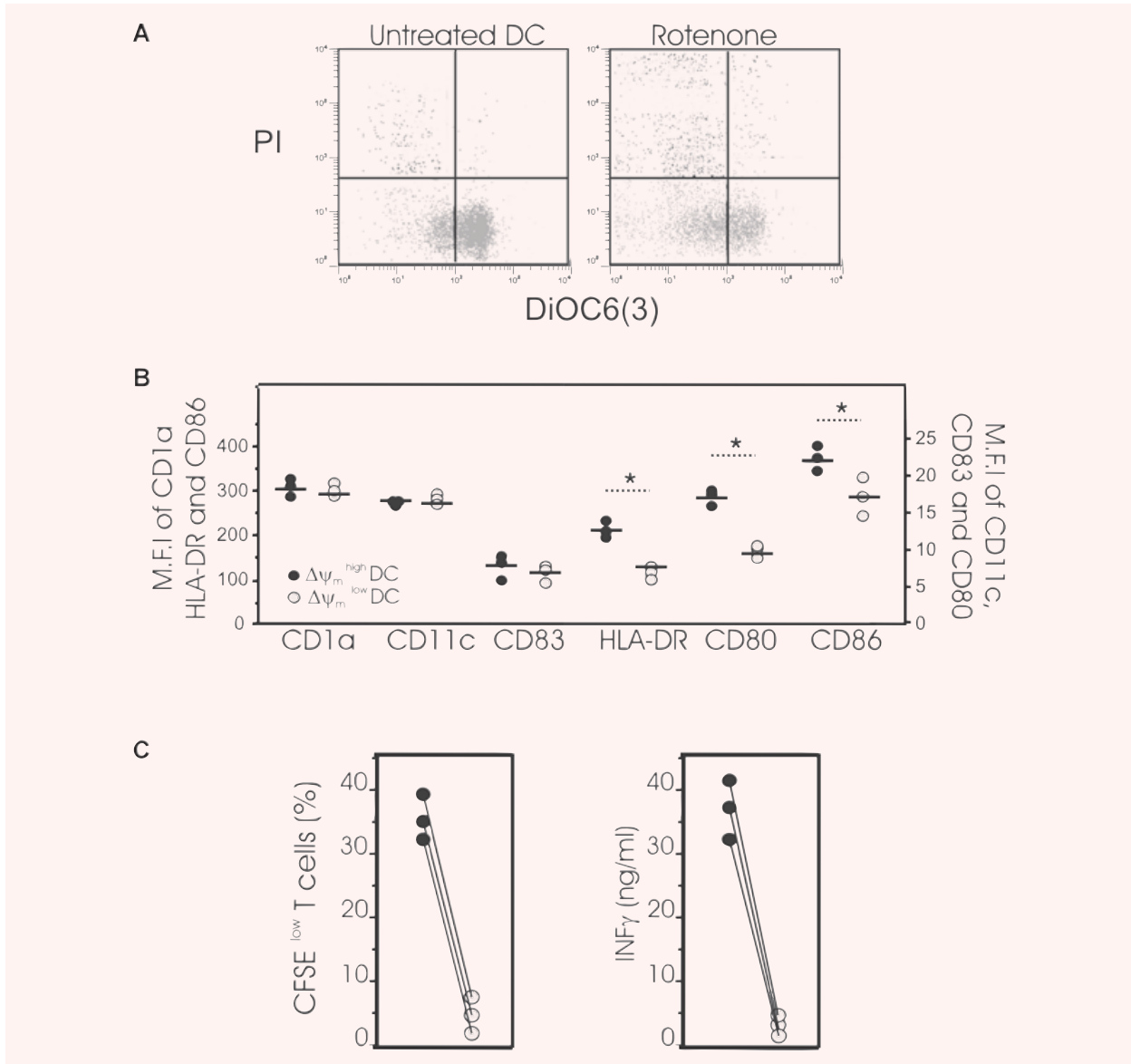


Fig. 6 Effects of rotenone on phenotypic and functional properties of DCs. **(A)** Mature DCs were incubated in the presence of 50 μM rotenone for 4 hrs or left untreated and then stained with DiOC6(3) and PI for simultaneous assessment of $\Delta\psi_m$ and viability. **(B)** Mature DCs incubated in the presence of 50 μM rotenone for 4 hrs were harvested for the simultaneous determination of surface markers (CD1a, CD11c, CD83, HLA-DR, CD80 or CD86) and $\Delta\psi_m$ using the potentiometric dye CMX-ROS. Dead cells and debris were gated out according to their forward-angle and right-angle scattering properties. Data are from three separate donors, circles represent single individuals and horizontal bars represent group mean values, * $P < 0.05$ between the two groups. **(C, left panel)** Mature DCs were exposed to 50 μM rotenone for 4 hrs or left untreated then washed twice. Untreated DCs (●) or DCs exposed to rotenone (○) were co-cultured with allogeneic naïve CD4+ T cells stained with CFSE. After 5 days of co-culture with DCs at a ratio 1:10 (DC:T), T-cell proliferation was determined by the percentage of CFSE low T cells present. The left panel represents data from three independent experiments. **(C, right panel)** The secretion of IFN- γ was measured by ELISA in the supernatant of T cells cultured for 5 days with DCs exposed to rotenone (●) or untreated DCs (○). Data represent three independent experiments.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (Comité du Nord) (to PM), the Société Française de Dermatologie (to P.M.) and the Cancéropole Nord Ouest. A.S.H.-C. and L.C. received fellowships from the Cancéropole Nord Ouest and the Fondation de la Recherche Médicale, respectively.

Q17

References

1. **Chen M, Huang L, Wang J.** Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to over-activation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood*. 2007; 109: 4360–7.
2. **Josien R, Li HL, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y.** TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells *in vivo*. *J Exp Med*. 2000; 191: 495–502.
3. **Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ.** Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*. 1999; 98: 47–58.
4. **Chen M, Wang YH, Wang Y, Huang L, Sandoval H, Liu YJ, Wang J.** Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science*. 2006; 311: 1160–4.
5. **Willems F, Amraoui Z, Vanderheyde N, Verhasselt V, Aksoy E, Scaffidi C, Peter ME, Krammer PH, Goldman M.** Expression of c-FLIP(L) and resistance to CD95-mediated apoptosis of monocyte-derived dendritic cells: inhibition by bisindolylmaleimide. *Blood*. 2000; 95: 3478–82.
6. **Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeflner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G.** Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*. 1996; 184: 1155–60.
7. **McLellan AD, Terbeck G, Mengling T, Starling GC, Kiener PA, Gold R, Brouckeban EB, Leverkus M, Kampgen E.** Differential susceptibility to CD95 (Apo-1/Fas) and MHC class II-induced apoptosis during murine dendritic cell development. *Cell Death Differ*. 2000; 7: 933–8.
8. **Jin H, Xiao C, Zhao G, Du X, Yu Y, Kang Y, Wang B.** Induction of immature dendritic cell apoptosis by foot and mouth disease virus is an integrin receptor mediated event before viral infection. *J Cell Biochem*. 2007; 102: 980–91.
9. **Nencioni A, Garuti A, Schwarzenberg K, Cirmena G, Dal Bello G, Rocco I, Barbieri E, Brossart P, Patrone F, Ballestrero A.** Proteasome inhibitor-induced apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2006; 36: 681–9.
10. **Vassiliou E, Sharma V, Jing H, Sheibanie F, Ganea D.** Prostaglandin E2 promotes the survival of bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2004; 173: 6955–64.
11. **Sanchez-Sanchez N, Riou-Blanco L, de la Rosa G, Puig-Kroger A, Garcia-Bordas J, Martin D, Longo N, Cuadrado A, Cabanas C, Corbi AL, Sanchez-Mateos P, Rodriguez-Fernandez JL.** Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood*. 2004; 104: 619–25.
12. **Nicolo C, Tomassini B, Rippo MR, Testi R.** UVB-induced apoptosis of human dendritic cells: contribution by caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Blood*. 2001; 97: 1803–8.
13. **Leverkus M, McLellan AD, Heldmann M, Eggert AO, Brouckeban EB, Koch N, Kampgen E.** MHC class II-mediated apoptosis in dendritic cells: a role for membrane-associated and mitochondrial signaling pathways. *Int Immunol*. 2003; 15: 993–1006.
14. **Kriehuber E, Bauer W, Charbonnier AS, Winter D, Amatschek S, Tamandl D, Schweifer N, Stingl G, Maurer D.** Balance between NF- κ B and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. *Blood*. 2005; 106: 175–83.
15. **Hou WS, Van Parijs L.** A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol*. 2004; 5: 583–9.
16. **Kim TW, Lee JH, He L, Boyd DA, Hardwick JM, Hung CF, Wu TC.** Modification of professional antigen-presenting cells with small interfering RNA *in vivo* to enhance cancer vaccine potency. *Cancer Res*. 2005; 65: 309–16.
17. **Peng S, Kim TW, Lee JH, Yang M, He L, Hung CF, Wu TC.** Vaccination with dendritic cells transfected with BAK and BAX siRNA enhances antigen-specific immune responses by prolonging dendritic cell life. *Hum Gene Ther*. 2005; 16: 584–93.
18. **Hatzfeld-Charbonnier AS, Lasek A, Castera L, Gosset P, Velu T, Formstecher P, Mortier L, Marchetti P.** Influence of heat stress on human monocyte-derived dendritic cell functions with immunotherapeutic potential for antitumor vaccines. *J Leukoc Biol*. 2007; 81: 1179–87.
19. **Gallego MA, Joseph B, Hemstrom TH, Tamiji S, Mortier L, Kroemer G, Formstecher P, Zhivotovsky B, Marchetti P.** Apoptosis-inducing factor determines the chemoresistance of non-small-cell lung carcinomas. *Oncogene*. 2004; 23: 6282–91.

- 1 20. **Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, Castedo M, Decaudin D, Susin SA, Masse B, Kroemer G.** Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J Immunol.* 1996; 157: 4830–6.
- 2 21. **Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P.** The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril.* 2006; 86:1526–30.
- 3 22. **Schmidt-Mende J, Gogvadze V, Hellstrom-Lindberg E, Zhivotovsky B.** Early mitochondrial alterations in ATRA-induced cell death. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 119–28.
- 4 23. **Franchi L, Condo I, Tomassini B, Nicolo C, Testi R.** A caspase-like activity is triggered by LPS and is required for survival of human dendritic cells. *Blood.* 2003; 102: 2910–5.
- 5 24. **van Gurp M, Festjens N, Van Loo G, Saelens X, Vandenamee P.** Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 304: 487–97.
- 6 25. **Adrain C, Creagh EM, Martin SJ.** Apoptosis-associated release of Smac(DIABLO) from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J.* 2001; 20: 6627–36.
- 7 26. **Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G.** Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med.* 1995; 182: 367–77.
- 8 27. **Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Marchetti P, Zamzami N, Kroemer G.** Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Biol Toxicol.* 1998; 14: 141–45.
- 9 28. **Pirtskhalaishvili G, Shurin GV, Gambotto A, Esche C, Wahl M, Yurkovetsky ZR, Robbins PD, Shurin MR.** Transduction of dendritic cells with Bcl-xL increases their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in mice. *J Immunol.* 2000; 165: 1956–64.
- 10 29. **Matsue H, Edelbaum D, Hartmann AC, Morita A, Bergstresser PR, Yagita H, Okumura K, Takashima A.** Dendritic cells undergo rapid apoptosis *in vitro* during antigen-specific interaction with CD4+ T cells. *J Immunol.* 1999; 162: 5287–98.
- 11 30. **Vizzardelli C, Pavelka N, Luchini A, Zanoni I, Bendickson L, Pelizzola M, Beretta O, Foti M, Granucci F, Nilsen-Hamilton M, Ricciardi-Castagnoli P.** Effects of dexamethazone on LPS-induced activation and migration of mouse dendritic cells revealed by a genome-wide transcriptional analysis. *Eur J Immunol.* 2006; 36: 1504–15.
- 12 31. **Leverkus M, Walczak H, McLellan A, Fries HW, Terbeck G, Brocker EB, Kampgen E.** Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood.* 2000; 96: 2628–31.
- 13 32. **Miga AJ, Masters SR, Durell BG, Gonzalez M, Jenkins MK, Maliszewski C, Kikutani H, Wade WF, Noelle RJ.** Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions. *Eur J Immunol.* 2001; 31: 959–65.
- 14 33. **Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P.** Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med.* 1998; 188: 2175–80.
- 15 34. **Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G.** Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol.* 1996; 157: 512–21.
- 16 35. **Sugiyama T, Shimizu S, Matsuoka Y, Yoneda Y, Tsujimoto Y.** Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by a pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene.* 2002; 21: 4944–56.
- 17 36. **Chang WLW, Baumgarth N, Eberhardt MK, Lee CYD, Baron CA, Gregg JP, Barry PA.** Exposure of myeloid dendritic cells to exogenous or endogenous IL-10 during maturation determines their longevity. *J Immunol.* 2007; 178: 7794–804.
- 18 37. **Royer PJ, Tanguy-Royer S, Ebstein F, Sapede C, Simon T, Barbieux I, Oger R, Gregoire M.** Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells. *Scand J Immunol.* 2006; 63: 401–9.
- 19 38. **Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroccek RA, Pauli G.** Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol.* 1995; 25: 1943–50.
- 20 39. **Yamada H, Arai T, Endo N, Yamashita K, Fukuda K, Sasada M, Uchiyama T.** LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Life Sci.* 2006; 78: 926–33.
- 21 40. **Pinzon-Charry A, Maxwell T, McGuckin MA, Schmidt C, Furnival C, Lopez JA.** Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005; 8: R5. Q18
- 22 41. **Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK.** *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4+ T cells. *J Exp Med.* 1997; 185: 2133–41.
- 23 42. **Hermans IF, Ritchie DS, Yang J, Roberts JM, Ronchese F.** CD8+ T cell-dependent elimination of dendritic cells *in vivo* limits the induction of antitumor immunity. *J Immunol.* 2000; 164: 3095–101.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NOVEL OXOPHENYLARCYRIAFLAVINS AS POTENTIAL ANTICANCER AGENTS.

Bourderieux A, Bénéteau V, Mérour JY, Baldeyrou B, Ballot C, Lansiaux A, Bailly C, Le Guével R, Guillouzo C, Routier S.

Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, CNRS UMR 6005, Rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans cedex 2, France.

Org Biomol Chem, 2008 Jun 21;6(12) :2108-17.

Ce papier renseigne de la synthèse et de l'évaluation biologique de nouvelles oxophenylarcyriaflavines conçues comme de potentiels agents anticancéreux. Une synthèse efficace impliquant des réactions de Suzuki et Stille catalysées par le palladium est réalisée, en l'absence de groupement indole protecteur. La fermeture du cycle central du squelette carboné s'effectue *via* une réaction électrophile sur la position C-2 du noyau indole. L'usage de l'indole et du 5-benzyloxyindole avec des cycles phenyl substitués, génère trois squelettes carbonés différents, lesquels ont été exploités pour moduler la structure. La cytotoxicité de ces composés nouvellement conçus sur quatre lignées de cellules cancéreuses et leurs activités envers les kinases CDK1, CDK5 et GSK3 ont été évaluées. Plusieurs composés présentent une cytotoxicité marquée avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre du sub-micromolaire et induisent d'importantes perturbations du cycle cellulaire avec un arrêt en phase G2/M. Certains composés disposent de propriétés de liaison à l'ADN et inhibent la relaxation de l'ADN super enroulé par la topoisomérase. Toutefois, ces propriétés ne sont pas impliquées dans l'action cytotoxique. Un nouveau composé chef de fil a été identifié et nécessite de plus amples investigations.

Synthesis and biological evaluation of novel oxophenylarcyriaflavins as potential anticancer agents†

Auréli Bourderioux,^a Valérie Bénéteau,^a Jean-Yves Mérour,^a Brigitte Baldeyrou,^b Caroline Ballot,^b Amélie Lansiaux,^b Christian Bailly,^{‡b} Rémy Le Guével,^c Christiane Guillouzo^c and Sylvain Routier^{*a}

Received 21st January 2008, Accepted 3rd March 2008

First published as an Advance Article on the web 15th April 2008

DOI: 10.1039/b801121d

We report the synthesis and biological evaluation of new oxophenylarcyriaflavins designed as potential anticancer agents. An efficient synthesis involving palladium-catalyzed Suzuki and Stille reactions is presented, without any indolic protective group. The central ring closure of the scaffold was performed through an electrophilic reaction on the position C-2 of the indole ring. The use of indole and 5-benzyloxyindole, along with substituted phenyl rings, generated three different scaffolds, which were successively exploited to modulate the structure. The cytotoxicity of the newly designed compounds on four cancer cell lines and activities against three kinases (CDK1, CDK5 and GSK3) were evaluated. Several compounds showed a marked cytotoxicity with IC₅₀ values in the sub-micromolar range, and induced important cell cycle perturbations, with a G2/M arrest. Some compounds revealed DNA binding properties and were found to inhibit topoisomerase-mediated DNA relaxation of supercoiled DNA, but these properties are not mandatory for a cytotoxic action. A novel lead compound (**32**) has been identified and warrants further investigations.

Introduction

Indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole alkaloids form a class of compounds endowed with potent antitumor, antiviral and/or antimicrobial activities.¹ This family has raised considerable attention because of the central role of these molecules in the regulation of cell cycle progression and specific enzyme inhibition.^{2,3} Structure–activity relationships (SAR) in the indolo-carbazole series have been extensively studied in the context of topoisomerase I inhibition and tumor cell killing. Compounds bearing a pyrroloindolocarbazole and possessing one *N*-glycosidic bond, such as the antibiotic rebeccamycin, generally function as DNA topoisomerase I inhibitors.⁴ A few analogues such as NB-506 and J-107088 (also known as Edotecarin) have entered clinical trials for cancer treatment.^{5–7} More recently, fluorinated derivatives of such molecules have been reported and their topoisomerase I-dependent anticancer activity looks promising.^{8–10} We have recently described the bioisosteric replacement of an indole moiety by a 7-aza-indole unit to afford the first symmetrical and dissymmetrical 7-azaindolocarbazoles **I** and **II** (Fig. 1).¹¹ In the same vein, the cytotoxic properties of the *N*-glycosylated derivatives of **I** and **II** have been reported by others.^{12,13} For these different molecules, the role of topoisomerase I inhibition in the

cytotoxic action seems relatively minor when compared to the NB-506-type series. The data suggested that other signalling proteins, particularly kinases, may play a role.

In order to develop selective kinase inhibitors, fitting in the ATP binding site, modifications of the aromatic heterocyclic indolocarbazole moiety appeared as a valid alternative to the synthesis of glycosylated compounds. In addition, most of the aryl carbazoles designed so far for kinase inhibition possess an unsubstituted maleimide whereas in general the most cytotoxic compounds bear hydrophilic side chains. It is noteworthy to mention also that closely related heteroarylcarbrazoles (type **III**) have been described as inhibitors of Cyclin D1/CDK4.^{14,15} Cyclin dependent kinases (CDKs) were also targeted with indolocarbazoles such as bis *N*-indolyl alkylated arcycriaflavins recently described as CDK1, CDK2 and CDK4 inhibitors.^{16,17} In the NH maleimide series, indole *versus* (hetero)arylcarbrazole replacement represents also an interesting strategy.

With this in mind, we envisaged the synthesis of different naphthalenic compounds **IV**.¹⁸ The replacement of one of the two indoles by a naphthalene ring produced highly cytotoxic naphthocarbazoles **IV**, suggesting that the naphthalene is effectively a suitable bio-isostere for indole. At the same time, we developed a phenylcarbrazole series **V** in order to broaden our SAR knowledge.¹⁹ In both series, the SAR studies showed that i) for the phenylcarbrazoles of type **V**, unsubstituted maleimide compounds were non cytotoxic and enhanced the inhibition of CDK, ii) the presence of a basic side chain on the maleimide led to cytotoxic agents with weak CDK inhibition, iii) the introduction of a hydroxyl group on the indole in position 5 greatly influenced the biological properties.

We have identified a few studies on bis-indolic compounds such as homoarcyriaflavin **VI**, arcycrycyanin A **VII** which were synthesized but as yet no significant activities have been reported.^{20,21} In

^aInstitut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, CNRS UMR 6005, Rue de Chartres, BP 6759, 45067, Orléans Cedex 2, France. E-mail: sylvain.routier@univ-orleans.fr; Fax: +33 2 3841 7281; Tel: +33 2 3849 4853

^bINSERM U-837, IRCL, Place de Verdun, 59045, Lille, France

^cHôpital de Pontchaillou, INSERM U-522, 65033, Rennes Cedex, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Preparation and characterization of compounds **4**, **10–14**, **16–22**, **24**, **26–28**, **32**, **33**, **35**, **36**. See DOI: 10.1039/b801121d

‡ Present address: Institut de Recherches Pierre Fabre, 3 rue des satellites, 31140 Toulouse, France.

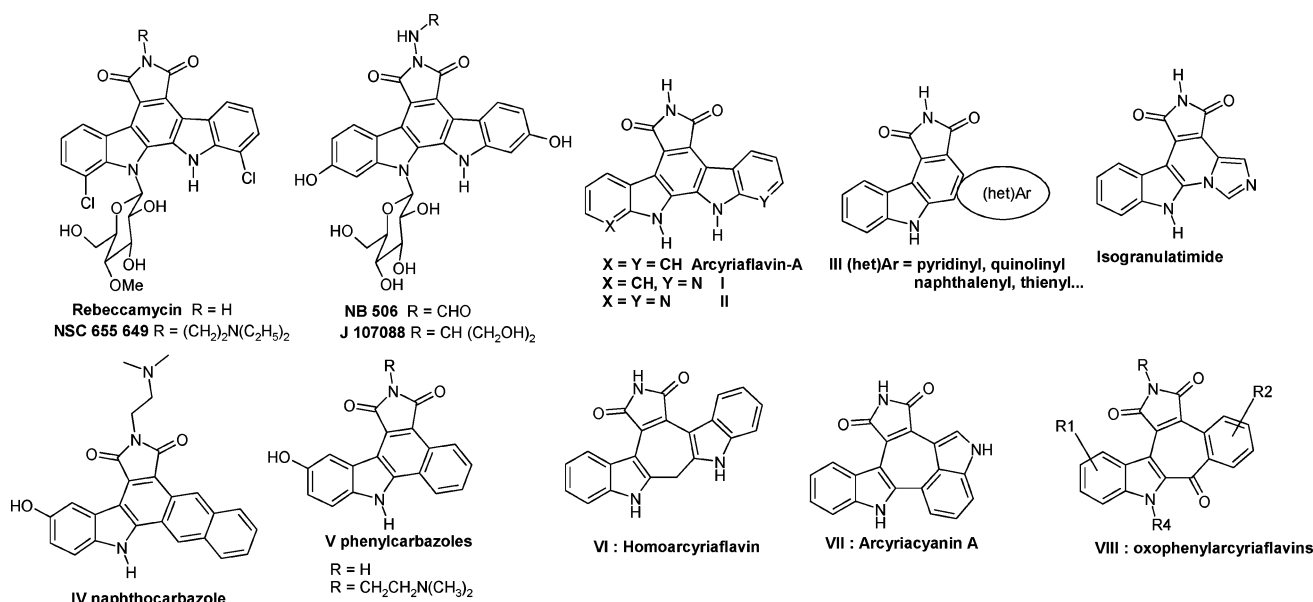
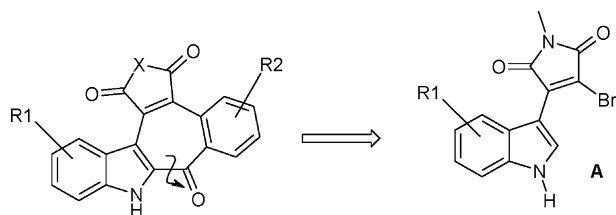


Fig. 1 Modifications of the indolocarbazole skeleton.

the present article, we report the design and the synthesis of new hybrid derivatives type **VIII** containing: an indole, an unusual seven-membered ring and a fused phenyl group. The central tropone moiety in **VIII** was surmounted by a fused substituted maleimide ring. In addition, we introduced molecular diversity by using indole or 5-hydroxyindole for the left part of the molecule and phenyl or dihydroxyphenyl rings for the right part to improve the SAR in this new series.

Chemistry

In this paper we report an improvement on the previously reported methodology²² and a general synthesis (Scheme 1), which starts from indoles and involves (i) the introduction of the maleimide leading to **A**, (ii) a Suzuki or Stille cross coupling reaction adding the 2-formylphenyl or the 2-carboxyphenyl groups, (iii) the transformation of the aldehyde or the ester into carboxylic acid, iv) an intramolecular electrophilic cyclization to afford the attempted cycloheptatrienones (tropones) currently named oxophenylarcyriaflavins.

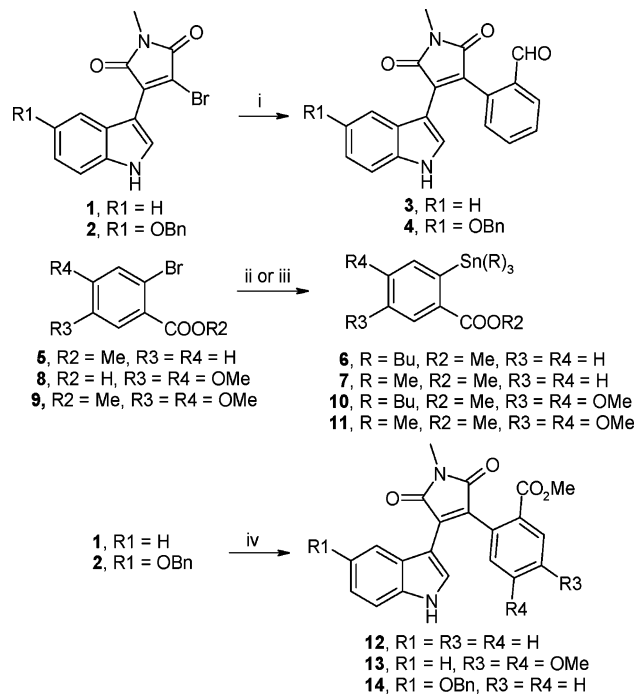


Scheme 1 Retrosynthesis of oxophenyl-arcyriaflavins.

A. Palladium catalyzed reactions

Following this strategy, we began the synthesis by preparing compounds **1** and **2**, classically obtained from indole or 5-benzyloxyindole and 2,3-dibromo-*N*-methylmaleimide in the presence of LiHMDS in THF in a fairly good yield.¹⁸ First, a palladium-catalyzed cross coupling Suzuki type reaction between

1 and the commercially available 2-formylphenylboronic acid led to **3** (Scheme 2). The reaction was carried out in the presence of K₂CO₃ in a refluxing mixture of dioxane–water using Pd(OAc)₂ as catalyst. After 6 h, compound **3** was obtained in the best yield



Scheme 2 Reagents and conditions: i) 2-formylphenylboronic acid (1.5 eq.), Pd(OAc)₂ (0.1 eq.), K₂CO₃ (1.8 eq.), dioxane–water 85 : 15, reflux, from **1** to **3**, 6 h, 72%, from **2** to **4**, 3.5 h, 79%; ii) Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq.), toluene, reflux, from **5** to **6**, Sn₂Bu₆ (1.2 eq.), 23 h, 47%, from **5** to **7**, Sn₂Me₆ (1.2 eq.), 2 h, 97%, from **9** to **11**, Pd(PPh₃)₄ (0.2 eq.), Sn₂Me₆ (1.5 eq.), 6 h, 81%; iii) from **9** to **10**, Sn₂Bu₆ (1.2 eq.), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.1 eq.), LiCl (0.5 eq.), toluene, reflux, 24 h, 54%; iv) PdCl₂(PPh₃)₂ (0.2 eq.), CuI (0.1 eq.), dioxane, reflux, from **1** and **6** (1.5 eq.) to **12**, 6 h, 74%, from **1** and **10** (1.5 eq.) to **13**, 5.5 h, 78%, from **2** and **6** (1.5 eq.) to **14**, 3 h 45 min, 75%.

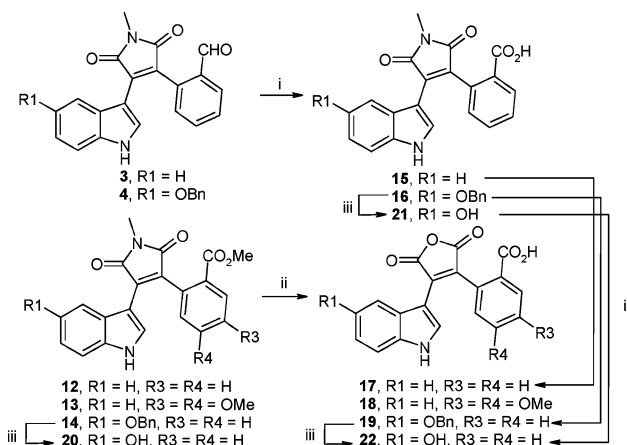
of 72%.^{18,22} Applying these conditions to the 5-benzyloxyindole derivative **2** led to the desired compound **4** in a 79% yield.

An alternative method to insert a carbonyl group between the indole and the phenyl rings consisted in the direct introduction of the 2-carboxymethylphenyl unit using **5**, **8** and **9** as starting materials. We have previously prepared **6** and **7**.²²⁻²⁴ By increasing the amount of Pd(PPh₃)₄ and Sn₂Me₆ we obtained **11** from **9** in an 81% yield. The compound **10** was obtained from **9** in best yield (54%) by modifying the nature of the palladium catalyst (PdCl₂(PPh₃)₂) and adding LiCl.

The Stille procedure applied to the bromo compound **1** and stannylated derivative **6** (1.5 eq.) was next performed with PdCl₂(PPh₃)₂ and CuI in refluxing dioxane. After 6 h, the desired compound **12** was obtained in 74% yield. Under similar conditions, the trimethyltin derivative **7** led to the same product **12** after 5 h in a 70% yield, and **10** afforded **13** in a 78% yield. Disappointingly, the trimethylstannyl derivative **11** led to **13** in only 53% yield in the best case. From **2** and **6**, the desired compound **14** was isolated without any difficulty in a fairly good yield (75%).

B. Synthesis of the carboxylic acids

The next step was aimed at generating a C-2 indolic keto function by oxidation of the aldehydes **3** (Scheme 3). This reaction was carried out with an aqueous solution of sodium chlorite and sulfamic acid at 6 °C, by accurate control of the temperature during the oxidant addition, and led to the acid **15** in a 81% yield.²² Applying these conditions to compound **4** led to **16** in only a 59% yield. Lowering the temperature to 2 °C (limits of freeze) afforded **16** in 83% yield.



Scheme 3 Reagents and conditions: i) NH₂SO₃H (8.1 eq.), NaClO₂ (2.2 eq.), dioxane–water, 1 min, from **3** to **15**, 6 °C, 81%, from **4** to **16**, 2 °C, 83%; ii) a) aq. KOH (45%, 60 eq.), acetone, rt, b) HCl conc. to pH = 1, rt; from **12** to **17**, a) 20 h, b) overnight, quant., from **13** to **18**, a) 2 h, reflux and b) overnight, quant., from **14** to **19**, a) KOH (40 eq.), 7 h and b) overnight, 36%, from **15** to **17**, a) KOH (40 eq.), 28 h, and b) 3 min, 91%, from **16** to **19**, a) 24 h, and b) 24 h, 95%, from **21** to **22**, a) KOH (40 eq.), 25 h and b) 3 days, 94%; iii) BBr₃ (25 eq.), CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 5 min, from **14** to **20**, 86%, from **19** to **22**, quant., from **16** to **21**, 83%.

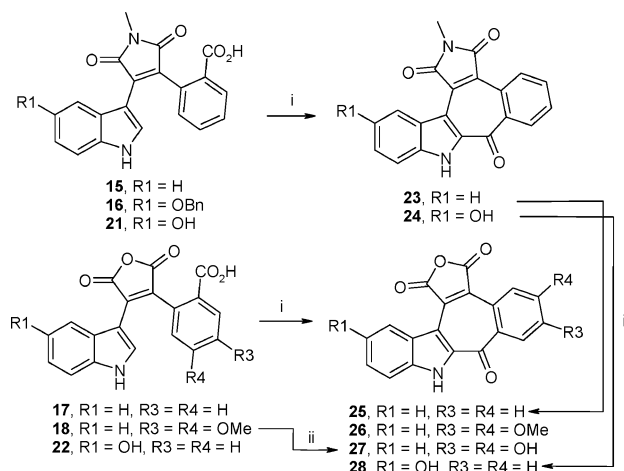
The second method used was hydrolysis of the ester **12** using a large excess of an aqueous KOH solution in acetone for 20 h at room temperature. Then, acidification with a concentrated hydrochloric acid solution (pH = 1) led, after a few addi-

tional hours, to the maleic anhydride compound **17** in a quantitative yield. Starting from **13** and **14**, this reaction required adaptation of reaction times but yielded **18** and **19** in average to excellent yields.

In parallel, we cleaved the benzyl group of **14**, **16** and **19** using BBr₃ at room temperature to generate respectively compounds **20**, **21** and **22** in very good yields. Basic treatments of compounds **15**, **16** and **21** led to **17**, **19** and **22** respectively in satisfying yields.

C. Electrophilic intramolecular reaction

The ring closure leading to the central seven-membered cycle through an electrophilic cyclization without any pre-activation of the carboxylic acid function, was the next goal. Based on our knowledge, mild conditions involving a large excess of BF₃·Et₂O in refluxing DCE had to be applied.²² After a few hours, the maleimide containing compounds **15** or **21** led to compound **23** and **24** in 89% and 60% yield, respectively. The same reaction carried out starting from **16** led to an intractable mixture. The benzyloxy group proved very sensitive toward Lewis acids (Scheme 4).



Scheme 4 Reagents and conditions: i) BF₃·Et₂O (40 eq.), DCE, reflux, from **15** to **23**, 5.5 h, 89%, from **21** to **24**, 2 h, 60%, from **17** to **25**, 20 h, 70%, from **18** to **26**, 5.5 h, 32%, from **22** to **28**, 19 h, 60% ii) BBr₃ (25 eq.), DCE, 0 °C to reflux, 47 h, from **18** to **27**, 88% iii) a) aq. KOH (45%, 40 eq.), acetone, rt, b) HCl conc. to pH = 1, rt, from **23** to **25**, a) 24 h, b) 12 h (overnight), quant., from **24** to **28**, a) 23 h and b) 2 days, 90%.

The intramolecular reaction performed with the anhydride **17**, required 20 h of reaction time to improve the yield of **25** to 70%. Compound **22** led to impure **28** in only 60% (as judged by ¹H NMR). Starting from **18**, the reaction led, even after flash chromatography to a mixture of compounds but a supplementary recrystallization afforded only **26** in a 32% yield.

We next attempted to selectively demethylate **18** with BBr₃ in dichloromethane. In all cases, a concomitant electrophilic cyclization, leading to complex mixtures, occurred. Thus, we set out for one pot cleavage and intramolecular reaction using a large excess of BBr₃ (25 eq.). At room temperature, after 18 h, only 25% of the desired product **27** was isolated. Increasing the temperature to reflux of dichloroethane led to the targeted compound in a good yield (88%) after 47 h. Disappointed by the problems associated with preparation of **28** from **22**, we decided to treat *N*-methylmaleimide **24** with alcoholic KOH solution for 23 h.

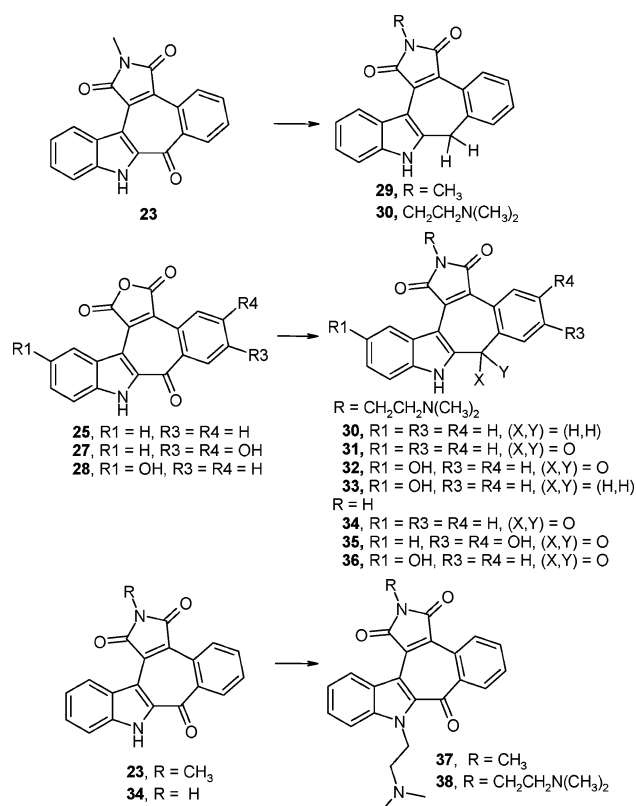
After the acidification step the attempted compound **28** was obtained in a 90% yield. Similarly, compound **23** furnished the derivative **25** in a quantitative yield.

D. Synthesis of functionalized oxophenylarcyriaflavins

The first modification we attempted was the introduction of a dimethylaminoethyl side chain on the maleimide or maleic anhydride part of scaffold **23**, **25**, **27**, **28** (Scheme 5, Table 1, entries 1–10). Previously, we reported that, in boiling dimethylaminoethylamine, in a sealed tube and in the presence of DMF, the reaction of compound **23** led only to the reduced compound **29** in 41% yield.²² Under similar conditions, the reaction of the more reactive anhydride **25** afforded compound **31** in 59% yield (entries 1,2). Application of these reaction conditions to our new derivatives **27** and **28** was fruitless. These results prompted us to investigate other conditions. In open glassware, in boiling dimethylaminoethylamine, compound **30** was synthesized either from maleimide **23** or from anhydride **25** in 48% and 86% yield, respectively (entries 3, 4). All attempts starting from **27** failed again.

In order to reduce the reaction time, we next investigated the reactivity of **25**, **27** and **28** in the presence of dimethylaminoethylamine under microwave irradiation (Biotage apparatus).²⁵ In the above diamine, at 150 °C, compound **25** led to the desired compound **31** after 15 min, but in only 10% yield. It is possible that the poor solubility of **25** causes the low yield. Next, the two reagents were adsorbed on a solid phase.²⁶ From the furo derivatives **25** and **28**, the direct absorption on silica gel with 5.0 eq. of diamine led to the attempted products **31** and **32** in an improved yield of 48% and 33% respectively. Starting materials (30%) and reduced compounds **30** or **33** were also isolated during the purification steps (entries 5, 6).

The next attempted variation dealt with the reaction of **25** with ammonia in the presence of DMF (entry 7).¹⁹ Refluxing for 67 h an aqueous solution of NH₄OH (30%) containing **25** led to compound **34** in 70% yield with no trace of reduction of the tropone. Another solution to perform the NH insertion consisted in the reaction of the anhydride **25** with melted NH₄OAc. After 2 h, the derivative **34** was isolated in a best yield of 81%. The major advantage of this method was its compatibility with the



Scheme 5 For reagents and conditions see Table 1.

presence of quinonic or quinonimine sensitive systems. So, we next performed the reaction with the two anhydrides **27** and **28** to isolate compounds **35** and **36** in 65 and 73% yield, respectively (entries 8–10).

Then, we used compounds **23** and **34** to introduce the dimethylaminoethyl side chain onto the free indolic nitrogen atom (entries 11, 12) in the presence of NaH and chloroethyldimethylamine in DMF at 90 °C. From compound **23**, the derivative **37** was isolated in a 84% yield, whereas starting from **34**, both nitrogen atoms reacted with the chloroalkyl derivative and the compounds **31** and

Table 1 Substitution of derivatives, **23**, **25**, **27**, **28** and **34**

Entry	Starting material	Reagent	Conditions	Temperature	Time	Product (yield)
1	23	Excess of NH ₂ (CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	Sealed tube, DMF	refl	22 h	29 (41%) ^b
2	25	Excess of NH ₂ (CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	Sealed tube, DMF	refl	18 h	31 (59%) ^b
3	23	Excess of NH ₂ (CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	Open flask without solvent	refl	22 h	30 (48%) ^b
4	25	Excess of NH ₂ (CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	Open flask without solvent	refl	64 h	30 (86%) ^b
5	25	NH ₂ (CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂ (5 eq.)	μwave, SiO ₂ (8.5 eq.)	150 °C	15 min	31 (48%) ^b , 30 (15%) ^a
6	28	NH ₂ (CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂ (5 eq.)	μwave, SiO ₂ (8.5 eq.)	150 °C		32 (33%) ^b , 33 (9%) ^a
7	25	Aqueous NH ₄ OH	DMF	refl	67 h	34 (70%) ^b
8	25	Fused NH ₄ OAc in excess		130 °C	2 h	34 (81%) ^b
9	27	Fused NH ₄ OAc in excess		130 °C	3 h	35 (65%) ^b
10	28	Fused NH ₄ OAc in excess		130 °C	3 h 30 min	36 (73%) ^b
11	23	ClCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂ (2.5 eq.)	NaH (3.8 eq.), DMF	90 °C	9 h	37 (84%) ^b
12	34	ClCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂ (2.5 eq.)	NaH (3.8 eq.), DMF	90 °C	24 h	31 (13%) ^b , 38 (30%) ^b
13	34	ClCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂ (2.5 eq.)	K ₂ CO ₃	65 °C	24 h	31 (33%) ^b , 38 (10%) ^b

^a Estimated by ¹H NMR. ^b Isolated product.

38 were obtained in 13 and 30% yield respectively. Replacing NaH for K_2CO_3 and performing the reaction at 65 °C slightly favored the maleimide substitution and compound **31** was isolated in 33% yield whereas only 10% of **38** was obtained (entry 13).

Biological results and discussion

The newly synthesized compounds were tested for DNA binding and topoisomerase inhibition. Their cytotoxic properties were also measured. The data are collected in Table 2. DNA interaction was first estimated using a conventional melting temperature assay with calf thymus DNA (CT-DNA, 42% GC). Unsurprisingly, the molecules bearing a dimethylaminoethyl side chain were found to stabilize CT-DNA whereas the other neutral molecules showed little, if any, interaction with nucleic acids. Compounds **31** and **32** bearing the cationic chain on top of the maleimide ring showed marked interaction with DNA, with ΔT_m of 7 °C and these two compounds were markedly cytotoxic toward HL60 human leukemia cells. Compound **32** showed the most cytotoxic activity in the series, with an IC_{50} of 0.3 μM close to that of the reference antitumor antibiotic rebeccamycin. The hydroxyl group on the indole ring contributed modestly to DNA binding but, more significantly, to cytotoxicity (and solubility as well). Interestingly, by comparing compounds **30** and **31**, as well as **32** and **33**, it clearly appeared that the reduction of the keto group of the central tropone ring strongly reduced the DNA binding capacity and abolished the cytotoxic effects, suggesting that DNA interaction may contribute (to some extent) to the biological activity of **31** and **32**. This conclusion is also supported by the observation that the other neutral compounds that bind weakly, or with no detectable binding to DNA, correspondingly showed no significant cytotoxic properties. However, DNA interaction is not sufficient to determine cytotoxicity since compound **38**, with two dimethylaminoethyl side chains on the maleimide and indole rings, was found to be poorly cytotoxic towards HL60 cells despite its superior propensity to DNA binding.

DNA binding of four key molecules (**30–32**, **38**) was investigated further using the alternative polymer poly(dAdT)₂. Under the experimental conditions used (16 mM Na⁺), the helix-to-coil transition occurs at 42 °C in the absence of drugs. The T_m was shifted to higher temperatures with the four drugs and more pronounced with the keto derivative **31** as compared to the methylene analogue **30** (Fig. 2). Thus corroborating the previous observation with CT-DNA, we can conclude that the keto group is directly involved in DNA recognition (through H-bonding, for example) and/or indirectly, by providing a more planar chromophore. The ΔT_m values reached 18 °C with compound **38**, and the molecules rank order **38** > **31**, **32** > **30**.

The mode of binding to DNA was investigated by spectroscopic methods. These compounds intercalate into DNA and this is particularly clear with compound **38**. DNA induces significant shifts in the UV–Visible spectra of **38** with a marked decrease in the extinction coefficient around 450 nm and a shift of the band to a much longer wavelength (Fig. 3). The UV–Visible spectral changes are more subtle with **32**. Circular dichroism (CD) measurements showed that a negative band centered at 350 nm appeared upon addition of CT-DNA. This band reflects the orientation of the tetracyclic chromophore bound to the double helix and is entirely consistent with an intercalative binding process. Intercalating

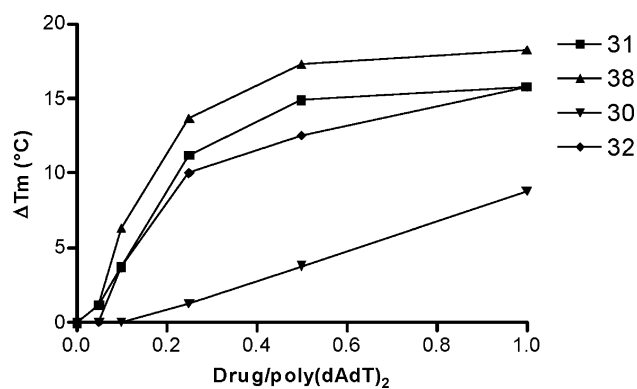


Fig. 2 Melting temperature variation ΔT_m ($T_{m, \text{drug-DNA complex}} - T_{m, \text{DNA alone}}$ in °C) of poly(dAdT)₂ after incubation with drugs at increasing drug/DNA. T_m measurements were performed in BPE buffer, in 1 cm quartz cuvettes at 260 nm with a heating rate of 1 °C min⁻¹. The T_m values were obtained from first-derivative plots.

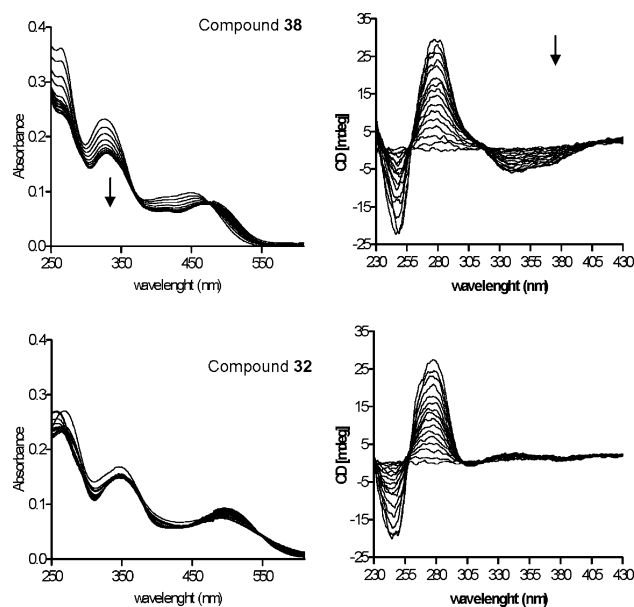
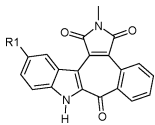
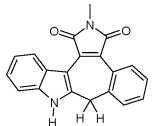
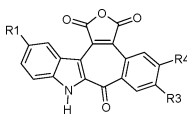
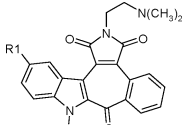
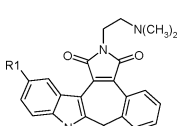
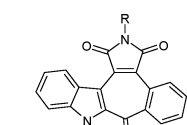
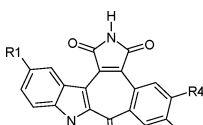


Fig. 3 (left) Absorption and (right) CD DNA titration of compound **38** and **32** in BPE buffer for absorption and cacodylate buffer for CD DNA titration. Aliquots of a concentrated calf thymus DNA solution were added to 1 ml of a drug solution (20 μM for the absorbance and 50 μM for the CD measurements). The drug/DNA ratios increased from 0 to 1.

agents usually (but not always) give this type of negative CD signal whereas positive signals are commonly seen with minor groove binders. The negative CD band was not observed with **32** but the unwinding data (see below) also support intercalation.

Based on the structural analogy with rebeccamycin, the compounds were tested as potential inhibitors of topoisomerases I and II. In all cases, none of the compound was found to act as a “poison” capable of stabilizing topoisomerase–DNA complexes, as can be commonly detected with the reference drugs camptothecin (for topoisomerase I) or etoposide (for topoisomerase II) (data not shown). An interference with the catalytic activity of the enzyme was observed in some cases, but this only reflects the DNA-binding capacity. As shown in Fig. 4, concentration-dependent inhibition of the relaxation of a supercoiled plasmid DNA with topoisomerase I was detected

Table 2 *In vitro* cytotoxic effect IC₅₀ (μM); Fibro = human diploid skin fibroblastic cells (normal cell line); HL60 human leukemia cells (tumor cell line), Caco2 = human colon carcinoma cells (tumor cell line);²⁷ Huh7 = human hepatocarcinoma cells (tumor cell line);²⁸ F1 = RLEC for rat biliary epithelial cells clone F1 (tumor cell line)²⁹

Compound	ΔT_m^a	Fibro ^c	HL60 ^b	Caco ^c	Huh7 ^c	F1 ^c	
	23 R1 = H 24 R1 = OH	0 0	>25 10	>100 27	10 2	>25 30	10 20
	29	ND	>25	ND	20	4	4
	25 R1 = R3 = R4 = H 26 R1 = H, R3 = R4 = OMe 27 R1 = H, R3 = R4 = OH 28 R1 = OH, R3 = R4 = H	0 0 0 0	>25 10 >25 >25	52 50 >100 >100	2 10 >25 >25	>25 5 >25 >25	0.2 10 0.4 >25
	31 R1 = H 32 R1 = OH	6.8 7.1	10 0.6	1.22 0.31	1 0.5	2 1	0.4 0.07
	30 R1 = H 33 R1 = OH	2.5 ND	10 >100	72 ND	3 30	30 10	0.7 4
	37 R = CH ₃ 38 R = CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	ND 9.9	10 >25	ND 17	10 7	2 6	2 2
	34 R1 = R3 = R4 = H 35 R1 = H, R3 = R4 = OH 36 R1 = OH, R3 = R4 = H	1.2 0.9 0	10 >25 >25	22 5.81 37	0.3 10 >25	>25 0.3 10	20 2 20
References	Roscovitin Rebeccamycin	ND ND	20 ND	ND 0.16	2 ND	3 ND	5 ND

ND = not determined. ^a Variations in melting temperature, $\Delta T_m = T_m^{\text{drug-DNA complex}} - T_m^{\text{CTDNA alone}}$ in °C. T_m measurements were performed in BPE buffer, in 1 cm quartz vials at 260 nm with a heating rate of 1 °C min⁻¹. The T_m values were obtained from first-derivative plots. ^b Drug concentrations that inhibit circulating HL60 leukemia cells from solid tumors growth by 50% after 72 h of incubation. Roscovitin and Rebeccamycin were used as internal standard for cell assays. ^c Drug concentrations that inhibit circulating adherent cells from solid tumors growth by 50% after 48 h of incubation. Roscovitin and Rebeccamycin were used as internal standard for cell assays.

on poly-acrylamide gels. The unwinding of DNA resulting from the insertion of the drug between base pairs is clearly evidenced with several compounds, in particular with **31** and **38**. In these cases, the topoisomer population is shifted to the top part of the gel at 20 μM (relaxation) and at higher concentrations, the DNA becomes positively supercoiled because of intercalation and it starts to migrate faster in the gel. Together with the CD data, this result effectively attests that these compounds intercalate into DNA.

The cytotoxicity was evaluated further using a pair of murine leukemia cells, either sensitive or resistant to the antitumor drug camptothecin (CPT) which is a reference topoisomerase I poison. The resistance of the P388CPT5 cells has been attributed to the expression of a deficient form of topoisomerase I as a result of a mutation in the *top1* gene of these cells.³⁰ The two mutations (Gly³⁶¹Val and Asp⁷⁰⁹Tyr) in conserved regions of the *top1* gene strongly diminish the sensitivity of the cells to CPT, by a factor >100 (Table 3).

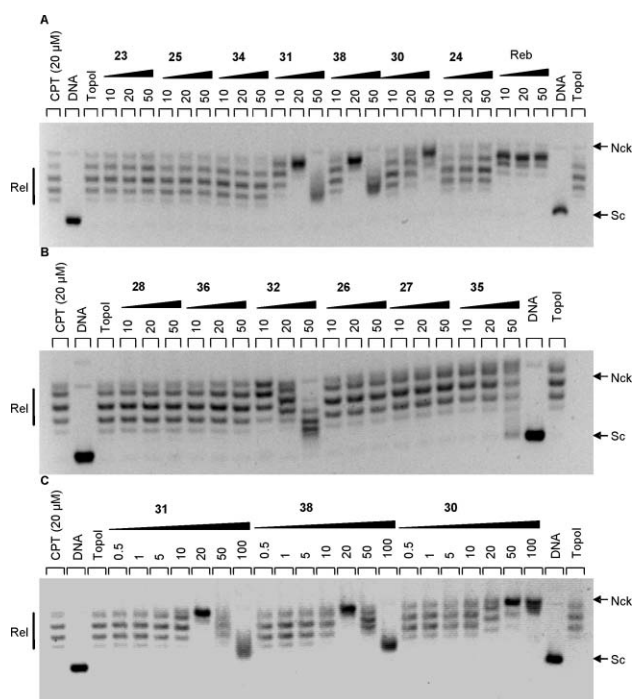


Fig. 4 Inhibition of topoisomerase I-mediated DNA plasmid pUC19 in the presence of graded concentrations of drugs. Plasmid DNA (120 ng, lane DNA) was incubated for 45 min at 37 °C with drug, then 30 min at 50 °C with 4 units of topoisomerase I (topogen Inc) in the absence (lane topoI) or in the presence of drug at the indicated concentrations (μM). Reaction was stopped with SDS and treatment with proteinase K. The DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis. The gel was stained with ethidium bromide and photographed under UV light. Nck: nicked; Rel: relaxed; Sc: supercoiled.

In contrast, these mutations showed little effect on the cytotoxic potential of **31** and **32**, as is the case for rebeccamycin. Topoisomerase I is not the main target of these compounds. Nevertheless, the use of these additional pair of cell lines confirmed the cytotoxic bioactivity of **31–32**, with $\text{IC}_{50} < 1.0 \mu\text{M}$. Noteworthy, the higher cytotoxicity of **32** compared to **31** was observed in all cases, with

Table 3 Cytotoxicity on sensitive and resistant P388 cell line

Compound	P388 ($\text{IC}_{50}/\mu\text{M}$)	P388CPT5 ($\text{IC}_{50}/\mu\text{M}$)	RRI ^a
Camptothecin	0.031	3.310	107
Rebeccamycin	0.19	0.71	3.7
31	0.70	1.02	1.46
32	0.231	0.521	2.26

^a Relative resistance index: $\text{IC}_{50}(\text{CPT-resistant})/\text{IC}_{50}(\text{CPT-sensitive})$.

circulating HL-60 cells and P388 cells as well as with adherent cancer cells derived from solid tumors, such as human colon carcinoma Caco2 cells and human hepatocarcinoma Huh7 cells (Table 2). In addition, very actively proliferating transformed rat biliary epithelial cells were also found to be exquisitely sensitive to this molecule, with an IC_{50} of 700 nM (Table 2). Meanwhile, this compound was also found to be active onto non-tumoral poorly proliferating human skin fibroblastic cells, suggesting distinct signaling pathways that warrant further investigation.

In parallel, the effect on the cell cycle of P388 and P388CPT5 leukemia cells of DNA-binding compounds **30–32**, **38** was investigated (Fig. 5). Compounds **31** and **32** induced a strong accumulation of the cells in the G2 + M phase at 1 μM , as observed with camptothecin, whereas **38** and **30** showed no significant effect at the same concentration. A similar trend was observed with the topoisomerase I-mutated cell line P388CPT5. It is clear that the mutation of the *top1* gene does not impact on the activity of the two oxophenylaryriaflavin compounds.

Kinase inhibition

It is well known that (hetaryl)pyrrolo[3,4-*c*]carbazole derivatives can induce selective protein kinase inhibition.^{14–17,32} So we next tested the compounds for potential inhibition of CDK1, CDK5 and glycogen synthase kinase-3 (GSK3) to evaluate a possible selectivity (Table 4).¹⁹ The non cytotoxic compound **36** showed a significant inhibitory activity (IC_{50} CDK1 = 1.3 μM , IC_{50} CDK5 = 0.9 μM , IC_{50} GSK3 = 2.2 μM), without any selectivity, thus indicating the major role of the unsubstituted maleimide group in

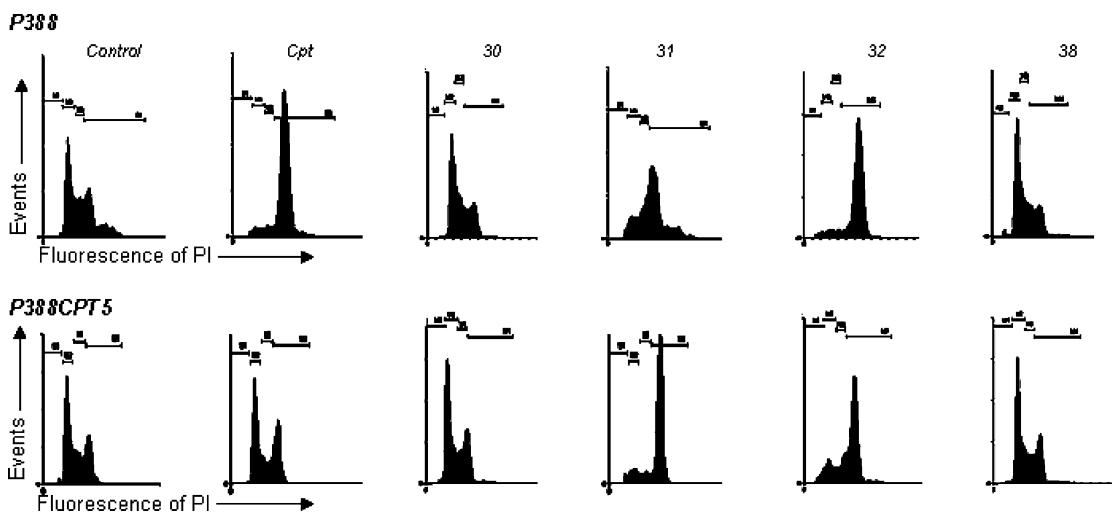
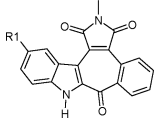
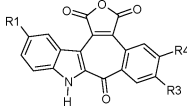
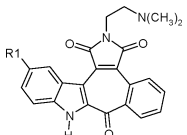
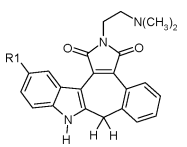
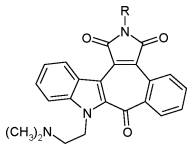
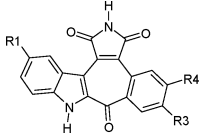


Fig. 5 Cell cycle distribution in CEM cells treated for 24 h with graded concentrations of **30–32**, **38**. Cells were analyzed with the FACScan flow cytometer. Data are the result of two independent experiments.

Table 4 Inhibition tests on CDK1, CDK5 and GSK3

Compound	IC ₅₀ /μM			
	CDK1	CDK5	GSK3	
	23 R1 = H 24 R1 = OH	>10 75	ND 10	>10 >100
	25 R1 = R3 = R4 = H 26 R1 = H, R3 = R4 = OMe 27 R1 = H, R3 = R4 = OH 28 R1 = OH, R3 = R4 = H	4.5 >10 40 19	14 >10 30 >100	45 >10 5.7 >100
	31 R1 = H 32 R1 = OH	16 >10	8.2 >10	12 >10
	30 R1 = H	4	9	20
	38 R = CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	2.6	4.8	10
	34 R1 = R3 = R4 = H 36 R1 = OH, R3 = R4 = H	4.3 1.3	3.9 0.9	18 2.2

this activity. The lack of the hydroxyl group impaired the inhibition indicating that the indolic hydroxyl group of **36** gives a favourable interaction with the enzyme catalytic site (compound **34**, IC₅₀ CDK1 = 4.3 μM, IC₅₀ CDK5 = 3.9 μM, IC₅₀ GSK3 = 18 μM). The selectivity of CDKs *versus* GSK3 was enhanced when the indolic hydroxy group was absent. Surprisingly the last unsubstituted maleimide compound **35**, which is hydroxylated on the phenyl ring, was inactive against all the tested kinases but exhibited strong cytotoxic activities against Huh7 and F1 cell lines. This result indicates also that kinase inhibition and cytotoxicity were not correlated. Compound **36** constitutes an interesting scaffold from which more potent and more selective inhibitors could potentially be designed.

Conclusion

To sum up, in this paper we designed new polysubstituted oxophenylaryiaflavins starting from indoles using efficient syntheses. Preparation of these compounds was achieved using a Suzuki or a Stille procedure whereas formation of the central tropone ring required an intramolecular electrophilic reaction. Different substitutions either on the indolic nucleus, on the phenyl

ring or on the maleimide moiety were successfully achieved to provide access to a new potential anticancer agent family. Some molecules proved to be potent cytotoxic agents able to interfere with the cell cycle of cancer cells. DNA binding, but not topoisomerase inhibition, seems to play a role in the cytotoxic action. CDK1, CDK5 and GSK3 are apparently not major targets for these compounds but the oxophenylaryiaflavin scaffold may be further exploited to generate kinase inhibitors.

Experimental section

A. Chemistry

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DPX 250 instrument using CDCl₃ or DMSO-*d*₆. The chemical shifts are reported in ppm (δ scale) and all *J* values are in Hz. The following abbreviations are used: singlet (s), doublet (d), doubled doublet (dd), triplet (t), multiplet (m), quaternary carbon (Cq). Melting points are uncorrected. IR absorptions were recorded on a Perkin Elmer PARAGON 1000 PC and values were reported in cm⁻¹. MS spectra (Ion Spray) were performed on a Perkin Elmer Sciex API 300 or on Avatar 320 equipped using an ATR (Ge) technique.

HRMS were performed by the Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO, Rennes) on a high resolution mass spectrometer with double focalisation Varian Mat 311 using electronic impact. Monitoring of the reactions was performed using silica gel TLC plates (silica Merck 60 F₂₅₄). Spots were visualized by UV light at 254 and 356 nm. Flash chromatography columns were performed using silica gel 60 (0.040–0.063 mm, Merck). Microwave experiments were performed on a Biotage Initiator apparatus. For compounds **4**, **12–22** in the ¹H NMR data the H' refers to phenyl ring protons. Synthesis and experimental data of compounds **3**, **15**, **23**, **25**, **29–31**, **34**, **37**, **38** were previously reported.²²

For the preparation and characterization of compounds **4**, **10–14**, **16–22**, **24**, **26–28**, **32**, **33**, **35**, **36**, see the ESI.

B. Biological studies

Topoisomerase inhibition assays. These were performed as previously described.³¹

DNA binding measurements

Melting curves were measured with an Uvikon 943 spectrophotometer coupled to a Nesab RTE111 cryostat. Titrations of the drug with DNA, covering a large range of drug/DNA-phosphate ratios (D/P), were performed by adding aliquots of a concentrated drug solution to a constant DNA solution (20 μM). *T_m* measurements were performed in BPE buffer pH 7.1 (6 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA). The temperature inside the cuvette (10 mm path length) was increased over the range 20–100 °C with a heating rate of 1 °C min⁻¹. The “melting” temperature *T_m* was taken as the mid-point of the hyperchromic transition.

Cell culture and survival assay

Human CEM and CEMC2 leukemia cells were obtained from the American Tissue Culture Collection. Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 4.5 g L⁻¹ glucose, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, penicillin (100 IU mL⁻¹), and streptomycin (100% g mL⁻¹). The cytotoxicity on these cells of the tested compounds was assessed using a cell proliferation assay developed by Promega (CellTiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay). Briefly, 2 × 10⁴ exponentially growing cells were seeded in 96-well microculture plates with graded drug concentrations in a volume of 100 μL. After 72 h incubation at 37 °C, 20 μL of the tetrazolium dye was added to each well, and the samples were incubated for a further 2 h at 37 °C. Plates were analyzed on a Labsystems Multiskan MS (type 352) reader at 492 nm.

Skin diploid fibroblastic cells were provided by BIOPREDIC International Company (Rennes, France). Caco-2 cells and Huh7 cells were obtained from the ECAC collection. Cells were grown according to ECAC recommendations. RLEC-F1 clone is derived from an established rat biliary epithelial cell line as previously described.²⁸ The toxicity test of the compounds on these cells was as follows: 4 × 10³ cells were seeded in 96 multiwell plates and left for 24 h for attachment, spreading and growing. Then, they were exposed for 48 h to increasing concentrations of the

compounds, ranging from 0.1 to 25 μM in a final volume of 80 μL of culture medium. They were fixed with 4% paraformaldehyde solution and nuclei were stained with Hoechst 3342 and counted using automated imaging analysis (Simple PCI software).

Cell cycle analysis

For flow cytometric analysis of DNA content, 0.7 × 10⁶ cells in exponential growth were treated with graded concentrations of the tested drug for 24 h and then washed with 1 mL of PBS. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in 1 mL of cold ethanol for 24 h at –0 °C. The ethanol was removed, and the pellet was washed with 1 mL PBS and then incubated for 30 min in a solution containing 50 μg mL⁻¹ PI and 100 μg mL⁻¹ RNase. Samples were analyzed on a Becton Dickinson FACScan flow cytometer using CellQuest software, which was also used to determine the percent of cells in the different phases of the cell cycle. PI was excited at 488 nm, and fluorescence analyzed at 620 nm on channel FL-2.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Nord) and the Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (A.L.), from the Canceropôle Grand Ouest, the Région Centre and the Association pour la Recherche contre le Cancer (S.R.). We thank Dr Laurent Meijer and Olivier Lozach (CNRS Roscoff) for performing the kinase assays.

Notes and references

- 1 C. Bailly, *Targetting DNA and Topoisomerase I with Indolocarbazole Antitumor Agents*, in *Small Molecule DNA and RNA Binders*, Ed. M. Demeunynck, C. Bailly and W. Wilson, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, vol. 2, pp. 538–575.
- 2 J. Pines, *Nat. Cell Biol.*, 1999, **1**, E73–E79.
- 3 D. O. Morgan, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1997, **13**, 261–291.
- 4 M. Prudhomme, *Eur. J. Med. Chem.*, 2003, **38**, 123–140.
- 5 B. H. Long, W. C. Rose, D. M. Vyas, J. A. Matson and S. Forenza, *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents*, 2002, **2**, 255–265.
- 6 T. Yoshinari, M. Ohkubo, K. Fukasawa, S. Egashira, Y. Hara, M. Matsumoto, K. Nakai, H. Arakawa, H. Morishima and S. Nishimura, *Cancer Res.*, 1999, **59**, 4271–4275.
- 7 H. Arakawa, M. Morita, T. Kodera, A. Okura, M. Ohkubo, H. Morishima and S. Nishimura, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1999, **90**, 1163–1170.
- 8 B. N. Balasubramanian, D. R. St. Laurent, B. H. Long, C. Bachand, F. Beaulieu, W. Clarke, M. Deshpande, J. Eummer, C. R. Fairchild, D. B. Frennesson, R. Kramer, F. Y. Lee, M. Mahler, A. Martel, B. N. Naidu, W. C. Rose, J. Russell, E. Ruediger, M. G. Saulnier, C. Solomon, K. M. Stoffan, H. Wong, K. Zimmermann and D. M. Vyas, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 1609–1612.
- 9 M. G. Saulnier, B. N. Balasubramanian, B. H. Long, D. B. Frennesson, E. Ruediger, K. Zimmermann, J. T. Eummer, D. R. St. Laurent, K. M. Stoffan, B. N. Naidu, M. Mahler, F. Beaulieu, C. Bachand, F. Y. Lee, C. R. Fairchild, L. K. Stadnick, W. C. Rose, C. Solomon, H. Wong, A. Martel, J. J. Wright, R. Kramer, D. R. Langley and D. M. Vyas, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 2258–2261.
- 10 M. G. Saulnier, D. R. Langley, D. B. Frennesson, B. H. Long, S. Huang, Q. Gao, D. Wu, C. R. Fairchild, E. Ruediger, K. Zimmermann, D. R. St. Laurent, B. N. Balasubramanian and D. M. Vyas, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 1271–1274.
- 11 S. Routier, N. Ayerbe, J. Y. Mérou, G. Coudert, C. Bailly, A. Pierre, B. Pfeiffer, D. H. Caignard and P. Renard, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 6621–6630.
- 12 C. Marminon, A. Pierre, B. Pfeiffer, V. Perez, S. Léonce, P. Renard and M. Prudhomme, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 679–687.

- 13 C. Marminon, A. Pierre, B. Pfeiffer, V. Perez, S. Léonce, A. Joubert, C. Bailly, P. Renard, J. Hickman and M. Prudhomme, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 609–622.
- 14 C. Sanchez-Martinez, C. Shih, M. M. Faul, G. Zhu, M. Paal, C. Somoza, T. Li, C. A. Kumrich, L. L. Winneroski, Z. Xun, H. B. Brooks, B. K. R. Patel, R. M. Schultz, T. B. DeHahn, C. D. Spencer, S. A. Watkins, E. Considine, J. A. Dempsey, C. A. Ogg, R. M. Campbell, B. A. Anderson and J. Wagner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 3835–3839.
- 15 T. A. Engler, K. Furness, S. Malhotra, C. Sanchez-Martinez, C. Shih, W. Xie, G. Zhu, X. Zhou, S. Conner, M. M. Faul, K. A. Sullivan, S. P. Kolis, H. B. Brooks, B. Patel, R. M. Schultz, T. B. DeHahn, K. Kirmani, C. D. Spencer, S. A. Watkins, E. L. Considine, J. A. Dempsey, C. A. Ogg, N. B. Stamm, B. D. Anderson, R. M. Campbell, V. Vasudevan and M. L. Lytle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 2261–2267.
- 16 M. M. Faul, T. A. Engler, K. A. Sullivan, J. L. Grutsch, M. T. Clayton, M. J. Martinelli, J. M. Pawlak, M. LeTourneau, D. S. Coffey, S. W. Pedersen, S. P. Kolis, K. Furness, S. Malhotra, R. S. Al-Awar and J. E. Ray, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 2967–2975.
- 17 G. Zhu, S. E. Conner, X. Zhou, C. Shih, T. Li, B. D. Anderson, H. B. Brooks, R. M. Campbell, E. Considine, J. A. Dempsey, M. M. Faul, C. Ogg, B. Patel, R. M. Schultz, C. D. Spencer, B. Teicher and S. A. Watkins, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 2027–2030.
- 18 S. Routier, P. Peixoto, J.-Y. Mèrou, G. Coudert, C. Bailly, A. Pierre, S. Léonce and D.-H. Caignard, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 1401–1413.
- 19 S. Routier, J.-Y. Mèrou, N. Dias, A. Lansiaux, C. Bailly, O. Lozach and L. Meijer, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 789–799.
- 20 S. Mahboobi, T. Burgemeister, S. Dove, S. Kuhr and A. Popp, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 8130–8137.
- 21 M. Brenner, G. Mayer, A. Terpin and W. Steglich, *Chem.–Eur. J.*, 1997, **3**, 70–74.
- 22 A. Bourderieux, S. Routier, V. Bénèteau and J.-Y. Mèrou, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 9465–9475; A. Bourderieux, S. Routier, V. Bénèteau and J.-Y. Mèrou, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 6071–6074.
- 23 A. Kalivretenos, J. K. Stille and L. S. Hegedus, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 2883–2894.
- 24 K. C. Nicolaou, D. Hepworth, N. P. King, M. Raymond, V. Finlay, R. Scarpelli, M. Manuela, A. Pereira, B. Bollbuck, A. Bigot, B. Werschkun and N. Winssinger, *Chem.–Eur. J.*, 2000, **6**, 2783–2800.
- 25 T. Vidal, A. Petit, A. Loupy and R. N. Gedye, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 5473–5478.
- 26 A. Mortoni, M. Martinelli, U. Piarulli, N. Regalia and S. Gagliardi, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 6623–6627.
- 27 L. Mahraoui, A. Rodolosse, A. Barbat, E. Dussaux, A. Zweibaum, M. Rousset and E. Brot-Laroche, *Biochem. J.*, 1994, **298**, 629–633.
- 28 H. Nakabayashi, K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane and J. Sato, *Cancer Res.*, 1982, **42**, 3858–3863.
- 29 M. Rialland, A. Corlu, G. Ilyin, F. Cabillic, I. Lamy and C. Guguen-Guillouzo, *Cytokine*, 2000, **12**, 951–959.
- 30 J. Madelaine, S. Prost, A. Naudin, G. Riou, F. Lavelle and J. F. Riou, *Biochem. Pharmacol.*, 1993, **45**, 339–348.
- 31 C. Bailly, *Methods Enzymol.*, 2001, **340**, 610–623.
- 32 G. Zhu, S. E. Conner, X. Zhou, H.-K. Chan, C. Shih, T. A. Engler, R. S. Al-awar, H. B. Brooks, S. A. Watkins, C. D. Spencer, R. M. Schultz, J. A. Dempsey, E. L. Considine, B. R. Patel, C. A. Ogg, V. Vasudevan and M. L. Lytle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 3057–3061; G. Zhu, S. Conner, X. Zhou, C. Shih, H. B. Brooks, E. Considine, J. A. Dempsey, C. Ogg, B. Patel, R. M. Schultz, C. D. Spencer, B. Teicher and S. A. Watkins, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 1231–1235.

**REFECENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- Abdul, M., Santo, A., and Hoosein, N. Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. *Anticancer Res.*, 23: 3347-3351, 2003.
- Abend, M. Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int.J.Radiat.Biol.*, 79: 927-941, 2003.
- Abu-Hamad, S., Zaid, H., Israelson, A., Nahon, E., and Shoshan-Barmatz, V. Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding. *J.Biol.Chem.*, 283: 13482-13490, 2008.
- Acton, D., Domen, J., Jacobs, H., Vlaar, M., Korsmeyer, S., and Berns, A. Collaboration of pim-1 and bcl-2 in lymphomagenesis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 182:293-8.: 293-298, 1992.
- Anderson RJ, Faulkner DJ, Cun-heng H, Van Duyne GD & Clardy J. Metabolites of the marine prosobranch mollusc *Lamellaria* sp. *J. Am. Chem. Soc.* 1985; 107:5492-95.
- Agami, R., Blandino, G., Oren, M., and Shaul, Y. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature.*, 399: 809-813, 1999.
- Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Wang, L., Talanian, R. V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.*, 57: 615-619, 1997.
- Alexandre, J., Hu, Y., Lu, W., Pelicano, H., and Huang, P. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res.*, 67: 3512-3517, 2007.
- Alnemri, E. S. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J.Cell Biochem.*, 64: 33-42, 1997.
- Altieri, D. C. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 18: 609-615, 2006.
- Amsel, A. D., Rathaus, M., Kronman, N., and Cohen, H. Y. Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, 105: 5117-5122, 2008.
- Arap, W., Haedicke, W., Bernasconi, M., Kain, R., Rajotte, D., Krajewski, S., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, 99: 1527-1531, 2002.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F., and Youle, R. J. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.*, 22: 4385-4399, 2003.
- Ashkenazi, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19: 325-331, 2008.
- Asoh, S., Mori, T., Hayashi, J., and Ohta, S. Expression of the apoptosis-mediator Fas is enhanced by dysfunctional mitochondria 93. *J.Biochem.*, 120: 600-607, 1996.
- Bailly, C. Lamellarins, from A to Z: a family of anticancer marine pyrrole alkaloids. *Curr.Med.Chem.Anticancer Agents.*, 4: 363-378, 2004.
- Bailly, C. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochem.Pharmacol.*, 77: 1447-1457, 2009.

- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J., and Molkentin, J. D. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.*, 434: 658-662, 2005.
- Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R., and Vogelstein, B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science.*, 244: 217-221, 1989.
- Bakkenist, C. J. and Kastan, M. B. Phosphatases join kinases in DNA-damage response pathways. *Trends Cell Biol.*, 14: 339-341, 2004.
- Banath, J. P. and Olive, P. L. Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, 63: 4347-4350, 2003.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.*, 281: 1674-1677, 1998.
- Baptiste-Okoh, N., Barsotti, A. M., and Prives, C. A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 105: 1937-1942, 2008.
- Barath, P., Luciakova, K., Hodny, Z., Li, R., and Nelson, B. D. The growth-dependent expression of the adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) gene is regulated at the level of transcription and is a marker of cell proliferation. *Exp.Cell Res.*, 248: 583-588, 1999.
- Barila, D., Rufini, A., Condo, I., Ventura, N., Dorey, K., Superti-Furga, G., and Testi, R. Caspase-dependent cleavage of c-Abl contributes to apoptosis. *Mol.Cell Biol.*, 23: 2790-2799, 2003.
- Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J. N., Ried, T., Tagle, D., and Wynshaw-Boris, A. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell.*, 86: 159-171, 1996.
- Bartling, B., Lewensohn, R., and Zhivotovsky, B. Endogenously released Smac is insufficient to mediate cell death of human lung carcinoma in response to etoposide. *Exp.Cell Res.*, 298: 83-95, 2004.
- Baunbaek, D., Trinkler, N., Ferandin, Y., Lozach, O., Ploypradith, P., Rucirawat, S., Ishibashi, F., Iwao, M., and Meijer, L. Anticancer alkaloid lamellarins inhibit protein kinases. *Mar.Drugs.*, 6: 514-527, 2008.
- Beinlich, A., Strohmeier, R., Kaufmann, M., and Kuhl, H. Relation of cell proliferation to expression of peripheral benzodiazepine receptors in human breast cancer cell lines 69. *Biochem.Pharmacol.*, 60: 397-402, 2000.
- Belzacq, A. S., El Hamel, C., Vieira, H. L., Cohen, I., Haouzi, D., Metivier, D., Marchetti, P., Brenner, C., and Kroemer, G. Adenine nucleotide translocator mediates the mitochondrial membrane permeabilization induced by lonidamine, arsenite and CD437. *Oncogene.*, 20: 7579-7587, 2001.
- Benjamin, C. L. and Ananthaswamy, H. N. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 224: 241-248, 2007.
- Benz, C. C., Keniry, M. A., Ford, J. M., Townsend, A. J., Cox, F. W., Palayoor, S., Matlin, S. A., Hait, W. N., and Cowan, K. H. Biochemical correlates of the antitumor and antimitochondrial properties of gossypol enantiomers. *Mol.Pharmacol.*, 37: 840-847, 1990.
- Beresford, P. J., Zhang, D., Oh, D. Y., Fan, Z., Greer, E. L., Russo, M. L., Jaju, M., and Lieberman, J. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J.Biol.Chem.*, 276: 43285-43293, 2001.
- Bergamaschi, D., Samuels, Y., Jin, B., Duraisingham, S., Crook, T., and Lu, X. ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol.Cell Biol.*, 24: 1341-1350, 2004.

- Bernardi, P. and Azzone, G. F. Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J.Biol.Chem.*, 256: 7187-7192, 1981.
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Di Lisa, F., and Forte, M. A. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J.*, 273: 2077-2099, 2006.
- Bertram, J. S. The molecular biology of cancer. *Mol.Aspects Med.*, 21: 167-223, 2000.
- Bilyy, R., Kit, Y., Hellman, U., and Stoika, R. AMID: new insights on its intracellular localization and expression at apoptosis. *Apoptosis.*, 13: 729-732, 2008.
- Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., and Woods, C. M. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.*, 55: 2325-2333, 1995.
- Bond, G. L., Hu, W., Bond, E. E., Robins, H., Lutzker, S. G., Arva, N. C., Bargonetti, J., Bartel, F., Taubert, H., Wuerl, P., Onel, K., Yip, L., Hwang, S. J., Strong, L. C., Lozano, G., and Levine, A. J. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell.*, 119: 591-602, 2004.
- Bonner, W. M., Redon, C. E., Dickey, J. S., Nakamura, A. J., Sedelnikova, O. A., Solier, S., and Pommier, Y. GammaH2AX and cancer. *Nat.Rev.Cancer.*, 8: 957-967, 2008.
- Bourdon, J. C., Renzing, J., Robertson, P. L., Fernandes, K. N., and Lane, D. P. Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane. *J.Cell Biol.*, 158: 235-246, 2002.
- Bourguet-Kondracki, M. L. and Kornprobst, J. M. Marine pharmacology: potentialities in the treatment of infectious diseases, osteoporosis and Alzheimer's disease. *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.*, 97:105-31.: 105-131, 2005.
- Bratton, S. B., Lewis, J., Butterworth, M., Duckett, C. S., and Cohen, G. M. XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death.Differ.*, 9: 881-892, 2002.
- Brenner, C. and Kroemer, G. Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science.*, 289: 1150-1151, 2000.
- Brown, D., Yu, B. D., Joza, N., Benit, P., Meneses, J., Firpo, M., Rustin, P., Penninger, J. M., and Martin, G. R. Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, 103: 9918-9923, 2006.
- Burden, D. A. and Osheroff, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1400: 139-154, 1998.
- Caelles, C., Helmborg, A., and Karin, M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature.*, 370: 220-223, 1994.
- Camerini, D., Walz, G., Loenen, W. A., Borst, J., and Seed, B. The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J.Immunol.*, 147: 3165-3169, 1991.
- Campas, C., Cosialls, A. M., Barragan, M., Iglesias-Serret, D., Santidrian, A. F., Coll-Mulet, L., de Frias, M., Domingo, A., Pons, G., and Gil, J. Bcl-2 inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp.Hematol.*, 34: 1663-1669, 2006.
- Cande, C., Cecconi, F., Dessen, P., and Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J.Cell Sci.*, 115: 4727-4734, 2002.
- Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie.*, 84: 215-222, 2002.

- Cande, C., Vahsen, N., Metivier, D., Tourriere, H., Chebli, K., Garrido, C., Tazi, J., and Kroemer, G. Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. *J.Cell Sci.*, *117*: 4461-4468, 2004.
- Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R. T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J. M., and Kroemer, G. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene.*, *23*: 1514-1521, 2004.
- Cande, C., Vahsen, N., Garrido, C., and Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ.*, *11*: 591-595, 2004.
- Carre, M., Carles, G., Andre, N., Douillard, S., Ciccolini, J., Briand, C., and Braguer, D. Involvement of microtubules and mitochondria in the antagonism of arsenic trioxide on paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem.Pharmacol.*, *63*: 1831-1842, 2002.
- Carter, N. J. and Keam, S. J. Trabectedin : a review of its use in the management of soft tissue sarcoma and ovarian cancer. *Drugs.*, *67*: 2257-2276, 2007.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Valent, A., Raslova, H., Yakushijin, K., Horne, D., Feunteun, J., Lenoir, G., Medema, R., Vainchenker, W., and Kroemer, G. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene.*, *23*: 4362-4370, 2004.
- Ceruti, S., Mazzola, A., and Abbracchio, M. P. Resistance of human astrocytoma cells to apoptosis induced by mitochondria-damaging agents: possible implications for anticancer therapy . *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, *314*: 825-837, 2005.
- Chahboune, N., Barrachina, I., Royo, I., Romero, V., Saez, J., Tormo, J. R., De Pedro, N., Estornell, E., Zafra-Polo, M. C., Pelaez, F., and Cortes, D. Guanacetonins, new antitumoral acetogenins, mitochondrial complex I and tumor cell growth inhibitors. *Bioorg.Med.Chem.*, *14*: 1089-1094, 2006
- Chan, D. W., Chen, B. P., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M. D., Qin, J., and Chen, D. J. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.*, *16*: 2333-2338, 2002.
- Chan, S. L., Lee, M. C., Tan, K. O., Yang, L. K., Lee, A. S., Flotow, H., Fu, N. Y., Butler, M. S., Soejarto, D. D., Buss, A. D., and Yu, V. C. Identification of chelerythrine as an inhibitor of BclXL function. *J.Biol.Chem.*, *278*: 20453-20456, 2003.
- Chandra, D. and Tang, D. G. Mitochondrially localized active caspase-9 and caspase-3 result mostly from translocation from the cytosol and partly from caspase-mediated activation in the organelle. Lack of evidence for Apaf-1-mediated procaspase-9 activation in the mitochondria. *J.Biol.Chem.*, *278*: 17408-17420, 2003.
- Chang, B. D., Swift, M. E., Shen, M., Fang, J., Broude, E. V., and Roninson, I. B. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, *99*: 389-394, 2002.
- Chang, H. Y. and Yang, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, *64*: 821-846, 2000.
- Chao, C., Saito, S., Kang, J., Anderson, C. W., Appella, E., and Xu, Y. p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO J.*, *19*: 4967-4975, 2000.
- Chao, D. T. and Korsmeyer, S. J. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu.Rev.Immunol.*, *16*:395-419: 395-419, 1998.
- Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., and Hood, L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity.*, *7*: 821-830, 1997.
- Chen, C., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., and Motoyama, N. Chk2 regulates transcription-independent p53-mediated apoptosis in response to DNA damage. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *333*: 427-431, 2005.

- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J. C., and Gottlieb, R. A. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J.Biol.Chem.*, 276: 30724-30728, 2001.
- Chen, X., Zheng, Y., Zhu, J., Jiang, J., and Wang, J. p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53, and p73. *Oncogene.*, 20: 769-774, 2001.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J., and Gibson, S. B. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J.Cell Sci.*, 120: 4155-4166, 2007.
- Chen, Z., Naito, M., Hori, S., Mashima, T., Yamori, T., and Tsuruo, T. A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 264: 847-854, 1999.
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S. J. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol.Cell.*, 8: 705-711, 2001.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Yu, G. L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, D. R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., and Dixit, V. M. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science.*, 274: 990-992, 1996.
- Chinnaiyan, A. M., Chaudhary, D., O'Rourke, K., Koonin, E. V., and Dixit, V. M. Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature.*, 388: 728-729, 1997.
- Chipuk, J. E. and Green, D. R. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.*, 13: 994-1002, 2006.
- Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., and Green, D. R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.*, 13: 1396-1402, 2006.
- Chipuk, J. E. and Green, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.*, 18: 157-164, 2008.
- Choi, W. S., Lee, E. H., Chung, C. W., Jung, Y. K., Jin, B. K., Kim, S. U., Oh, T. H., Saido, T. C., and Oh, Y. J. Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *J.Neurochem.*, 77: 1531-1541, 2001.
- Cleary, J., Johnson, K. M., Pipari, A. W., Jr., and Glick, G. D. Inhibition of the mitochondrial F1F0-ATPase by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 17: 1667-1670, 2007.
- Collis, S. J., DeWeese, T. L., Jeggo, P. A., and Parker, A. R. The life and death of DNA-PK. *Oncogene.*, 24: 949-961, 2005.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S. J. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science.*, 286: 1162-1166, 1999.
- Costantini, P., Belzacq, A. S., Vieira, H. L., Larochette, N., de Pablo, M. A., Zamzami, N., Susin, S. A., Brenner, C., and Kroemer, G. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene.*, 19: 307-314, 2000.
- Cotter, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat.Rev.Cancer.*, 9: 501-507, 2009.
- Coultas, L. and Strasser, A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin.Cancer Biol.*, 13: 115-123, 2003.
- Cregan, S. P., Fortin, A., MacLaurin, J. G., Callaghan, S. M., Cecconi, F., Yu, S. W., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Park, D. S., Kroemer, G., and Slack, R. S. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J.Cell Biol.*, 158: 507-517, 2002.
- Cregan, S. P., Dawson, V. L., and Slack, R. S. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.*, 23: 2785-2796, 2004.

- Crompton, M. and Costi, A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *Eur.J.Biochem.*, 178: 489-501, 1988.
- D'Amelio, M., Tino, E., and Cecconi, F. The apoptosome: emerging insights and new potential targets for drug design. *Pharm.Res.*, 25: 740-751, 2008.
- Danial, N. N. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin.Cancer Res.*, 13: 7254-7263, 2007.
- Daniel, D., Yang, B., Lawrence, D. A., Totpal, K., Balter, I., Lee, W. P., Gogineni, A., Cole, M. J., Yee, S. F., Ross, S., and Ashkenazi, A. Cooperation of the proapoptotic receptor agonist rhApo2L/TRAIL with the CD20 antibody rituximab against non-Hodgkin lymphoma xenografts. *Blood.*, 110: 4037-4046, 2007.
- Daniel, K. G., Anderson, J. S., Zhong, Q., Kazi, A., Gupta, P., and Dou, Q. P. Association of mitochondrial calpain activation with increased expression and autolysis of calpain small subunit in an early stage of apoptosis. *Int.J.Mol.Med.*, 12: 247-252, 2003.
- Debska, G., Kicinska, A., Dobrucki, J., Dworakowska, B., Nurowska, E., Skalska, J., Dolowy, K., and Szewczyk, A. Large-conductance K⁺ channel openers NS1619 and NS004 as inhibitors of mitochondrial function in glioma cells. *Biochem.Pharmacol.*, 65: 1827-1834, 2003.
- Decaudin, D., Marzo, I., Brenner, C., and Kroemer, G. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy (review). *Int.J.Oncol.*, 12: 141-152, 1998.
- Decaudin, D., Castedo, M., Nemati, F., Beurdeley-Thomas, A., De Pinieux, G., Caron, A., Pouillart, P., Wijdenes, J., Rouillard, D., Kroemer, G., and Poupon, M. F. Peripheral benzodiazepine receptor ligands reverse apoptosis resistance of cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 62: 1388-1393, 2002.
- Decaudin, D. Peripheral benzodiazepine receptor and its clinical targeting. *Anticancer Drugs.*, 15: 737-745, 2004.
- de Graaf, A. O., van Krieken, J. H., Tonnissen, E., Wissink, W., van de, L. L., Overes, I., Dolstra, H., de Witte, T., van der Reijden, B. A., and Jansen, J. H. Expression of C-IAP1, C-IAP2 and SURVIVIN discriminates different types of lymphoid malignancies. *Br.J.Haematol.*, 130: 852-859, 2005.
- De Maria, R., Lenti, L., Malisan, F., d'Agostino, F., Tomassini, B., Zeuner, A., Rippo, M. R., and Testi, R. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science.*, 277: 1652-1655, 1997.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell.*, 82: 675-684, 1995.
- Denning, M. F., Wang, Y., Nickoloff, B. J., and Wrone-Smith, T. Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J.Biol.Chem.*, 273: 29995-30002, 1998.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.*, 17: 2215-2223, 1998.
- Deyoung, M. P. and Ellisen, L. W. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene.*, 26: 5169-5183, 2007.
- Diallo, J. S., Aldejmah, A., Mouhim, A. F., Peant, B., Fahmy, M. A., Koumakpayi, I. H., Sircar, K., Begin, L. R., Mes-Masson, A. M., and Saad, F. NOXA and PUMA expression add to clinical markers in predicting biochemical recurrence of prostate cancer patients in a survival tree model. *Clin.Cancer Res.*, 13: 7044-7052, 2007.
- Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J. M., Hossfeld, D. K., Wolf-Peters, C., Hagemeyer, A., Van den, B. H., and Marynen, P. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q

gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood.*, *93*: 3601-3609, 1999.

Don, A. S., Kisker, O., Dilda, P., Donoghue, N., Zhao, X., Decollogne, S., Creighton, B., Flynn, E., Folkman, J., and Hogg, P. J. A peptide trivalent arsenical inhibits tumor angiogenesis by perturbing mitochondrial function in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell.*, *3*: 497-509, 2003.

Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.*, *19*;356: 215-221, 1992.

Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S. J., Jackson, S. P., and Cote, J. Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol.Cell.*, *16*: 979-990, 2004.

Droga-Mazovec, G., Bojic, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., Salvesen, G. S., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J.Biol.Chem.*, *283*: 19140-19150, 2008.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.*, *102*: 33-42, 2000.

Duan, H. and Dixit, V. M. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature.*, *385*: 86-89, 1997.

Dubreux-Daloz, L., Dupoux, A., and Cartier, J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle.*, *7*: 1036-1046, 2008.

Durkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B., and Stein, H. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell.*, *68*: 421-427, 1992.

Durocher, D. and Jackson, S. P. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr.Opin.Cell Biol.*, *13*: 225-231, 2001.

Eccles, S. A. Monoclonal antibodies targeting cancer: 'magic bullets' or just the trigger? *Breast Cancer Res.*, *3*: 86-90, 2001.

Egle, A., Harris, A. W., Bouillet, P., and Cory, S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, *20*;101: 6164-6169, 2004.

Eischen, C. M., Roussel, M. F., Korsmeyer, S. J., and Cleveland, J. L. Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis. *Mol.Cell Biol.*, *21*: 7653-7662, 2001.

Ekedahl, J., Joseph, B., Grigoriev, M. Y., Muller, M., Magnusson, C., Lewensohn, R., and Zhivotovsky, B. Expression of inhibitor of apoptosis proteins in small- and non-small-cell lung carcinoma cells. *Exp.Cell Res.*, *279*: 277-290, 2002.

Elices M, Grant W, Lubner-Narod J, Guillen M.J, Fernandez-Sousa J.M, Cuevas C, & al. Lamellarins, novel marine compounds showing efficacy in a panel of human tumor xenografts. *Am. Assoc Cancer Res.* 2005, poster 645.

Ellerby, H. M., Arap, W., Ellerby, L. M., Kain, R., Andrusiak, R., Rio, G. D., Krajewski, S., Lombardo, C. R., Rao, R., Ruoslahti, E., Bredesen, D. E., and Pasqualini, R. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat.Med.*, *5*: 1032-1038, 1999.

Elrod, H. A. and Sun, S. Y. Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents. *Cancer Biol.Ther.*, *7*: 163-173, 2008.

- Emi, M., Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., and Toge, T. Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.*, 7: R940-R952, 2005.
- Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W. W., Kamen, R., Weichselbaum, R., and . Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.*, 14: 6148-6156, 1995.
- Engel, R. H. and Evens, A. M. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci.*, 11:300-12.: 300-312, 2006.
- Enoksson, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Bu, P., Kropotov, A., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J.Biol.Chem.*, 279: 49575-49578, 2004.
- Erenpreisa, J. and Cragg, M. S. Cancer: a matter of life cycle? *Cell Biol.Int.*, 31: 1507-1510, 2007.
- Erster, S., Mihara, M., Kim, R. H., Petrenko, O., and Moll, U. M. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol.Cell Biol.*, 24: 6728-6741, 2004.
- Esposti, M. D., Cristea, I. M., Gaskell, S. J., Nakao, Y., and Dive, C. Proapoptotic Bid binds to monolysocardiolipin, a new molecular connection between mitochondrial membranes and cell death. *Cell Death Differ.*, 10: 1300-1309, 2003.
- Facompre, M., Tardy, C., Bal-Mahieu, C., Colson, P., Perez, C., Manzanares, I., Cuevas, C., and Bailly, C. Lamellarin D: a novel potent inhibitor of topoisomerase I. *Cancer Res.*, 63: 7392-7399, 2003.
- Faleiro, L. and Lazebnik, Y. Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J.Cell Biol.*, 151: 951-959, 2000.
- Fanale, M. A. and Younes, A. Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Drugs.*, 67: 333-350, 2007.
- Fandy, T. E., Shankar, S., and Srivastava, R. K. Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells. *Mol.Cancer.*, 7:60.: 60, 2008.
- Fannjiang, Y., Cheng, W. C., Lee, S. J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J. M., Hill, R. B., Basanez, G., and Hardwick, J. M. Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev.*, 18: 2785-2797, 2004.
- Fantin, V. R., Berardi, M. J., Scorrano, L., Korsmeyer, S. J., and Leder, P. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer Cell.*, 2: 29-42, 2002.
- Fantin, V. R. and Leder, P. F16, a mitochondriotoxic compound, triggers apoptosis or necrosis depending on the genetic background of the target carcinoma cell. *Cancer Res.*, 64: 329-336, 2004.
- Fantin, V. R., Berardi, M. J., Babbe, H., Michelman, M. V., Manning, C. M., and Leder, P. A bifunctional targeted peptide that blocks HER-2 tyrosine kinase and disables mitochondrial function in HER-2-positive carcinoma cells. *Cancer Res.*, 65: 6891-6900, 2005.
- Fearon, E. R. and Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.*, 61: 759-767, 1990.
- Ferri, K. F. and Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat.Cell Biol.*,3: E255-E263, 2001.
- Flinterman, M., Guelen, L., Ezzati-Nik, S., Killick, R., Melino, G., Tominaga, K., Mymryk, J. S., Gaken, J., and Tavassoli, M. E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 280: 5945-5959, 2005.

- Flores, E. R., Tsai, K. Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. p53 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature.*, 416: 560-564, 2002.
- Fornier, M. N. Ixabepilone, first in a new class of antineoplastic agents: the natural epothilones and their analogues. *Clin.Breast Cancer.*, 7: 757-763, 2007.
- Fournier, N., Ducet, G., and Crevat, A. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *Bioenerg.Biomembr.*, 19: 297-303, 1987.
- Fujimoto, A., Takeuchi, H., Taback, B., Hsueh, E. C., Elashoff, D., Morton, D. L., and Hoon, D. S. Allelic imbalance of 12q22-23 associated with APAF-1 locus correlates with poor disease outcome in cutaneous melanoma. *Cancer Res.*, 64: 2245-2250, 2004.
- Fulda, S., Kufer, M. U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B., and Debatin, K. M. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene.*, 20: 5865-5877, 2001.
- Fulda, S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. *Mol.Nutr.Food Res.*, 53: 140-146, 2009.
- Gallego, M. A., Joseph, B., Hemstrom, T. H., Tamiji, S., Mortier, L., Kroemer, G., Formstecher, P., Zhivotovsky, B., and Marchetti, P. Apoptosis-inducing factor determines the chemoresistance of non-small-cell lung carcinomas. *Oncogene.*, 19;23: 6282-6291, 2004.
- Galluzzi, L., Joza, N., Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Hengartner, M., Abrams, J. M., Tavernarakis, N., Penninger, J., Madeo, F., and Kroemer, G. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ.*, 15: 1113-1123, 2008.
- Galvan, V., Kurakin, A. V., and Bredesen, D. E. Interaction of checkpoint kinase 1 and the X-linked inhibitor of apoptosis during mitosis. *FEBS Lett.*, 558: 57-62, 2004.
- Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Sun, X., and Schindler, P. A. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J.Biol.Chem.*, 271: 8796-8799, 1996.
- Geisbrecht, E. R. and Montell, D. J. A role for Drosophila IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell.*, 118: 111-125, 2004.
- Gennari, R., Menard, S., Fagnoni, F., Ponchio, L., Scelsi, M., Tagliabue, E., Castiglioni, F., Villani, L., Magalotti, C., Gibelli, N., Oliviero, B., Ballardini, B., Da Prada, G., Zambelli, A., and Costa, A. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin.Cancer Res.*, 10: 5650-5655, 2004.
- Giraud, S., Bonod-Bidaud, C., Wesolowski-Louvel, M., and Stepien, G. Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria. *J.Mol.Biol.*, 281: 409-418, 1998.
- Goldberg, Z., Vogt, S. R., Berger, M., Zwang, Y., Perets, R., Van Etten, R. A., Oren, M., Taya, Y., and Haupt, Y. Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J.*, 21: 3715-3727, 2002.
- Goldin, N., Arzoine, L., Heyfets, A., Israelson, A., Zaslavsky, Z., Bravman, T., Bronner, V., Notcovich, A., Shoshan-Barmatz, V., and Flescher, E. Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase. *Oncogene.*, 27: 4636-4643, 2008.
- Gong, J. G., Costanzo, A., Yang, H. Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Jr., Levrero, M., and Wang, J. Y. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature.*, 399: 806-809, 1999.
- Gonzalez-Polo, R. A., Carvalho, G., Braun, T., Decaudin, D., Fabre, C., Larochette, N., Perfettini, J. L., Djavaheri-Mergny, M., Youlyouz-Marfak, I., Codogno, P., Raphael, M., Feuillard, J., and Kroemer, G. PK11195

- potently sensitizes to apoptosis induction independently from the peripheral benzodiazepin receptor. *Oncogene.*, *24*: 7503-7513, 2005.
- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C., and Perez, J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol.Pharmacol.*, *59*: 657-663, 2001.
- Gonzalvez, F., Bessoule, J. J., Rocchiccioli, F., Manon, S., and Petit, P. X. Role of cardiolipin on tBid and tBid/Bax synergistic effects on yeast mitochondria. *Cell Death Differ.*, *12*: 659-667, 2005.
- Gonzalvez, F., Pariselli, F., Dupaigne, P., Budihardjo, I., Lutter, M., Antonsson, B., Dioloz, P., Manon, S., Martinou, J. C., Gubern, M., Wang, X., Bernard, S., and Petit, P. X. tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ.*, *12*: 614-626, 2005.
- Gorczyca, W., Bigman, K., Mittelman, A., Ahmed, T., Gong, J., Melamed, M. R., and Darzynkiewicz, Z. Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia.*, *7*: 659-670, 1993.
- Goto, H., Takahashi, H., Fujii, H., Ikuta, K., and Yokota, S. N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) induces leukemia cell death via generation of reactive oxygen species. *Int.J.Hematol.*, *78*: 219-225, 2003.
- Gouaze, V., Mirault, M. E., Carpentier, S., Salvayre, R., Levade, T., and Andrieu-Abadie, N. Glutathione peroxidase-1 overexpression prevents ceramide production and partially inhibits apoptosis in doxorubicin-treated human breast carcinoma cells. *Mol.Pharmacol.*, *60*: 488-496, 2001.
- Green, D. R. and Amarante-Mendes, G. P. The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. *Results Probl.Cell Differ.*, *24:45-61*: 45-61, 1998.
- Green, D. R. and Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.*, *305*: 626-629, 2004.
- Gressner, O., Schilling, T., Lorenz, K., Schulze, S. E., Koch, A., Schulze-Bergkamen, H., Lena, A. M., Candi, E., Terrinoni, A., Catani, M. V., Oren, M., Melino, G., Krammer, P. H., Stremmel, W., and Muller, M. TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.*, *24*: 2458-2471, 2005.
- Grunhagen, D. J., de Wilt, J. H., van Geel, A. N., and Eggermont, A. M. Isolated limb perfusion for melanoma patients-a review of its indications and the role of tumour necrosis factor-alpha. *Eur.J.Surg.Oncol.*, *32*: 371-380, 2006.
- Guo, P., Ma, J., Li, S., Guo, Z., Adams, A. L., and Gallo, J. M. Targeted delivery of a peripheral benzodiazepine receptor ligand-gemcitabine conjugate to brain tumors in a xenograft model. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, *48*: 169-176, 2001.
- Gupta, S., Kass, G. E., Szegezdi, E., and Joseph, B. The mitochondrial death pathway: A promising therapeutic target in Diseases. *J.Cell Mol.Med.*, 2009.
- Halicka, H. D., Seiter, K., Feldman, E. J., Traganos, F., Mittelman, A., Ahmed, T., and Darzynkiewicz, Z. Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukaemias. *Apoptosis.*, *2*: 25-39, 1997.
- Hammarsten, O., DeFazio, L. G., and Chu, G. Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends. *J.Biol.Chem.*, *275*: 1541-1550, 2000.
- Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J. W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E. A., Balan, K. V., Pantazis, P., and Wyche, J. H. Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J.Biol.Chem.*, *277*: 17154-17160, 2002.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell.*, *100*: 57-70, 2000.

- Haridas, V., Li, X., Mizumachi, T., Higuchi, M., Lemeshko, V. V., Colombini, M., and Gutterman, J. U. Avicins, a novel plant-derived metabolite lowers energy metabolism in tumor cells by targeting the outer mitochondrial membrane. *Mitochondrion*, 7: 234-240, 2007.
- Hattangadi, D. K., DeMasters, G. A., Walker, T. D., Jones, K. R., Di, X., Newsham, I. F., and Gewirtz, D. A. Influence of p53 and caspase 3 activity on cell death and senescence in response to methotrexate in the breast tumor cell. *Biochem.Pharmacol.*, 68: 1699-1708, 2004.
- Hawkins, D. S., Demers, G. W., and Galloway, D. A. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res.*, 56: 892-898, 1996.
- Haworth, R. A. and Hunter, D. R. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch.Biochem.Biophys.*, 195: 460-467, 1979.
- Heerdt, B. G., Houston, M. A., Wilson, A. J., and Augenlicht, L. H. The intrinsic mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) is associated with steady-state mitochondrial activity and the extent to which colonic epithelial cells undergo butyrate-mediated growth arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 63: 6311-6319, 2003.
- Heerdt, B. G., Houston, M. A., and Augenlicht, L. H. The intrinsic mitochondrial membrane potential of colonic carcinoma cells is linked to the probability of tumor progression. *Cancer Res.*, 65: 9861-9867, 2005.
- Heinrich, M., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Sandberg, C., Gahr, J., Schwandner, R., Weber, T., Saftig, P., Peters, C., Brunner, J., Kronke, M., and Schutze, S. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J.*, 18: 5252-5263, 1999.
- Helton, E. S., Zhang, J., and Chen, X. The proline-rich domain in p63 is necessary for the transcriptional and apoptosis-inducing activities of TAp63. *Oncogene*, 27: 2843-2850, 2008.
- Hemstrom, T. H., Sandstrom, M., and Zhiotovskiy, B. Inhibitors of the PI3-kinase/Akt pathway induce mitotic catastrophe in non-small cell lung cancer cells. *Int.J.Cancer.*, 119: 1028-1038, 2006.
- Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R. The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 345: 243-246, 1994.
- Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 4: 581-586, 1994.
- Hirsch, T., Dallaporta, B., Zamzami, N., Susin, S. A., Ravagnan, L., Marzo, I., Brenner, C., and Kroemer, G. Proteasome activation occurs at an early, premitochondrial step of thymocyte apoptosis. *J.Immunol.*, 161: 35-40, 1998.
- Hirsch, T., Decaudin, D., Susin, S. A., Marchetti, P., Larochette, N., Resche-Rigon, M., and Kroemer, G. PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp.Cell Res.*, 241: 426-434, 1998.
- Hitoshi, Y., Lorens, J., Kitada, S. I., Fisher, J., LaBarge, M., Ring, H. Z., Francke, U., Reed, J. C., Kinoshita, S., and Nolan, G. P. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity*, 8: 461-471, 1998.
- Holcik, M., Yeh, C., Korneluk, R. G., and Chow, T. Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene*, 19: 4174-4177, 2000.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat.Immunol.*, 1: 489-495, 2000.
- Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P., and Tschopp, J. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol.Cell Biol.*, 23: 1428-1440, 2003.

- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., and Harris, C. C. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.*, 22: 3551-3555, 1994.
- Holmuhamedov, E., Lewis, L., Bienengraeber, M., Holmuhamedova, M., Jahangir, A., and Terzic, A. Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting. *FASEB J.*, 16: 1010-1016, 2002
- Horvitz, H. R., Shaham, S., and Hengartner, M. O. The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 59:377-85.: 377-385, 1994.
- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.*, 19:81: 495-504, 1995.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V., and Goeddel, D. V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.*, 4: 387-396, 1996.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., and Goeddel, D. V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.*, 84: 299-308, 1996.
- Huang, S. and Sinicrope, F. A. BH3 mimetic ABT-737 potentiates TRAIL-mediated apoptotic signaling by unsequestering Bim and Bak in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, 68: 2944-2951, 2008.
- Huang, Y., Yuan, Z. M., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kato, T., Kharbanda, S., and Kufe, D. W. Pro-apoptotic effect of the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Oncogene.*, 15: 1947-1952, 1997.
- Huh, J. R., Foe, I., Muro, I., Chen, C. H., Seol, J. H., Yoo, S. J., Guo, M., Park, J. M., and Hay, B. A. The *Drosophila* inhibitor of apoptosis (IAP) DIAP2 is dispensable for cell survival, required for the innate immune response to gram-negative bacterial infection, and can be negatively regulated by the reaper/hid/grim family of IAP-binding apoptosis inducers. *J. Biol. Chem.*, 19:282: 2056-2068, 2007.
- Hunter, D. R., Haworth, R. A., and Southard, J. H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 251: 5069-5077, 1976.
- Hunter, D. R. and Haworth, R. A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch. Biochem. Biophys.*, 195: 468-477, 1979.
- Hurley, P. J. and Bunz, F. ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle.*, 6: 414-417, 2007.
- Hylander, B. L., Pitoniak, R., Penetrante, R. B., Gibbs, J. F., Oktay, D., Cheng, J., and Repasky, E. A. The anti-tumor effect of Apo2L/TRAIL on patient pancreatic adenocarcinomas grown as xenografts in SCID mice. *J. Transl. Med.*, 19:3: 22, 2005.
- Ihrie, R. A., Marques, M. R., Nguyen, B. T., Horner, J. S., Papazoglu, C., Bronson, R. T., Mills, A. A., and Attardi, L. D. Perp is a p63-regulated gene essential for epithelial integrity. *Cell.*, 120: 843-856, 2005.
- Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K., and Yonehara, S. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature.*, 398: 777-785, 1999.
- Ishibashi, F., Tanabe, S., Oda, T., and Iwao, M. Synthesis and structure-activity relationship study of lamellarin derivatives. *J. Nat. Prod.*, 65: 500-504, 2002.
- Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y., and Nakagawara, A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene.*, 19: 617-623, 2000.

- Isobe, N., Onodera, H., Mori, A., Shimada, Y., Yang, W., Yasuda, S., Fujimoto, A., Ooe, H., Arai, S., Kitaichi, M., and Imamura, M. Caspase-3 expression in human gastric carcinoma and its clinical significance. *Oncology*, *66*: 201-209, 2004.
- Ito, H., Daido, S., Kanzawa, T., Kondo, S., and Kondo, Y. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *Int.J.Oncol.*, *26*: 1401-1410, 2005.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, *66*: 233-243, 1991.
- Jaattela, M. Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Ann.Med.*, *34*: 480-488, 2002.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T., and Weinberg, R. A. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr.Biol.*, *4*: 1-7, 1994.
- Jager, R., Herzer, U., Schenkel, J., and Weiher, H. Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene*, *15*: 1787-1795, 1997.
- Jansen, B., Schlagbauer-Wadl, H., Brown, B. D., Bryan, R. N., van Elsas, A., Muller, M., Wolff, K., Eichler, H. G., and Pehamberger, H. bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat.Med.*, *4*: 232-234, 1998.
- Janssens, S., Tinel, A., Lippens, S., and Tschopp, J. PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell*, *123*: 1079-1092, 2005.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C., Lukas, J., and Jackson, S. P. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat.Cell Biol.*, *8*: 37-45, 2006.
- Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K. H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J. N., McKinnon, P. J., Cleveland, J. L., and Zambetti, G. P. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, *4*: 321-328, 2003.
- Jing, Y., Dai, J., Chalmers-Redman, R. M., Tatton, W. G., and Waxman, S. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood*, *94*: 2102-2111, 1999.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C. R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*, *47*: 545-554, 1986.
- Johnson, D. E. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia*, *14*: 1695-1703, 2000.
- Johnson, L. V., Walsh, M. L., and Chen, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, *77*: 990-994, 1980.
- Johnson, L. V., Walsh, M. L., Bockus, B. J., and Chen, L. B. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J.Cell Biol.*, *88*: 526-535, 1981.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, *108*: 153-164, 2002.
- Jonges, L. E., Nagelkerke, J. F., Ensink, N. G., van der Velde, E. A., Tollenaar, R. A., Fleuren, G. J., van de Velde, C. J., Morreau, H., and Kuppen, P. J. Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Lab Invest.*, *81*: 681-688, 2001.
- Joseph, B., Ekedahl, J., Sirzen, F., Lewensohn, R., and Zhivotovsky, B. Differences in expression of pro-caspases in small cell and non-small cell lung carcinoma. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *262*: 381-387, 1999.

- Joseph, B., Ekedahl, J., Lewensohn, R., Marchetti, P., Formstecher, P., and Zhivotovsky, B. Defective caspase-3 relocalization in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene.*, *20*: 2877-2888, 2001.
- Joseph, B., Marchetti, P., Formstecher, P., Kroemer, G., Lewensohn, R., and Zhivotovsky, B. Mitochondrial dysfunction is an essential step for killing of non-small cell lung carcinomas resistant to conventional treatment. *Oncogene.*, *21*: 65-77, 2002.
- Joshi, A., Bondada, V., and Geddes, J. W. Mitochondrial micro-calpain is not involved in the processing of apoptosis-inducing factor. *Exp.Neurol.*, *218*: 221-227, 2009.
- Jourdain, A. and Martinou, J. C. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, *41*: 1884-1889, 2009.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G., and Penninger, J. M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.*, *410*: 549-554, 2001.
- Joza, N., Pospisilik, J. A., Hangen, E., Hanada, T., Modjtahedi, N., Penninger, J. M., and Kroemer, G. AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, *1171:2-11*: 2-11, 2009.
- Kamer, I., Sarig, R., Zaltsman, Y., Niv, H., Oberkovitz, G., Regev, L., Haimovich, G., Lerenthal, Y., Marcellus, R. C., and Gross, A. Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell.*, *122*: 593-603, 2005.
- Kang, H. T. and Hwang, E. S. 2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sci.*, *78*: 1392-1399, 2006.
- Kang, M. H., Kang, Y. H., Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Sheard, M. A., Harned, T. M., Lock, R. B., and Reynolds, C. P. Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 in vitro and in vivo. *Blood.*, *110*: 2057-2066, 2007.
- Kanzawa, T., Kondo, Y., Ito, H., Kondo, S., and Germano, I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.*, *63*: 2103-2108, 2003.
- Kanzawa, T., Germano, I. M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., and Kondo, S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.*, *11*: 448-457, 2004.
- Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I. M., Kondo, Y., and Kondo, S. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene.*, *24*: 980-991, 2005.
- Karbowski, M., Jeong, S. Y., and Youle, R. J. Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J.Cell Biol.*, *166*: 1027-1039, 2004.
- Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A., and Green, D. R. 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.*, *1*: 543-551, 1998.
- Katoh, I., Aisaki, K. I., Kurata, S. I., Ikawa, S., and Ikawa, Y. p51A (TAp63gamma), a p53 homolog, accumulates in response to DNA damage for cell regulation. *Oncogene.*, *19*: 3126-3130, 2000.
- Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp.Cell Res.*, *256*: 42-49, 2000.
- Kaufmann, T., Tai, L., Ekert, P. G., Huang, D. C., Norris, F., Lindemann, R. K., Johnstone, R. W., Dixit, V. M., and Strasser, A. The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest. *Cell.*, *20:129*: 423-433, 2007.

- Kaufmann, T., Gugasyan, R., Gerondakis, S., Dixit, V. M., and Strasser, A. Loss of the BH3-only protein Bid does not rescue RelA-deficient embryos from TNF-R1-mediated fatal hepatocyte destruction. *Cell Death Differ.*, *14*: 637-639, 2007.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer.*, *26*: 239-257, 1972.
- Kim, E. H., Sohn, S., Kwon, H. J., Kim, S. U., Kim, M. J., Lee, S. J., and Choi, K. S. Sodium selenite induces superoxide-mediated mitochondrial damage and subsequent autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res.*, *67*: 6314-6324, 2007.
- Kim, K. W., Hwang, M., Moretti, L., Jaboin, J. J., Cha, Y. I., and Lu, B. Autophagy upregulation by inhibitors of caspase-3 and mTOR enhances radiotherapy in a mouse model of lung cancer. *Autophagy.*, *4*: 659-668, 2008.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Toge, T. Preclinical evaluation of antisense bcl-2 as a chemosensitizer for patients with gastric carcinoma. *Cancer.*, *101*: 2177-2186, 2004.
- Kim, R., Emi, M., Matsuura, K., and Tanabe, K. Antisense and nonantisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy. *Cancer Gene Ther.*, *14*: 1-11, 2007.
- King, A., Selak, M. A., and Gottlieb, E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene.*, *25*: 4675-4682, 2006.
- Kitada, S., Leone, M., Sareth, S., Zhai, D., Reed, J. C., and Pellecchia, M. Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J.Med.Chem.*, *46*: 4259-4264, 2003.
- Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y. P., Goeddel, D. V., Giles, K. M., Pun, K. T., Grinham, C. J., Brown, R., and Farrow, S. N. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature.*, *384*: 372-375, 1996.
- Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., Seburn, K. L., Hurd, R. E., Frankel, W. N., Bronson, R. T., and Ackerman, S. L. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature.*, *419*: 367-374, 2002.
- Klein, L. E., Freeze, B. S., Smith, A. B., III, and Horwitz, S. B. The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence. *Cell Cycle.*, *4*: 501-507, 2005.
- Klopper, A., Hasenjager, A., Belka, C., Schulze-Osthoff, K., Dorken, B., and Daniel, P. T. Adenine deoxynucleotides fludarabine and cladribine induce apoptosis in a CD95/Fas receptor, FADD and caspase-8-independent manner by activation of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene.*, *23*: 9408-9418, 2004.
- Kluza, J., Gallego, M. A., Loyens, A., Beauvillain, J. C., Sousa-Faro, J. M., Cuevas, C., Marchetti, P., and Bailly, C. Cancer cell mitochondria are direct proapoptotic targets for the marine antitumor drug lamellarin D. *Cancer Res.*, *66*: 3177-3187, 2006.
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., MacGregor, G. R., and Wallace, D. C. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.*, *427*: 461-465, 2004.
- Kolluri, S. K., Zhu, X., Zhou, X., Lin, B., Chen, Y., Sun, K., Tian, X., Town, J., Cao, X., Lin, F., Zhai, D., Kitada, S., Luciano, F., O'Donnell, E., Cao, Y., He, F., Lin, J., Reed, J. C., Satterthwait, A. C., and Zhang, X. K. A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. *Cancer Cell.*, *14*: 285-298, 2008.
- Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultchi, A. I., and Tsujimoto, Y. Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell.*, *19*: 673-688, 2003.
- Konopleva, M., Watt, J., Contractor, R., Tsao, T., Harris, D., Estrov, Z., Bornmann, W., Kantarjian, H., Viallet, J., Samudio, I., and Andreeff, M. Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer Res.*, *68*: 3413-3420, 2008.

- Koomagi, R. and Volm, M. Relationship between the expression of caspase-3 and the clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.*, *20*: 493-496, 2000.
- Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., Grijalba, M. T., Bechara, E. J., and Vercesi, A. E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J.Biol.Chem.*, *271*: 2929-2934, 1996.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L., and Mignotte, B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, *9*: 1277-1287, 1995.
- Kroemer, G. and Martin, S. J. Caspase-independent cell death. *Nat.Med.*, *11*: 725-730, 2005.
- Kumar, A., Ta, D., Henderson, D., Mushinski, J. F., Reed, J. C., Kuus-Reichel, K., and Saedi, M. S. bcl2 and v-abl oncogenes cooperate to immortalize murine B cells that secrete antigen specific antibodies. *Immunol.Lett.*, *65*: 153-159, 1999.
- Kuranaga, E., Kanuka, H., Tonoki, A., Takemoto, K., Tomioka, T., Kobayashi, M., Hayashi, S., and Miura, M. Drosophila IKK-related kinase regulates nonapoptotic function of caspases via degradation of IAPs. *Cell.*, *126*: 583-596, 2006.
- Kuroda, J., Kimura, S., Andreeff, M., Ashihara, E., Kamitsuji, Y., Yokota, A., Kawata, E., Takeuchi, M., Tanaka, R., Murotani, Y., Matsumoto, Y., Tanaka, H., Strasser, A., Taniwaki, M., and Maekawa, T. ABT-737 is a useful component of combinatory chemotherapies for chronic myeloid leukaemias with diverse drug-resistance mechanisms. *Br.J.Haematol.*, *140*: 181-190, 2008.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell.*, *111*: 331-342, 2002.
- Kwon, B. S. and Weissman, S. M. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *86*: 1963-1967, 1989.
- Kyprianou, N., King, E. D., Bradbury, D., and Rhee, J. G. bcl-2 over-expression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells. *Int.J.Cancer.*, *70*: 341-348, 1997.
- Labi, V., Grespi, F., Baumgartner, F., and Villunger, A. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? *Cell Death Differ.*, *15*: 977-987, 2008.
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G. A., Jr., Booth, C. J., Mehal, W. Z., Inayat, I., and Flavell, R. A. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science.*, *311*: 847-851, 2006.
- Lang, G. A., Iwakuma, T., Suh, Y. A., Liu, G., Rao, V. A., Parant, J. M., Valentin-Vega, Y. A., Terzian, T., Caldwell, L. C., Strong, L. C., El Naggar, A. K., and Lozano, G. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell.*, *119*: 861-872, 2004.
- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., and Garrido, C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J.Cell Mol.Med.*, *12*: 743-761, 2008.
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., and Lazebnik, Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science.*, *297*: 1352-1354, 2002.
- Lavin, M. F. and Gueven, N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.*, *13*: 941-950, 2006.
- Lavrik, I. N., Golks, A., Baumann, S., and Krammer, P. H. Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood.*, *108*: 559-565, 2006.

Le Bras, M., Borgne-Sanchez, A., Touat, Z., El Dein, O. S., Deniaud, A., Maillier, E., Lecellier, G., Rebouillat, D., Lemaire, C., Kroemer, G., Jacotot, E., and Brenner, C. Chemosensitization by knockdown of adenine nucleotide translocase-2. *Cancer Res.*, *66*: 9143-9152, 2006.

Lee, F. Y., Borzilleri, R., Fairchild, C. R., Kamath, A., Smykla, R., Kramer, R., and Vite, G. Preclinical discovery of ixabepilone, a highly active antineoplastic agent. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, *63*: 157-166, 2008.

Lee, F. Y., Smykla, R., Johnston, K., Menard, K., McGlinchey, K., Peterson, R. W., Wiebesiek, A., Vite, G., Fairchild, C. R., and Kramer, R. Preclinical efficacy spectrum and pharmacokinetics of ixabepilone. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, *63*: 201-212, 2009.

Lee, H. W., Lee, S. S., Lee, S. J., and Um, H. D. Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Cancer Res.*, *63*: 1093-1100, 2003.

Lee, S. B., Tong, S. Y., Kim, J. J., Um, S. J., and Park, J. S. Caspase-independent autophagic cytotoxicity in etoposide-treated CaSki cervical carcinoma cells. *DNA Cell Biol.*, *26*: 713-720, 2007.

Leist, M. and Jaattela, M. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ.*, *8*: 324-326, 2001.

Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, C. A., Brenner, D. A., and Herman, B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim.Biophys.Acta.*, *1366*: 177-196, 1998.

Lemasters, J. J. The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another. *Cardiovasc.Res.*, *44*: 470-473, 1999.

Leonetti, C., Scarsella, M., Semple, S. C., Molinari, A., D'Angelo, C., Stoppacciaro, A., Biroccio, A., and Zupi, G. In vivo administration of liposomal vincristine sensitizes drug-resistant human solid tumors. *Int.J.Cancer.*, *110*: 767-774, 2004.

Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., and Korsmeyer, S. J. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell.*, *2*: 183-192, 2002.

Letai, A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J.Clin.Invest.*, *115*: 2648-2655, 2005.

Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., and George, D. L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat.Cell Biol.*, *6*: 443-450, 2004.

Leulier, F., Lhocine, N., Lemaitre, B., and Meier, P. The *Drosophila* inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist gram-negative bacterial infection. *Mol.Cell Biol.*, *26*: 7821-7831, 2006.

Li, J., Feng, Q., Kim, J. M., Schneiderman, D., Liston, P., Li, M., Vanderhyden, B., Faught, W., Fung, M. F., Senterman, M., Korneluk, R. G., and Tsang, B. K. Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology.*, *142*: 370-380, 2001.

Li, J. and Yuan, J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.*, *20*;27: 6194-6206, 2008.

Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.*, *412*: 95-99, 2001.

Li, R., Boehm, A. L., Miranda, M. B., Shangary, S., Grandis, J. R., and Johnson, D. E. Targeting antiapoptotic Bcl-2 family members with cell-permeable BH3 peptides induces apoptosis signaling and death in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Neoplasia.*, *9*: 801-811, 2007.

- Li, X., Gong, J., Feldman, E., Seiter, K., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. Apoptotic cell death during treatment of leukemias. *Leuk.Lymphoma.*, *13 Suppl 1:65-70.*: 65-70, 1994.
- Li, X. X., Davis, B., Haridas, V., Gutterman, J. U., and Colombini, M. Proapoptotic triterpene electrophiles (avicins) form channels in membranes: cholesterol dependence. *Biophys.J.*, *88*: 2577-2584, 2005.
- Li, Y., Raffo, A. J., Drew, L., Mao, Y., Tran, A., Petrylak, D. P., and Fine, R. L. Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine-143. *Cancer Res.*, *63*: 1527-1533, 2003.
- Li, Y., Rory, G. C., Sang, Y., Rosen, E. M., Lattera, J., and Xia, S. Camptothecin and Fas receptor agonists synergistically induce medulloblastoma cell death: ROS-dependent mechanisms. *Anticancer Drugs.*, *20*: 770-778, 2009.
- Liang, H. and Fesik, S. W. Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J.Mol.Biol.*, *274*: 291-302, 1997.
- Liang, Y., Lin, S. Y., Brunicardi, F. C., Goss, J., and Li, K. DNA damage response pathways in tumor suppression and cancer treatment. *World J.Surg.*, *33*: 661-666, 2009.
- Liedtke, M., Pandey, P., Kumar, S., Kharbanda, S., and Kufe, D. Regulation of Bcr-Abl-induced SAP kinase activity and transformation by the SHPTP1 protein tyrosine phosphatase. *Oncogene.*, *17*: 1889-1892, 1998.
- Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y. H., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C., and Zhang, X. K. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell.*, *20;116*: 527-540, 2004.
- Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B., and Levine, A. J. Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev.*, *8*: 1235-1246, 1994.
- Ling, Y. H., Liebes, L., Zou, Y., and Perez-Soler, R. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J.Biol.Chem.*, *278*: 33714-33723, 2003.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A., and Korneluk, R. G. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.*, *379*: 349-353, 1996.
- Liu, L., Xing, D., and Chen, W. R. mu-Calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Int.J.Cancer.*, 2009.
- Liu, T., Laurell, C., Selivanova, G., Lundeberg, J., Nilsson, P., and Wiman, K. G. Hypoxia induces p53-dependent transactivation and Fas/CD95-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.*, *14*: 411-421, 2007.
- Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., and Karin, M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.*, *87*: 565-576, 1996.
- Lock, R. B. and Stribinskiene, L. Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. *Cancer Res.*, *56*: 4006-4012, 1996.
- Loetscher, H., Schlaeger, E. J., Lahm, H. W., Pan, Y. C., Lesslauer, W., and Brockhaus, M. Purification and partial amino acid sequence analysis of two distinct tumor necrosis factor receptors from HL60 cells. *J.Biol.Chem.*, *265*: 20131-20138, 1990.
- Lord, S. J., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., and Bleackley, R. C. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol.Rev.*, *193:31-8.* : 31-38, 2003.
- Lu, Y. and Cederbaum, A. The mode of cisplatin-induced cell death in CYP2E1-overexpressing HepG2 cells: modulation by ERK, ROS, glutathione, and thioredoxin. *Free Radic.Biol.Med.*, *43*: 1061-1075, 2007.

- Luber-Narod J, Sousa-Faro J, Cuevas C, Aviles P, and Faircloth G. In vitro toxicology studies of Lamellarins M, D and K and 4 synthetic analogs. *Am Assoc Cancer Res* 2005.
- Ly, J. D., Grubb, D. R., and Lawen, A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis.*, 8: 115-128, 2003.
- Ma, W. W. and Jimeno, A. Temsirolimus. *Drugs Today (Barc.)*, 43: 659-669, 2007.
- Ma, W. W. and Adjei, A. A. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J.Clin.*, 59: 111-137, 2009.
- Maaser, K., Grabowski, P., Sutter, A. P., Hopfner, M., Foss, H. D., Stein, H., Berger, G., Gavish, M., Zeitz, M., and Scherubl, H. Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer. *Clin.Cancer Res.*, 8: 3205-3209, 2002.
- Maaser, K., Grabowski, P., Oezdem, Y., Krahn, A., Heine, B., Stein, H., Buhr, H., Zeitz, M., and Scherubl, H. Up-regulation of the peripheral benzodiazepine receptor during human colorectal carcinogenesis and tumor spread. *Clin.Cancer Res.*, 11: 1751-1756, 2005.
- Maaser, K., Sutter, A. P., and Scherubl, H. Mechanisms of mitochondrial apoptosis induced by peripheral benzodiazepine receptor ligands in human colorectal cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 332: 646-652, 2005.
- Machida, K., Hayashi, Y., and Osada, H. A novel adenine nucleotide translocase inhibitor, MT-21, induces cytochrome c release by a mitochondrial permeability transition-independent mechanism. *J.Biol.Chem.*, 277: 31243-31248, 2002.
- Madar, I., Ravert, H., Nelkin, B., Abro, M., Pomper, M., Dannals, R., and Frost, J. J. Characterization of membrane potential-dependent uptake of the novel PET tracer 18F-fluorobenzyl triphenylphosphonium cation. *Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging.*, 34: 2057-2065, 2007.
- Malaguarnera, L. Implications of apoptosis regulators in tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.*, 23: 367-387, 2004.
- Malladi, S., Challa-Malladi, M., Fearnhead, H. O., and Bratton, S. B. The Apaf-1*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *EMBO J.*, 28: 1916-1925, 2009.
- Mallett, S., Fossum, S., and Barclay, A. N. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *EMBO J.*, 9: 1063-1068, 1990.
- Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciola-Rosen, L. A., and Rosen, A. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J.Cell Biol.*, 140: 1485-1495, 1998.
- Mansouri, A., Haouzi, D., Descatoire, V., Demeilliers, C., Sutton, A., Vadrot, N., Fromenty, B., Feldmann, G., Pessayre, D., and Berson, A. Tacrine inhibits topoisomerases and DNA synthesis to cause mitochondrial DNA depletion and apoptosis in mouse liver. *Hepatology.*, 38: 715-725, 2003.
- Marchenko, N. D., Zaika, A., and Moll, U. M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J.Biol.Chem.*, 275: 16202-16212, 2000.
- Marchetti, P., Zamzami, N., Joseph, B., Schraen-Maschke, S., Mereau-Richard, C., Costantini, P., Metivier, D., Susin, S. A., Kroemer, G., and Formstecher, P. The novel retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid can trigger apoptosis through a mitochondrial pathway independent of the nucleus. *Cancer Res.*, 59: 6257-6266, 1999.
- Marchetti, P., Mortier, L., Beauvillain, V., and Formstecher, P. [Are mitochondria targets of anticancer drugs responsible for apoptosis?]. *Ann.Biol.Clin.(Paris)*, 60: 391-403, 2002.
- Marchetti, P. [Apoptosis: basic knowledge and applications]. *Gynecol.Obstet.Fertil.*, 33: 632-641, 2005.

- Marco, E., Laine, W., Tardy, C., Lansiaux, A., Iwao, M., Ishibashi, F., Bailly, C., and Gago, F. Molecular determinants of topoisomerase I poisoning by lamellarins: comparison with camptothecin and structure-activity relationships. *J.Med.Chem.*, 48: 3796-3807, 2005.
- Mariathasan, S. and Monack, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat.Rev.Immunol.*, 7: 31-40, 2007.
- Marks, A. J., Cooper, M. S., Anderson, R. J., Orchard, K. H., Hale, G., North, J. M., Ganeshaguru, K., Steele, A. J., Mehta, A. B., Lowdell, M. W., and Wickremasinghe, R. G. Selective apoptotic killing of malignant hemopoietic cells by antibody-targeted delivery of an amphipathic peptide. *Cancer Res.*, 65: 2373-2377, 2005.
- Marshall, K. R., Gong, M., Wodke, L., Lamb, J. H., Jones, D. J., Farmer, P. B., Scrutton, N. S., and Munro, A. W. The human apoptosis-inducing protein AMID is an oxidoreductase with a modified flavin cofactor and DNA binding activity. *J.Biol.Chem.*, 280: 30735-30740, 2005.
- Marston, N. J., Jenkins, J. R., and Vousden, K. H. Oligomerisation of full length p53 contributes to the interaction with mdm2 but not HPV E6. *Oncogene.*, 10: 1709-1715, 1995.
- Marzo, I., Brenner, C., and Kroemer, G. The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes. *Biomed.Pharmacother.*, 52: 248-251, 1998.
- Mathupala, S. P., Ko, Y. H., and Pedersen, P. L. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene.*, 25: 4777-4786, 2006.
- Matsuda, K., Yoshida, K., Taya, Y., Nakamura, K., Nakamura, Y., and Arakawa, H. p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Res.*, 62: 2883-2889, 2002.
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., III, Hurov, K. E., Luo, J., Bakalarski, C. E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S. P., and Elledge, S. J. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.*, 316: 1160-1166, 2007.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Abrams, S. L., Bertrand, F. E., Ludwig, D. E., Basecke, J., Libra, M., Stivala, F., Milella, M., Tafuri, A., Lunghi, P., Bonati, A., and Martelli, A. M. Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia.*, 22: 708-722, 2008.
- McDonnell, T. J. and Korsmeyer, S. J. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature.*, 349: 254-256, 1991.
- McKee, A. E. and Thiele, C. J. Targeting caspase 8 to reduce the formation of metastases in neuroblastoma. *Expert.Opin.Ther.Targets.*, 10: 703-708, 2006.
- McStay, G. P., Clarke, S. J., and Halestrap, A. P. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem.J.*, 367: 541-548, 2002.
- Medema, J. P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C. J., and Offringa, R. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J.Exp.Med.*, 190: 1033-1038, 1999.
- Meeran, S. M., Katiyar, S., and Katiyar, S. K. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 229: 33-43, 2008.
- Melino, G., De, L., V., and Vousden, K. H. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat.Rev.Cancer.*, 2: 605-615, 2002.
- Melino, G., Lu, X., Gasco, M., Crook, T., and Knight, R. A. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem.Sci.*, 28: 663-670, 2003.
- Melino, G. p73, the "assistant" guardian of the genome? *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1010:9-15.: 9-15, 2003.

- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W. X., Corazzari, M., Knight, R. A., Green, D. R., Thompson, C., and Vousden, K. H. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J.Biol.Chem.*, 279: 8076-8083, 2004.
- Meng, L. H., Liao, Z. Y., and Pommier, Y. Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer therapy. *Curr.Top.Med.Chem.*, 3: 305-320, 2003.
- Mesner, P. W., Jr., Budihardjo, I. I., and Kaufmann, S. H. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv.Pharmacol.*, 41:461-99.: 461-499, 1997.
- Metzstein, M. M., Stanfield, G. M., and Horvitz, H. R. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet.*, 14: 410-416, 1998.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol.Cell.*, 11: 577-590, 2003.
- Mihara, M. and Moll, U. M. Detection of mitochondrial localization of p53. *Methods Mol.Biol.*, 234:203-9.: 203-209, 2003.
- Min, J. J., Biswal, S., Deroose, C., and Gambhir, S. S. Tetraphenylphosphonium as a novel molecular probe for imaging tumors. *J.Nucl.Med.*, 45: 636-643, 2004.
- Miramar, M. D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L. M., Haouzi, D., Brothers, G., Penninger, J. M., Peleato, M. L., Kroemer, G., and Susin, S. A. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J.Biol.Chem.*, 276: 16391-16398, 2001.
- Miyajima, A., Nakashima, J., Yoshioka, K., Tachibana, M., Tazaki, H., and Murai, M. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br.J.Cancer.*, 76: 206-210, 1997.
- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Oikawa, S., Kojima, M., and Kawanishi, S. Mechanism of apoptosis induced by a new topoisomerase inhibitor through the generation of hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.*, 277: 30684-30689, 2002.
- Modica-Napolitano, J. S. and Aprille, J. R. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Adv.Drug Deliv.Rev.*, 49: 63-70, 2001.
- Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F., and Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol.*, 16: 264-272, 2006.
- Moffitt, K. L., Martin, S. L., and Walker, B. The emerging role of serine proteases in apoptosis. *Biochem.Soc.Trans.*, 35: 559-560, 2007.
- Moll, U. M. and Zaika, A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett.*, 493: 65-69, 2001.
- Moll, U. M. and Slade, N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol.Cancer Res.*, 2: 371-386, 2004.
- Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D., and Deppert, W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 17: 631-636, 2005.
- Moller, P., Koretz, K., Leithauser, F., Bruderlein, S., Henne, C., Quentmeier, A., and Kramer, P. H. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int.J.Cancer.*, 57: 371-377, 1994.
- Moon, H. S. and Yang, J. S. Role of HIV Vpr as a regulator of apoptosis and an effector on bystander cells. *Mol.Cells.*, 21: 7-20, 2006.

- Moreau, C., Cartron, P. F., Hunt, A., Meflah, K., Green, D. R., Evan, G., Vallette, F. M., and Juin, P. Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *J.Biol.Chem.*, 278: 19426-19435, 2003.
- Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F., and Deppert, W. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.*, 14: 4442-4449, 1995.
- Muller, M., Schilling, T., Sayan, A. E., Kairat, A., Lorenz, K., Schulze-Bergkamen, H., Oren, M., Koch, A., Tannapfel, A., Stremmel, W., Melino, G., and Krammer, P. H. TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.*, 12: 1564-1577, 2005.
- Myers, J. S. and Cortez, D. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *J.Biol.Chem.*, 281: 9346-9350, 2006.
- Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell.*, 88: 355-365, 1997.
- Nagata, S. Biddable death. *Nat.Cell Biol.*, 1: E143-E145, 1999.
- Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp.Cell Res.*, 256: 12-18, 2000.
- Nagle, D. G., Zhou, Y. D., Mora, F. D., Mohammed, K. A., and Kim, Y. P. Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products. *Curr.Med.Chem.*, 11: 1725-1756, 2004.
- Nahta, R. and Esteva, F. J. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res.*, 8: 215, 2006.
- Nakagawa, K., Masumoto, H., Sorimachi, H., and Suzuki, K. Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. *J.Biochem.*, 130: 605-611, 2001.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.*, 434: 652-658, 2005.
- Nakano, K. and Vousden, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol.Cell.*, 7: 683-694, 2001.
- Nakashima, T., Miura, M., and Hara, M. Tetrocarcin A inhibits mitochondrial functions of Bcl-2 and suppresses its anti-apoptotic activity. *Cancer Res.*, 60: 1229-1235, 2000.
- Navone, N. M., Labate, M. E., Troncoso, P., Pisters, L. L., Conti, C. J., von Eschenbach, A. C., and Logothetis, C. J. p53 mutations in prostate cancer bone metastases suggest that selected p53 mutants in the primary site define foci with metastatic potential. *J.Urol.*, 161: 304-308, 1999.
- Nemajerova, A., Wolff, S., Petrenko, O., and Moll, U. M. Viral and cellular oncogenes induce rapid mitochondrial translocation of p53 in primary epithelial and endothelial cells early in apoptosis. *FEBS Lett.*, 579: 6079-6083, 2005.
- Newman, D. and Cragg, G. Natural products in medicinal chemistry. *Bioorg.Med.Chem.*, 17: 2120, 2009.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J.Nat.Prod.*, 70: 461-477, 2007.
- Newton, K., Harris, A. W., Bath, M. L., Smith, K. G., and Strasser, A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.*, 17: 706-718, 1998.
- Ngan, C. Y., Yamamoto, H., Takagi, A., Fujie, Y., Takemasa, I., Ikeda, M., Takahashi-Yanaga, F., Sasaguri, T., Sekimoto, M., Matsuura, N., and Monden, M. Oxaliplatin induces mitotic catastrophe and apoptosis in esophageal cancer cells. *Cancer Sci.*, 99: 129-139, 2008.

- Nicholson, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.*, 6: 1028-1042, 1999.
- Nieminen, A. I., Partanen, J. I., and Klefstrom, J. c-Myc blazing a trail of death: coupling of the mitochondrial and death receptor apoptosis pathways by c-Myc. *Cell Cycle.*, 6: 2464-2472, 2007.
- Nieminen, A. I., Partanen, J. I., Hau, A., and Klefstrom, J. c-Myc primed mitochondria determine cellular sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *EMBO J.*, 26: 1055-1067, 2007.
- Norberg, E., Gogvadze, V., Ott, M., Horn, M., Uhlen, P., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ.*, 15: 1857-1864, 2008.
- Notario, B., Zamora, M., Vinas, O., and Mampel, T. All-trans-retinoic acid binds to and inhibits adenine nucleotide translocase and induces mitochondrial permeability transition. *Mol.Pharmacol.*, 63: 224-231, 2003.
- O'Reilly, L. A., Ekert, P., Harvey, N., Marsden, V., Cullen, L., Vaux, D. L., Hacker, G., Magnusson, C., Pakusch, M., Cecconi, F., Kuida, K., Strasser, A., Huang, D. C., and Kumar, S. Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell Death Differ.*, 9: 832-841, 2002.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.*, 288: 1053-1058, 2000.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., and . Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J.Biol.Chem.*, 267: 10709-10715, 1992.
- Ohiro, Y., Garkavtsev, I., Kobayashi, S., Sreekumar, K. R., Nantz, R., Higashikubo, B. T., Duffy, S. L., Higashikubo, R., Usheva, A., Gius, D., Kley, N., and Horikoshi, N. A novel p53-inducible apoptogenic gene, PRG3, encodes a homologue of the apoptosis-inducing factor (AIF). *FEBS Lett.*, 524: 163-171, 2002.
- Ohtani, N., Mann, D. J., and Hara, E. Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Sci.*, 100: 792-797, 2009.
- Okada, H. and Mak, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat.Rev.Cancer*, 4: 592-603, 2004.
- Okada, Y., Osada, M., Kurata, S., Sato, S., Aisaki, K., Kageyama, Y., Kihara, K., Ikawa, Y., and Katoh, I. p53 gene family p51(p63)-encoded, secondary transactivator p51B(TAp63alpha) occurs without forming an immunoprecipitable complex with MDM2, but responds to genotoxic stress by accumulation. *Exp.Cell Res.*, 276: 194-200, 2002.
- Okamura, H., Yoshida, K., Amorim, B. R., and Haneji, T. Histone H1.2 is translocated to mitochondria and associates with Bak in bleomycin-induced apoptotic cells. *J.Cell Biochem.*, 103: 1488-1496, 2008.
- Olive, K. P., Tuveson, D. A., Ruhe, Z. C., Yin, B., Willis, N. A., Bronson, R. T., Crowley, D., and Jacks, T. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*, 119: 847-860, 2004.
- Olsson, M., Vakifahmetoglu, H., Abruzzo, P. M., Hogstrand, K., Grandien, A., and Zhivotovsky, B. DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 28: 1949-1959, 2009.
- Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Kitada, S., Korsmeyer, S. J., Kunzer, A. R., Letai, A., Li, C., Mitten, M. J., Nettesheim, D. G., Ng, S., Nimmer, P. M., O'Connor, J. M., Oleksijew, A., Petros, A. M., Reed, J. C., Shen, W., Tahir, S. K., Thompson, C. B., Tomaselli, K. J., Wang, B., Wendt, M. D., Zhang, H., Fesik, S. W., and Rosenberg, S. H. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.*, 435: 677-681, 2005.

- Otera, H., Ohsakaya, S., Nagaura, Z., Ishihara, N., and Mihara, K. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J.*, 24: 1375-1386, 2005.
- Ouchi, T. BRCA1 phosphorylation: biological consequences. *Cancer Biol. Ther.*, 5: 470-475, 2006.
- Pallasch, C. P. and Wendtner, C. M. Overexpression of the Fas-inhibitory molecule TOSO: a novel antiapoptotic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma.*, 50: 498-501, 2009.
- Pan, G., Bauer, J. H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B. B., Ni, J., and Dixit, V. M. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.*, 431: 351-356, 1998.
- Papenfuss, K., Cordier, S. M., and Walczak, H. Death receptors as targets for anti-cancer therapy. *J. Cell Mol. Med.*, 12: 2566-2585, 2008.
- Patterson, S. D., Spahr, C. S., Daugas, E., Susin, S. A., Irinopoulou, T., Koehler, C., and Kroemer, G. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ.*, 7: 137-144, 2000.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. I. Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell.*, 109: 321-334, 2002.
- Pelengaris, S., Abouna, S., Cheung, L., Ifandi, V., Zervou, S., and Khan, M. Brief inactivation of c-Myc is not sufficient for sustained regression of c-Myc-induced tumours of pancreatic islets and skin epidermis. *BMC Biol.*, 2:26: 26, 2004.
- Pelicano, H., Feng, L., Zhou, Y., Carew, J. S., Hileman, E. O., Plunkett, W., Keating, M. J., and Huang, P. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.*, 278: 37832-37839, 2003.
- Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. H., and Huang, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene.*, 25: 4633-4646, 2006.
- Pepper, C., Lin, T. T., Pratt, G., Hewamana, S., Brennan, P., Hiller, L., Hills, R., Ward, R., Starczynski, J., Austen, B., Hooper, L., Stankovic, T., and Fegan, C. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood.*, 112: 3807-3817, 2008.
- Perfettini, J. L., Roumier, T., and Kroemer, G. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 15: 179-183, 2005.
- Petering, D. H., Byrnes, R. W., and Antholine, W. E. The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin. *Chem. Biol. Interact.*, 73: 133-182, 1990.
- Petitjean, A., Ruptier, C., Tribollet, V., Hautefeuille, A., Chardon, F., Cavard, C., Puisieux, A., Hainaut, P., and Caron, d. F. Properties of the six isoforms of p63: p53-like regulation in response to genotoxic stress and cross talk with DeltaNp73. *Carcinogenesis.*, 29: 273-281, 2008.
- Petrucci, E., Pasquini, L., Petronelli, A., Saulle, E., Mariani, G., Riccioni, R., Biffoni, M., Ferretti, G., Benedetti-Panici, P., Cognetti, F., Scambia, G., Humphreys, R., Peschle, C., and Testa, U. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL-mediated cell death of ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.*, 105: 481-492, 2007.
- Pettersson, H. M., Pietras, A., Munksgaard, P. M., Karlsson, J., Johansson, L., Shoshan, M. C., and Pahlman, S. Arsenic trioxide is highly cytotoxic to small cell lung carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, 8: 160-170, 2009.
- Pfeiffer, D. R., Gudiz, T. I., Novgorodov, S. A., and Erdahl, W. L. The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.*, 270: 4923-4932, 1995.
- Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Barry, M., and Bleackley, R. C. Nuclear translocation of granzyme B in target cell apoptosis. *Cell Death Differ.*, 7: 17-24, 2000.

- Pla, D., Francesch, A., Calvo, P., Cuevas, C., Aligue, R., Albericio, F., and Alvarez, M. Lamellarin D bioconjugates I: Synthesis and cellular internalization of PEG-derivatives. *Bioconjug.Chem.*, 20: 1100-1111, 2009.
- Pla, D., Marti, M., Farrera-Sinfreu, J., Pulido, D., Francesch, A., Calvo, P., Cuevas, C., Royo, M., Aligue, R., Albericio, F., and Alvarez, M. Lamellarin D bioconjugates II: Synthesis and cellular internalization of dendrimer and nuclear location signal derivatives. *Bioconjug.Chem.*, 20: 1112-1121, 2009.
- Pletjushkina, O. Y., Lyamzaev, K. G., Popova, E. N., Nepryakhina, O. K., Ivanova, O. Y., Domnina, L. V., Chernyak, B. V., and Skulachev, V. P. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1757: 518-524, 2006.
- Polster, B. M., Basanez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J. M., and Nicholls, D. G. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 280: 6447-6454, 2005.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature.*, 389: 300-305, 1997.
- Pommier, Y., Pourquier, P., Urasaki, Y., Wu, J., and Laco, G. S. Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. *Drug Resist.Updat.*, 2: 307-318, 1999.
- Pommier, Y., Redon, C., Rao, V. A., Seiler, J. A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., Zhang, H., and Kohn, K. W. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat.Res.*, 532: 173-203, 2003.
- Pommier, Y., Sordet, O., Antony, S., Hayward, R. L., and Kohn, K. W. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene.*, 23: 2934-2949, 2004.
- Ponassi, R., Biasotti, B., Tomati, V., Bruno, S., Poggi, A., Malacarne, D., Cimoli, G., Salis, A., Pozzi, S., Miglino, M., Damonte, G., Cozzini, P., Spyraiki, F., Campanini, B., Bagnasco, L., Castagnino, N., Tortolina, L., Mumot, A., Frassoni, F., Daga, A., Cilli, M., Piccardi, F., Monfardini, I., Perugini, M., Zoppoli, G., D'Arrigo, C., Pesenti, R., and Parodi, S. A novel Bim-BH3-derived Bcl-XL inhibitor: biochemical characterization, in vitro, in vivo and ex-vivo anti-leukemic activity. *Cell Cycle.*, 7: 3211-3224, 2008.
- Pop, C. and Salvesen, G. S. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J.Biol.Chem.*, 284: 21777-21781, 2009.
- Propper, D. J., Braybrooke, J. P., Taylor, D. J., Lodi, R., Styles, P., Cramer, J. A., Collins, W. C., Levitt, N. C., Talbot, D. C., Ganesan, T. S., and Harris, A. L. Phase I trial of the selective mitochondrial toxin MKT077 in chemo-resistant solid tumours. *Ann.Oncol.*, 10: 923-927, 1999.
- Qian, X., Li, J., Ding, J., Wang, Z., Duan, L., and Hu, G. Glibenclamide exerts an antitumor activity through reactive oxygen species-c-jun NH2-terminal kinase pathway in human gastric cancer cell line MGC-803. *Biochem.Pharmacol.*, 76: 1705-1715, 2008.
- Quesada, A. R., Garcia, G., and Fernandez Puentes, J. L. Polyaromatic alkaloids from marine invertebrates as cytotoxic compounds and inhibitors of multidrug resistance caused by P-glycoprotein. *Br.J.Cancer.*, 74: 677-682, 1996.
- Ralph, S. J., Low, P., Dong, L., Lawen, A., and Neuzil, J. Mitocans: mitochondrial targeted anti-cancer drugs as improved therapies and related patent documents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.*, 1: 327-346, 2006.
- Ramanathan, B., Jan, K. Y., Chen, C. H., Hour, T. C., Yu, H. J., and Pu, Y. S. Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity. *Cancer Res.*, 65: 8455-8460, 2005.
- Ravagnan, L., Marzo, I., Costantini, P., Susin, S. A., Zamzami, N., Petit, P. X., Hirsch, F., Goubern, M., Poupon, M. F., Miccoli, L., Xie, Z., Reed, J. C., and Kroemer, G. Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Oncogene.*, 18: 2537-2546, 1999.

- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J. M., Garrido, C., and Kroemer, G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat.Cell Biol.*, 3: 839-843, 2001.
- Reed, J. C., Stein, C., Subasinghe, C., Haldar, S., Croce, C. M., Yum, S., and Cohen, J. Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res.*, 50: 6565-6570, 1990.
- Reimertz, C., Kogel, D., Lankiewicz, S., Poppe, M., and Prehn, J. H. Ca²⁺-induced inhibition of apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: degradation of apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1). *J.Neurochem.*, 78: 1256-1266, 2001.
- Ricci, J. E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G. A., Yadava, N., Scheffler, I. E., Ellisman, M. H., and Green, D. R. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell.*, 117: 773-786, 2004.
- Riedl, S. J. and Salvesen, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 8: 405-413, 2007.
- Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide. *J.Biol.Chem.*, 275: 32438-32443, 2000.
- Robertson, J. D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 277 : 29803-29809, 2002.
- Robey, R. B. and Hay, N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene.*, 25: 4683-4696, 2006.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J.Biol.Chem.*, 273: 5858-5868, 1998.
- Roos, W. P. and Kaina, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol.Med.*, 12: 440-450, 2006.
- Roos, W. P., Batista, L. F., Naumann, S. C., Wick, W., Weller, M., Menck, C. F., and Kaina, B. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene.*, 26: 186-197, 2007.
- Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., and Goeddel, D. V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell.*, 83: 1243-1252, 1995.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science.*, 269: 1424-1427, 1995.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.*, 16: 6914-6925, 1997.
- Ruiz-Vela, A. and Korsmeyer, S. J. Proapoptotic histone H1.2 induces CASP-3 and -7 activation by forming a protein complex with CYT c, APAF-1 and CASP-9. *FEBS Lett.*, 581: 3422-3428, 2007.
- Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D. P., and Orrenius, S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J.*, 18: 2040-2048, 1999.
- Sanchez-Prieto, R., Sanchez-Arevalo, V. J., Servitja, J. M., and Gutkind, J. S. Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway. *Oncogene.*, 21: 974-979, 2002.
- Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N. D., and Moll, U. M. Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett.*, 19:488: 110-115, 2001.

- Sawada, M., Hayes, P., and Matsuyama, S. Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat.Cell Biol.*, 5: 352-357, 2003.
- Sayan, A. E., Sayan, B. S., Gogvadze, V., Dinsdale, D., Nyman, U., Hansen, T. M., Zhivotovsky, B., Cohen, G. M., Knight, R. A., and Melino, G. P73 and caspase-cleaved p73 fragments localize to mitochondria and augment TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene.*, 27: 4363-4372, 2008.
- Sayan, B. S., Sayan, A. E., Yang, A. L., Aqeilan, R. I., Candi, E., Cohen, G. M., Knight, R. A., Croce, C. M., and Melino, G. Cleavage of the transactivation-inhibitory domain of p63 by caspases enhances apoptosis. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, 104: 10871-10876, 2007.
- Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Ghidoni, R., and Codogno, P. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J.Biol.Chem.*, 279: 18384-18391, 2004.
- Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H., and . Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell.*, 20;61: 361-370, 1990.
- Schlette, E. J., Medeiros, L. J., Goy, A., Lai, R., and Rassidakis, G. Z. Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.*, 22: 1682-1688, 2004.
- Scholz, C., Wieder, T., Starck, L., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Dorken, B., and Daniel, P. T. Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway. *Oncogene.*, 24: 1904-1913, 2005.
- Scorrano, L., Petronilli, V., Di Lisa, F., and Bernardi, P. Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J.Biol.Chem.*, 274: 22581-22585, 1999.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A., and Korsmeyer, S. J. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev.Cell.*, 2: 55-67, 2002.
- Serrano, J., Palmeira, C. M., Kuehl, D. W., and Wallace, K. B. Cardioselective and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1411: 201-205, 1999.
- Shangary, S. and Johnson, D. E. Peptides derived from BH3 domains of Bcl-2 family members: a comparative analysis of inhibition of Bcl-2, Bcl-x(L) and Bax oligomerization, induction of cytochrome c release, and activation of cell death. *Biochemistry.*, 41: 9485-9495, 2002.
- Shao, R. G., Cao, C. X., Nieves-Neira, W., Dimanche-Boitrel, M. T., Solary, E., and Pommier, Y. Activation of the Fas pathway independently of Fas ligand during apoptosis induced by camptothecin in p53 mutant human colon carcinoma cells. *Oncogene.*, 20: 1852-1859, 2001.
- Shao, Y., Gao, Z., Marks, P. A., and Jiang, X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, 101: 18030-18035, 2004.
- Shen, L., Au, W. Y., Wong, K. Y., Shimizu, N., Tsuchiyama, J., Kwong, Y. L., Liang, R. H., and Srivastava, G. Cell death by bortezomib-induced mitotic catastrophe in natural killer lymphoma cells. *Mol.Cancer Ther.*, 7: 3807-3815, 2008.
- Shibue, T., Suzuki, S., Okamoto, H., Yoshida, H., Ohba, Y., Takaoka, A., and Taniguchi, T. Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways. *EMBO J.*, 25: 4952-4962, 2006.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., and Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat.Cell Biol.*, 6: 1221-1228, 2004.

Sidi, S., Sanda, T., Kennedy, R. D., Hagen, A. T., Jette, C. A., Hoffmans, R., Pascual, J., Imamura, S., Kishi, S., Amatruda, J. F., Kanki, J. P., Green, D. R., D'Andrea, A. A., and Look, A. T. Chk1 suppresses a caspase-2 apoptotic response to DNA damage that bypasses p53, Bcl-2, and caspase-3. *Cell.*, *133*: 864-877, 2008.

Simamura, E., Hirai, K., Shimada, H., Koyama, J., Niwa, Y., and Shimizu, S. Furanonaphthoquinones cause apoptosis of cancer cells by inducing the production of reactive oxygen species by the mitochondrial voltage-dependent anion channel. *Cancer Biol. Ther.*, *5*: 1523-1529, 2006.

Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., and Gerwick, W. H. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.*, *4*: 333-342, 2005.

Simms, L. A., Radford-Smith, G., Biden, K. G., Buttenshaw, R., Cummings, M., Jass, J. R., Young, J., Meltzer, S. J., and Leggett, B. A. Reciprocal relationship between the tumor suppressors p53 and BAX in primary colorectal cancers. *Oncogene.*, *17*: 2003-2008, 1998.

Singh, R., Sharma, M., Joshi, P., and Rawat, D. S. Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources. *Anticancer Agents Med. Chem.*, *8*: 603-617, 2008.

Sinicrope, F. A., Rego, R. L., Okumura, K., Foster, N. R., O'Connell, M. J., Sargent, D. J., and Windschitl, H. E. Prognostic impact of bim, puma, and noxa expression in human colon carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, *14*: 5810-5818, 2008.

Siskind, L. J., Kolesnick, R. N., and Colombini, M. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion.*, *6*: 118-125, 2006.

Skalka, M., Matyasova, J., and Cejkova, M. Dna in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. *FEBS Lett.*, *72*: 271-274, 1976.

Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D., and Goodwin, R. G. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science.*, *248*: 1019-1023, 1990.

Soares, D. G., Escargueil, A. E., Poindessous, V., Sarasin, A., de Gramont, A., Bonatto, D., Henriques, J. A., and Larsen, A. K. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, *104*: 13062-13067, 2007.

Sola, S., Diogenes, M. J., Brites, D., and Rodrigues, C. M. [Release of cytochrome C with the interaction of bilirubin, amyloid beta-peptide and glycochenodeoxycholate from isolated mitochondria]. *Acta Med. Port.*, *15*: 269-275, 2002.

Sordet, O., Khan, Q. A., Kohn, K. W., and Pommier, Y. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.*, *3*: 271-290, 2003.

Stambolsky, P., Weisz, L., Shats, I., Klein, Y., Goldfinger, N., Oren, M., and Rotter, V. Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death Differ.*, *13*: 2140-2149, 2006.

Stamenkovic, I., Clark, E. A., and Seed, B. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.*, *8*: 1403-1410, 1989.

Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., and Seed, B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.*, *19*: 513-523, 1995.

Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta.*, *1477*: 299-306, 2000.

Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., and Jeggo, P. A. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.*, *64*: 2390-2396, 2004.

Stiff, T., Walker, S. A., Cerosaletti, K., Goodarzi, A. A., Petermann, E., Concannon, P., O'Driscoll, M., and Jeggo, P. A. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J.*, 25: 5775-5782, 2006.

Stoka, V., Turk, B., Schendel, S. L., Kim, T. H., Cirman, T., Snipas, S. J., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J. C., Yin, X. M., Turk, V., and Salvesen, G. S. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J.Biol.Chem.*, 276: 3149-3157, 2001.

Stoka, V., Turk, B., and Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB.Life.*, 57: 347-353, 2005.

Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. *Biol.Chem.*, 388: 555-560, 2007.

Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., and Cory, S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature.*, 348: 331-333, 1990.

Stupack, D. G., Teitz, T., Potter, M. D., Mikolon, D., Houghton, P. J., Kidd, V. J., Lahti, J. M., and Cheresch, D. A. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature.*, 439: 95-99, 2006.

Summerhayes, I. C., Lampidis, T. J., Bernal, S. D., Nadakavukaren, J. J., Nadakavukaren, K. K., Shepherd, E. L., and Chen, L. B. Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, 79: 5292-5296, 1982.

Sun, H., Nikolovska-Coleska, Z., Yang, C. Y., Xu, L., Tomita, Y., Krajewski, K., Roller, P. P., and Wang, S. Structure-based design, synthesis, and evaluation of conformationally constrained mimetics of the second mitochondria-derived activator of caspase that target the X-linked inhibitor of apoptosis protein/caspase-9 interaction site. *J.Med.Chem.*, 47: 4147-4150, 2004.

Sun, S. Y., Yue, P., Hong, W. K., and Lotan, R. Induction of Fas expression and augmentation of Fas/Fas ligand-mediated apoptosis by the synthetic retinoid CD437 in human lung cancer cells. *Cancer Res.*, 60: 6537-6543, 2000.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M., and Kroemer, G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J.Exp.Med.*, 189: 381-394, 1999.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.*, 397: 441-446, 1999.

Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., Brothers, G., Mak, T. W., Penninger, J., Earnshaw, W. C., and Kroemer, G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J.Exp.Med.*, 192: 571-580, 2000.

Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Nakata, K., Reed, J. C., and Takahashi, R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J.Biol.Chem.*, 20;276: 27058-27063, 2001.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol.Cell.*, 8: 613-621, 2001.

Swanson, P. J., Kuslak, S. L., Fang, W., Tze, L., Gaffney, P., Selby, S., Hippen, K. L., Nunez, G., Sidman, C. L., and Behrens, T. W. Fatal acute lymphoblastic leukemia in mice transgenic for B cell-restricted bcl-xL and c-myc. *J.Immunol.*, 172: 6684-6691, 2004.

Szabo, I. and Zoratti, M. The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J.Biol.Chem.*, 266: 3376-3379, 1991.

Tardy, C., Facompre, M., Laine, W., Baldeyrou, B., Garcia-Gravalos, D., Francesch, A., Mateo, C., Pastor, A., Jimenez, J. A., Manzanares, I., Cuevas, C., and Bailly, C. Topoisomerase I-mediated DNA cleavage as a guide to the development of antitumor agents derived from the marine alkaloid lamellarin D: triester derivatives incorporating amino acid residues. *Bioorg.Med.Chem.*, 12: 1697-1712, 2004.

Tenzer, A., Zingg, D., Riesterer, O., Vuong, V., Bodis, S., and Pruschy, M. Signal transduction inhibitors as radiosensitizers. *Curr.Med.Chem.Anticancer Agents.*, 2: 727-742, 2002.

Terrinoni, A., Ranalli, M., Cadot, B., Leta, A., Bagetta, G., Vousden, K. H., and Melino, G. p73-alpha is capable of inducing scotin and ER stress. *Oncogene.*, 23: 3721-3725, 2004.

Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science.*, 281: 1312-1316, 1998.

Tinel, A. and Tschopp, J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science.*, 304: 843-846, 2004.

Tinel, A., Janssens, S., Lippens, S., Cuenin, S., Logette, E., Jaccard, B., Quadroni, M., and Tschopp, J. Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway. *EMBO J.*, 26: 197-208, 2007.

Tolcher, A. W., Mita, M., Meropol, N. J., von Mehren, M., Patnaik, A., Padavic, K., Hill, M., Mays, T., McCoy, T., Fox, N. L., Halpern, W., Corey, A., and Cohen, R. B. Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. *J.Clin.Oncol.*, 25: 1390-1395, 2007.

Torii, S., Egan, D. A., Evans, R. A., and Reed, J. C. Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J.*, 18: 6037-6049, 1999.

Tosetti, F., Vene, R., Arena, G., Morini, M., Minghelli, S., Noonan, D. M., and Albini, A. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide inhibits retinoblastoma growth through reactive oxygen species-mediated cell death. *Mol.Pharmacol.*, 63: 565-573, 2003.

Trapani, J. A., Davis, J., Sutton, V. R., and Smyth, M. J. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr.Opin.Immunol.*, 12: 323-329, 2000.

Tsang, W. P., Chau, S. P., Kong, S. K., Fung, K. P., and Kwok, T. T. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci.*, 73: 2047-2058, 2003.

Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P. C., and Croce, C. M. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science.*, 224: 1403-1406, 1984.

Turk, B., Turk, D., and Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1477: 98-111, 2000.

Tzung, S. P., Kim, K. M., Basanez, G., Giedt, C. D., Simon, J., Zimmerberg, J., Zhang, K. Y., and Hockenbery, D. M. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain. *Nat.Cell Biol.*, 3: 183-191, 2001.

Uegaki, K., Otomo, T., Sakahira, H., Shimizu, M., Yumoto, N., Kyogoku, Y., Nagata, S., and Yamazaki, T. Structure of the CAD domain of caspase-activated DNase and interaction with the CAD domain of its inhibitor. *J.Mol.Biol.*, 297: 1121-1128, 2000.

Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J. E., and Koshland, D. DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol.Cell.*, 16: 991-1002, 2004.

Uren, R. T., Dewson, G., Bonzon, C., Lithgow, T., Newmeyer, D. D., and Kluck, R. M. Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. *J.Biol.Chem.*, 280: 2266-2274, 2005.

- Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V., and Prives, C. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev.*, *18*: 3041-3054, 2004.
- Vahsen, N., Cande, C., Briere, J. J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P. G., Pequignot, M. O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J. M., Schagger, H., Rustin, P., and Kroemer, G. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.*, *23*: 4679-4689, 2004.
- Vahsen, N., Cande, C., Dupaigne, P., Giordanetto, F., Kroemer, R. T., Herker, E., Scholz, S., Modjtahedi, N., Madeo, F., Le Cam, E., and Kroemer, G. Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene.*, *25*: 1763-1774, 2006.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage. *Oncogene.*, *25*: 5683-5692, 2006.
- Valanne, S., Kleino, A., Myllymaki, H., Vuoristo, J., and Ramet, M. Iap2 is required for a sustained response in the Drosophila Imd pathway. *Dev.Comp Immunol.*, *31*: 991-1001, 2007.
- Van Pelt, A. E., Mohsin, S., Elledge, R. M., Hilsenbeck, S. G., Gutierrez, M. C., Lucci, A., Jr., Kalidas, M., Granchi, T., Scott, B. G., Allred, D. C., and Chang, J. C. Neoadjuvant trastuzumab and docetaxel in breast cancer: preliminary results. *Clin.Breast Cancer.*, *4*: 348-353, 2003.
- Van Poznak, C., Seidman, A. D., Reidenberg, M. M., Moasser, M. M., Sklarin, N., Van Zee, K., Borgen, P., Gollub, M., Bacotti, D., Yao, T. J., Bloch, R., Ligueros, M., Sonenberg, M., Norton, L., and Hudis, C. Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: a phase I/II clinical trial. *Breast Cancer Res.Treat.*, *66*: 239-248, 2001.
- van Wijk, S. J. and Hageman, G. J. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic.Biol.Med.*, *39*: 81-90, 2005.
- Vanhuyse, M., Kluza, J., Tardy, C., Otero, G., Cuevas, C., Bailly, C., and Lansiaux, A. Lamellarin D: a novel pro-apoptotic agent from marine origin insensitive to P-glycoprotein-mediated drug efflux. *Cancer Lett.*, *221*: 165-175, 2005.
- Varecha, M., Zimmermann, M., Amrichova, J., Ulman, V., Matula, P., and Kozubek, M. Prediction of localization and interactions of apoptotic proteins. *J.Biomed.Sci.*, *16*:59.: 59, 2009.
- Varfolomeev, E., Wayson, S. M., Dixit, V. M., Fairbrother, W. J., and Vucic, D. The inhibitor of apoptosis protein fusion c-IAP2.MALT1 stimulates NF-kappaB activation independently of TRAF1 AND TRAF2. *J.Biol.Chem.*, *281*: 29022-29029, 2006.
- Varghese, J., Radhika, G., and Sarin, A. The role of calpain in caspase activation during etoposide induced apoptosis in T cells. *Eur.J.Immunol.*, *31*: 2035-2041, 2001.
- Venturini, I., Alho, H., Podkletnova, I., Corsi, L., Rybnikova, E., Pellicci, R., Baraldi, M., Pelto-Huikko, M., Helen, P., and Zeneroli, M. L. Increased expression of peripheral benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor in human tumors sited in the liver. *Life Sci.*, *65*: 2223-2231, 1999.
- Verhagen, A. M., Silke, J., Ekert, P. G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L. M., Day, C. L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J.Biol.Chem.*, *277*: 445-454, 2002.
- Vikhanskaya, F., Vignati, S., Beccaglia, P., Ottoboni, C., Russo, P., D'Incalci, M., and Broggin, M. Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M arrest and apoptosis. *Exp.Cell Res.*, *241*: 96-101, 1998.
- Viktorsson, K., Ekedahl, J., Lindebro, M. C., Lewensohn, R., Zhivotovsky, B., Linder, S., and Shoshan, M. C. Defective stress kinase and Bak activation in response to ionizing radiation but not cisplatin in a non-small cell lung carcinoma cell line. *Exp.Cell Res.*, *289*: 256-264, 2003.

- Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M., and Strasser, A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science.*, 302: 1036-1038, 2003.
- Vogler, M., Dinsdale, D., Sun, X. M., Young, K. W., Butterworth, M., Nicotera, P., Dyer, M. J., and Cohen, G. M. A novel paradigm for rapid ABT-737-induced apoptosis involving outer mitochondrial membrane rupture in primary leukemia and lymphoma cells. *Cell Death Differ.*, 15: 820-830, 2008.
- Vogler, M., Dinsdale, D., Dyer, M. J., and Cohen, G. M. Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death Differ.*, 16: 360-367, 2009.
- Volm, M. and Koomagi, R. Prognostic relevance of c-Myc and caspase-3 for patients with non-small cell lung cancer. *Oncol.Rep.*, 7: 95-98, 2000.
- Vousden, K. H. and Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat.Rev.Cancer.*, 2: 594-604, 2002.
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., and Lynch, D. H. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat.Med.*, 5: 157-163, 1999.
- Walter, R. B., Pirga, J. L., Cronk, M. R., Mayer, S., Appelbaum, F. R., and Banker, D. E. PK11195, a peripheral benzodiazepine receptor (pBR) ligand, broadly blocks drug efflux to chemosensitize leukemia and myeloma cells by a pBR-independent, direct transporter-modulating mechanism. *Blood.*, 106: 3584-3593, 2005.
- Wang, J., Liu, Y. X., Hande, M. P., Wong, A. C., Jin, Y. J., and Yin, Y. TAp73 is a downstream target of p53 in controlling the cellular defense against stress. *J.Biol.Chem.*, 282: 29152-29162, 2007.
- Wang, J., Yang, C. T., Kim, Y. S., Sreerama, S. G., Cao, Q., Li, Z. B., He, Z., Chen, X., and Liu, S. ⁶⁴Cu-Labeled triphenylphosphonium and triphenylarsonium cations as highly tumor-selective imaging agents. *J.Med.Chem.*, 50: 5057-5069, 2007.
- Wang, J. L., Liu, D., Zhang, Z. J., Shan, S., Han, X., Srinivasula, S. M., Croce, C. M., Alnemri, E. S., and Huang, Z. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, 20:97: 7124-7129, 2000.
- Wang, K. K. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.*, 23: 20-26, 2000.
- Wang, Q., Gao, F., May, W. S., Zhang, Y., Flagg, T., and Deng, X. Bcl2 negatively regulates DNA double-strand-break repair through a nonhomologous end-joining pathway. *Mol.Cell.*, 29: 488-498, 2008.
- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., and Xue, D. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science.*, 298: 1587-1592, 2002.
- Wang, Y., Zhu, S., Cloughesy, T. F., Liao, L. M., and Mischel, P. S. p53 disruption profoundly alters the response of human glioblastoma cells to DNA topoisomerase I inhibition. *Oncogene.*, 23: 1283-1290, 2004.
- Waterhouse, N. J., Finucane, D. M., Green, D. R., Elce, J. S., Kumar, S., Alnemri, E. S., Litwack, G., Khanna, K., Lavin, M. F., and Watters, D. J. Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, 5: 1051-1061, 1998.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.*, 292: 727-730, 2001.
- Widlak, P., Lanuszewska, J., Cary, R. B., and Garrard, W. T. Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 278: 26915-26922, 2003.
- Widlak, P. and Garrard, W. T. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J.Cell Biochem.*, 94: 1078-1087, 2005.

- Wiman, K. G. Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ.*, *13*: 921-926, 2006.
- Wolff, S., Erster, S., Palacios, G., and Moll, U. M. p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Res.*, *18*: 733-744, 2008.
- Wood, D. E. and Newcomb, E. W. Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.*, *19*;274: 8309-8315, 1999.
- Wouters, B. G., Koritzinsky, M., Chiu, R. K., Theys, J., Buijsen, J., and Lambin, P. Modulation of cell death in the tumor microenvironment. *Semin.Radiat.Oncol.*, *13*: 31-41, 2003.
- Wright, S. C., Schellenberger, U., Wang, H., Wang, Y., and Kinder, D. H. Chemotherapeutic drug activation of the AP24 protease in apoptosis: requirement for caspase 3-like-proteases. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, *245*: 797-803, 1998.
- Wu, M., Xu, L. G., Li, X., Zhai, Z., and Shu, H. B. AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis. *J.Biol.Chem.*, *277*: 25617-25623, 2002.
- Wu, M., Xu, L. G., Su, T., Tian, Y., Zhai, Z., and Shu, H. B. AMID is a p53-inducible gene downregulated in tumors. *Oncogene.*, *23*: 6815-6819, 2004.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.*, *68*:251-306.: 251-306, 1980.
- Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.*, *284* : 555-556, 1980.
- Xu, L., Yang, D., Wang, S., Tang, W., Liu, M., Davis, M., Chen, J., Rae, J. M., Lawrence, T., and Lippman, M. E. (-)-Gossypol enhances response to radiation therapy and results in tumor regression of human prostate cancer. *Mol.Cancer Ther.*, *4*: 197-205, 2005.
- Xu, L., Zhu, J., Hu, X., Zhu, H., Kim, H. T., LaBaer, J., Goldberg, A., and Yuan, J. c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1. *Mol.Cell.*, *28*: 914-922, 2007.
- Yamane, K., Schupp, J. E., and Kinsella, T. J. BRCA1 activates a G2-M cell cycle checkpoint following 6-thioguanine-induced DNA mismatch damage. *Cancer Res.*, *67*: 6286-6292, 2007.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F., and Caput, D. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature.*, *404*: 99-103, 2000.
- Yang, S., Kuo, C., Bisi, J. E., and Kim, M. K. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat.Cell Biol.*, *4*: 865-870, 2002.
- Yang, Y. P., Liang, Z. Q., Gao, B., Jia, Y. L., and Qin, Z. H. Dynamic effects of autophagy on arsenic trioxide-induced death of human leukemia cell line HL60 cells. *Acta Pharmacol.Sin.*, *29*: 123-134, 2008.
- Yao, K. C., Komata, T., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kondo, S., and Germano, I. M. Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *J.Neurosurg.*, *98*: 378-384, 2003.
- Youle, R. J. and Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, *9*: 47-59, 2008.
- Yu, S. W., Wang, H., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.*, *297*: 259-263, 2002.

- Yu, S. W., Wang, H., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol.Dis.*, *14*: 303-317, 2003.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell.*, *19*;75: 641-652, 1993.
- Yuan, Z. M., Huang, Y., Ishiko, T., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., and Kufe, D. Regulation of DNA damage-induced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, *94*: 1437-1440, 1997.
- Yuan, Z. M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y. Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., and Kufe, D. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature.*, *399*: 814-817, 1999.
- Yun, M. H. and Hiom, K. Understanding the functions of BRCA1 in the DNA-damage response. *Biochem.Soc.Trans.*, *37*: 597-604, 2009.
- Zaika, A., Irwin, M., Sansome, C., and Moll, U. M. Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J.Biol.Chem.*, *276*: 11310-11316, 2001.
- Zermati, Y., Mouhamad, S., Stergiou, L., Besse, B., Galluzzi, L., Boehrer, S., Pauleau, A. L., Rosselli, F., D'Amelio, M., Amendola, R., Castedo, M., Hengartner, M., Soria, J. C., Cecconi, F., and Kroemer, G. Nonapoptotic role for Apaf-1 in the DNA damage checkpoint. *Mol.Cell.*, *28*: 624-637, 2007.
- Zhai, D., Jin, C., Shiau, C. W., Kitada, S., Satterthwait, A. C., and Reed, J. C. Gambogic acid is an antagonist of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. *Mol.Cancer Ther.*, *7*: 1639-1646, 2008.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., and Winoto, A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature.*, *19*;392: 296-300, 1998.
- Zhang, Y. H., Bhunia, A., Wan, K. F., Lee, M. C., Chan, S. L., Yu, V. C., and Mok, Y. K. Chelerythrine and sanguinarine dock at distinct sites on BclXL that are not the classic BH3 binding cleft. *J.Mol.Biol.*, *364*: 536-549, 2006.
- Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A., and Orrenius, S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death.Differ.*, *6*: 644-651, 1999.
- Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *331*: 859-867, 2005.
- Zhou, C., Li, Z., Diao, H., Yu, Y., Zhu, W., Dai, Y., Chen, F. F., and Yang, J. DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat.Res.*, *604*: 8-18, 2006.
- Zhou, P., Qian, L., Bieszczyk, C. K., Noelle, R., Binder, M., Levy, N. B., and Craig, R. W. Mcl-1 in transgenic mice promotes survival in a spectrum of hematopoietic cell types and immortalization in the myeloid lineage. *Blood.*, *92*: 3226-3239, 1998.
- Zhou, X. D., Yu, J. P., Chen, H. X., Yu, H. G., and Luo, H. S. Expression of cellular FLICE-inhibitory protein and its association with p53 mutation in colon cancer. *World J.Gastroenterol.*, *11*: 2482-2485, 2005.
- Zhu, C., Wang, X., Huang, Z., Qiu, L., Xu, F., Vahsen, N., Nilsson, M., Eriksson, P. S., Hagberg, H., Culmsee, C., Plesnila, N., Kroemer, G., and Blomgren, K. Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ.*, *14*: 775-784, 2007.
- Zhu, C., Wang, X., Deinum, J., Huang, Z., Gao, J., Modjtahedi, N., Neagu, M. R., Nilsson, M., Eriksson, P. S., Hagberg, H., Luban, J., Kroemer, G., and Blomgren, K. Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia. *J.Exp.Med.*, *204*: 1741-1748, 2007.
- Zinkel, S. S., Hurov, K. E., Ong, C., Abtahi, F. M., Gross, A., and Korsmeyer, S. J. A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell.*, *122*: 579-591, 2005.

Zinkel, S. S., Hurov, K. E., and Gross, A. Bid plays a role in the DNA damage response. *Cell.*, *130*: 9-10, 2007.

Zong, W. X., Ditsworth, D., Bauer, D. E., Wang, Z. Q., and Thompson, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.*, *18*: 1272-1282, 2004.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.*, *90*: 405-413, 1997.

