

143 338

50376
1997
461

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**

N° d'ordre :

THESE

**présentée pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
par**

Olga LEFEBVRE



**L'APOPTOSE DANS LES CELLULES
MYELOMATEUSES HUMAINES :
CONTROLE PAR LES RETINOIDES,
LES GLUCOCORTICOIDES ET L'INTERFERON ALPHA**

Soutenue le 21 Novembre 1997 devant la commission d'Examen :

Président : **Professeur André VERBERT**

Rapporteurs : **Professeur Christine CHOMIENNE**
Professeur Marc ZANDECKI

Examineurs : **Professeur Pierre FORMSTECHE**
Professeur Benoni BOILLY

A mes chers parents

A ma famille et mes amis !!!

Ce travail a été réalisé à l'U459, au Laboratoire de Biologie cellulaire de la Faculté de Médecine. Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements :

au Professeur Pierre FORMSTECHE pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir permis de réaliser ce travail.

au Professeur André VERBERT qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

au Professeur Christine CHOMIENNE pour avoir accepté de juger ce travail de thèse et de siéger à ce jury. Nous sommes particulièrement honorés de votre présence et vous exprimons notre plus haute considération.

au Professeur Marc ZANDECKI : Je voudrais exprimer en particulier ma profonde gratitude pour votre présence, tant scientifiquement que humainement, tout le long de ce travail de thèse et l'honneur ainsi que la joie que vous me faites d'accepter de juger cette thèse.

au Professeur Benoni BOILLY toute ma reconnaissance pour avoir accepté avec spontanéité d'examiner cette thèse.

Egalement un grand merci :

à Marie-thérèse BELIN, avec qui j'ai réalisé ce travail de thèse et fait une équipe 'hors normes' !! Merci pour ton soutien en toutes circonstances !!!!

à Claude MEREAU-RICHARD, pour son aide spontanée en de nombreuses occasions, son apport de son sens de l'organisation et ses conseils pédagogiques

à Susanna MASCHKE-SCHRAEN, un peu pour tout et pour beaucoup ... ma grande copine !!!

à Martine, Pascaline, Sylvie et Bertrand ! pour leur précieuse et efficace contribution technique et/ou scientifique, dans une ambiance toujours sympathique.

et enfin à tous ceux qui, soit par leurs conseils, leur bonne humeur, leur amitié ou leur bienveillance (ou tout à la fois) m'ont apporté soutien, joie et enthousiasme (...ou tout à la fois!!!!!!!!!!).

TABLE DES MATIERES

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	7
PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	9
REVUE GENERALE.....	11
CHAPITRE I. L' APOPTOSE.....	12
<i>A. DEFINITION.....</i>	<i>12</i>
<i>B. ROLE ET IMPLICATIONS PHYSIOLOGIQUES.....</i>	<i>13</i>
<i>C. DESCRIPTION.....</i>	<i>15</i>
1) Description morphologique.....	15
a) Première étape.....	18
b) Deuxième étape.....	18
c) Troisième étape.....	19
2) Description biochimique.....	19
a) Endonucléases.....	19
b) Transglutaminase tissulaire.....	23
c) Modifications de la membrane plasmique.....	24
<i>D. REGULATION DE L' APOPTOSE.....</i>	<i>25</i>
1) Régulation physiologique (rôle des signaux externes).....	27
a) Privation de facteurs de survie.....	27
b) Fas/TNF.....	29
2) Transduction du signal.....	29
a) Calcium.....	31
b) Kinase.....	31
3) Gènes contrôlant l' apoptose.....	37
a) ICE/Ced-3.....	39
i) Définition.....	39
ii) Cibles des protéases.....	39
b) Bcl-2.....	44
i) Définition.....	44
ii) Mécanisme d' action.....	44
c) c-Myc.....	47
d) P53.....	48
<i>E. APOPTOSE ET PATHOLOGIE.....</i>	<i>49</i>
1) Conséquences d' un excès d' apoptose.....	49
2) Conséquences d' un manque d' apoptose.....	51
<i>F. APOPTOSE : SON IMPLICATION DANS LE TRAITEMENT DU CANCER.....</i>	<i>51</i>

CHAPITRE II : LES RECEPTEURS NUCLEAIRES IMPLIQUES DANS L'APOPTOSE.....	53
A. GENERALITES.....	53
1) Définition.....	53
2) Organisation structurale.....	54
3) Récepteurs nucléaires et apoptose.....	57
B. RECEPTEURS DES GLUCOCORTICOIDES.....	59
1) Glucocorticoïdes et induction de l'apoptose.....	60
2) Glucocorticoïdes et inhibition de l'apoptose.....	61
C. RECEPTEURS DES RETINOIDES.....	62
1) Les rétinoïdes.....	62
2) Rétinoïdes naturels et synthétiques.....	62
a) Dérivés naturels et biologiquement actifs.....	64
b) Rétinoïdes de synthèse.....	64
3) Les protéines intracellulaires liant les rétinoïdes.....	64
a) Les récepteurs à l'acide rétinoïque.....	64
b) Les protéines de transport intracellulaire.....	66
4) Effets biologiques dans les cellules normales et les cellules cancéreuses.....	66
a) Rétinoïdes et prolifération.....	67
b) Rétinoïdes et différenciation.....	70
c) Rétinoïdes et apoptose.....	71
i) Rétinoïdes et induction de l'apoptose.....	71
ii) Rétinoïdes et inhibition de l'apoptose.....	74
5) Interrelation entre la voie des rétinoïdes et d'autres voies de signalisation cellulaires :	
Synergie, antagonisme, cross-talk.....	74
a) Rétinoïdes et Dexaméthasone.....	74
b) Rétinoïdes et interféron alpha (IFN α).....	75
CHAPITRE III : LE MYELOME MULTIPLE.....	77
A. DEFINITION.....	77
B. PROBLEME THERAPEUTIQUE.....	78
C. MYELOME MULTIPLE ET APOPTOSE.....	79
RESULTATS.....	81
CHAPITRE I EFFETS DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE ET DE L'ACIDE 9-CIS RÉTINOÏQUE SUR LA PROLIFÉRATION ET L'APOPTOSE DES CELLULES MYÉLOMATEUSES HUMAINES RPMI 8226 ET U266.....	83
A. Effets des rétinoïdes sur la prolifération cellulaire.....	83
1) Inhibition de la croissance cellulaire.....	83
2) Effet antiprolifératif.....	85
a) Tests d'incorporation de la thymidine tritiée (^3H).....	85
b) Marquage des cellules en prolifération par l'anticorps monoclonal anti-Ki-67.....	85

<i>B. Etude des effets inducteurs de l'apoptose</i>	86
1) Analyse morphologique de l'apoptose.....	86
a) Observation des cellules colorées par le MGG	86
b) Observation des cellules colorées par le Hoechst 33258.....	88
c) Observation des cellules au microscope électronique	89
2) Cinétique d'apparition de l'apoptose.....	89
3) Analyse biochimique	92
a) Fragmentation de l'ADN.....	93
i) Analyse qualitative : l'obtention d'échelle.....	93
ii) Analyse quantitative : dosage de l'ADN fragmenté.....	93
iii) Détection in situ de la fragmentation de l'ADN (TUNEL).....	95
b) Induction de la transglutaminase tissulaire	95
i) Dosage de son activité enzymatique.....	95
ii) Détection par immunofluorescence indirecte.....	97
c) Modification des membranes mise en évidence par l'annexine V.....	97
d) Etude de modifications de protéines	98
i) Translocation de la PKC δ	98
ii) Remaniement de la lamine B.....	98
4) Diminution du facteur anti-apoptotique Bcl-2.....	102
<i>C. Effets de l'ATRA dans la lignée U266</i>	102
<i>D. Conclusion</i>	102
CHAPITRE II CARACTERISATION DES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS LES EFFETS DE L'ATRA	109
<i>A. Caractérisation de l'équipement en récepteurs de l'AR dans les cellules RPMI 8226</i>	109
<i>B. Caractérisation des récepteurs impliqués dans les réponses d'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose dans les cellules RPMI 8226</i>	109
1) Inhibition de la prolifération	111
2) Induction de l'apoptose.....	111
3) Conclusion	114
<i>C) Etude de la modulation des effets de l'AR par un excès de rétinoïdes spécifiques des RARs ou RXRs</i>	114
1) Effets d'un excès de ligand RAR par étude des effets de l'association AR/CD367 (RAR spécifique).....	115
a) Inhibition de la prolifération.....	115
c) Conclusion	122
2) Effets d'un excès de ligand RXR par étude des effets de l'association AR/CD2425 (sélectif des RXRs).....	122
a) Inhibition de la prolifération.....	122
b) Induction de l'apoptose	123
<i>D) Activité paradoxale d'un rétinoïde de synthèse spécifique de RAR γ: CD437</i>	126
1) Croissance cellulaire.....	128

2) Induction de l'apoptose.....	128
3) Effets de la cycloheximide et de l'actinomycine D sur l'apoptose.....	133
4) Caractérisation de marqueurs de l'apoptose.....	133
5) Conclusion.....	133
CHAPITRE III EFFETS DE L'AR ASSOCIE A D'AUTRES MOLECULES DE	
SIGNALISATION.....	138
<i>A. Etude de l'association ATRA-IFNα.....</i>	<i>138</i>
1) Effet antiprolifératif.....	138
2) Induction de l'apoptose.....	140
a) Etude morphologique.....	140
b) Marqueurs biochimiques.....	140
c) Conclusion.....	140
<i>B. Etude de l'association ATRA/Dex.....</i>	<i>140</i>
1) Hypothèse de travail et résumé de l'article.....	140
2) Article.....	141
3) Discussion et résultats complémentaires.....	166
4) Caractérisation de marqueurs apoptotiques.....	170
5) Conclusion.....	170
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	171
APPENDICE TECHNIQUE.....	174
<i>A. TECHNIQUES DE CULTURE CELLULAIRE.....</i>	<i>174</i>
1) Les lignées cellulaires étudiées.....	174
2) Culture cellulaire.....	174
3) Test de viabilité.....	174
4) Traitement des cellules par différents agents : rétinoïdes, glucocorticoïdes, interféron alpha.....	175
<i>B. ETUDE DE LA PROLIFERATION.....</i>	<i>176</i>
1) Etude du cycle cellulaire après marquage par l'iodure de propidium.....	176
2) Marquage des cellules par l'anticorps monoclonal Ki-67.....	177
3) Test d'incorporation de la thymidine tritiée.....	177
4) Détection de la p21 par immunofluorescence indirecte.....	178
<i>C. ETUDE DE L'APOPTOSE.....</i>	<i>178</i>
1) Etude de la morphologie.....	178
2) Etude de marqueurs de l'apoptose.....	183
3) Etude d'un relais de l'apoptose : bcl-2 et gènes apparentés.....	194
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	195
LISTE DES FIGURES.....	219
LISTE DES TABLEAUX.....	224

RESUME

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne très grave pour laquelle l'intérêt d'un traitement par les rétinoïdes a été évoqué récemment. En effet, l'acide rétinoïque tout trans (ATRA) suscite actuellement de grands espoirs en chimiothérapie anticancéreuse depuis qu'il est déjà utilisé avec succès dans le traitement de la leucémie humaine à promyélocyte. Notre modèle expérimental, la lignée myélomateuse humaine RPMI 8226, exprime l'ensemble des ARNm des récepteurs des rétinoïdes (RAR α , β , γ , RXR α , β , γ).

Dans cette étude nous avons démontré l'effet inhibiteur de la prolifération et inducteur de l'apoptose de l'ATRA dans ces cellules. Différents marqueurs de l'apoptose ont été analysés : des marqueurs classiques tels que l'activation d'endonucléases et l'induction de la TGt, des événements concernant des protéines qui sont des cibles directes de l'action des caspases apoptotiques (PKC δ , lamine B) et d'autres événements tels que la translocation de la phosphatidyl-sérine.

En utilisant des rétinoïdes synthétiques, nous avons ensuite montré que les RARs et les RXRs étaient tous deux impliqués dans les effets biologiques de l'ATRA mais qu'un certain équilibre entre leur activation respective était nécessaire pour produire ces effets. Pour étayer ces résultats, les associations de l'ATRA avec des rétinoïdes sélectifs de chacune des sous-types de récepteurs (le CD367, sélectif des RARs et le CD2425, sélectif des RXRs) ont été testés. L'association ATRA+CD367 conduit de manière surprenante à une modification du programme apoptotique induit par l'ATRA. Nous avons également montré qu'un rétinoïde sélectif des RAR γ , le CD437, est capable d'induire un pourcentage élevé d'apoptose (85%) en quelques heures et à faible concentration, dans les cellules myélomateuses.

Enfin, différentes associations de l'ATRA avec des agents tels que la dexaméthasone (Dex) ou l'IFN α , qui font partie du traitement de la maladie, ont été testés en raison de l'incidence que prennent les traitements combinés dans le MM. Un des résultats les plus marquants est la modulation significative des effets de l'ATRA par la Dex. En effet, les glucocorticoïdes diminuent l'intensité de l'apoptose induite par l'ATRA et en plus en modifie le programme ce qui suggère un possible antagonisme entre l'ATRA et la Dex.

Ces résultats montrent qu'utilisés seuls, les rétinoïdes ne provoquent pas suffisamment d'effet intéressant pour leur utilisation dans le traitement du MM mais que l'étude de leur association mérite d'être explorée davantage.

MOTS-CLES : apoptose, acide rétinoïque, rétinoïdes de synthèse, myélome multiple, dexaméthasone, transglutaminase tissulaire.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS :

Induction of apoptosis by all-trans retinoic acid in the human myeloma cell line RPMI 8226 and negative regulation by dexamethasone.

LEFEBVRE Olga, BELIN Marie-Thérèse, MEREAU-RICHARD Claude, FACON Thierry, and FORMSTECHEP Pierre.

Soumis à Cell Death and differentiation , 1997.

Evidence for the involvement of both Retinoic Acid Receptor and Retinoic X Receptor-dependent signaling pathways in the induction of tissue transglutaminase in the human myeloma cell line RPMI 8226.

JOSEPH Bertrand, **LEFEBVRE Olga**, MEREAU-RICHARD Claude, DANZE Pierre-Marie BELIN-PLANCOT Marie-Thérèse and FORMSTECHEP Pierre.

Accepté dans Blood, 1997.

COMMUNICATIONS:

Control of expression of tissue transglutaminase by all-trans retinoic acid, dexamethasone and interferon alpha in myeloma cells.

MEREAU-RICHARD Claude, BELIN Marie-Thérèse, **LEFEBVRE Olga**, DUMUR Viviane, FACON Thierry and FORMSTECHEP Pierre.

The American Society of Haematology, 35th Annual Meeting, December 3/7, 1993, St Louis, Missouri, USA.

L'apoptose dans les cellules myélomateuses humaines : Mise en évidence par les rétinoïdes et les glucocorticoïdes.

LEFEBVRE Olga, BELIN Marie-Thérèse, MEREAU-RICHARD Claude, FACON Thierry, and FORMSTECHEP Pierre.

Eurocancer 1994, 26 avril, 1994, Paris, France.

Rôle des rétinoïdes et de l'interféron alpha dans le contrôle de l'apoptose dans les cellules myélomateuses humaines.

LEFEBVRE Olga, BELIN Marie-Thérèse, MEREAU-RICHARD Claude, FACON Thierry, and FORMSTECHEP Pierre.

XXI^e Forum Des Jeunes Chercheurs, 1994, 5/8 juillet, 1994, Reims, France.

Induction of apoptosis by retinoids and interferon alpha in human myeloma cells.

LEFEBVRE Olga, BELIN Marie-Thérèse, MEREAU-RICHARD Claude, FACON Thierry, and FORMSTECHEP Pierre.

ESH, Euroconference Apoptosis/Programmed cell death, 1/4 octobre, 1994, Kinsale, Ireland.

Modulation du phénotype apoptotique par les rétinoïdes de synthèse et les glucocorticoïdes dans la lignée myélomateuse humaine RPMI 8226.

BELIN Marie-Thérèse, **LEFEBVRE Olga**, JOSEPH Bertrand, MEREAU-RICHARD Claude, TUAL Martine, MASSELOT Bernadette, and FORMSTECHEP Pierre.
Colloque ULB, 30 mai, 1995, Villeneuve d'Ascq, France.

Effects of RAR and RXR selective ligands on the induction of apoptosis in human myeloma cells.
LEFEBVRE Olga, BELIN Marie-Thérèse, MEREAU-RICHARD Claude, FACON Thierry, and FORMSTECHEP Pierre.
4th Workshop Multiple Myeloma, 10/13 septembre, 1995, La Baule, France.

Modulation de l'apoptose, de BCL2 et de WAF1/CIP1 par les rétinoïdes dans la lignée myélomateuse humaine RPMI 8226.
WOUTERS Danièle, BELIN Marie-Thérèse, **LEFEBVRE Olga**, JOSEPH Bertrand, MEREAU-RICHARD Claude, and FORMSTECHEP Pierre.
XII^e Journée Jean-Claude Dreyfus de Génétique et de Pathologie Moléculaires, 22 septembre, 1995, Paris, France.

Effects of RAR and RXR selective ligands on the induction of apoptosis in human myeloma cells.
LEFEBVRE Olga, BELIN Marie-Thérèse, MEREAU-RICHARD Claude, JOSEPH Bertrand, FACON Thierry, and FORMSTECHEP Pierre.
Conférence « Retinoids 95 », 8/11 octobre, 1995, Sophia Antipolis, France.

Contrôle par les rétinoïdes de l'expression de la transglutaminase tissulaire, marqueur biochimique de l'apoptose.
JOSEPH Bertrand, **LEFEBVRE Olga**, BELIN Marie-Thérèse, MEREAU-RICHARD Claude, FACON Thierry, and FORMSTECHEP Pierre.
II^e Congrès du Club Hématopoïèse et Oncogène, 15/16 octobre, 1995 Dourdan, France.

Induction of apoptosis by all-trans retinoic acid and receptor selective synthetic retinoids in human myeloma cells.
LEFEBVRE Olga, BELIN Marie-Thérèse, MEREAU-RICHARD Claude, JOSEPH Bertrand, FACON Thierry, and FORMSTECHEP Pierre.
Euroconférence Apoptosis, 21/26 octobre, 1995, Cuença, Spain.

Synergistic effect of the association of all-trans retinoic acid and melphalan on the induction of apoptosis in human myeloma cell lines
MASCHKE Susanna, THOMAS Anne-Marie, DHUIEGE Edith, **LEFEBVRE Olga**, ZANDECKI Marc, BAUTERS Francis, FORMSTECHEP Pierre and FACON Thierry.
The American Society of Haematology, 38th Annual Meeting, December 6/10, 1996, Orlando, Florida, USA.

Differential induction of apoptosis and tissue transglutaminase by CD437, a RAR γ selective ligand evidence for RAR γ independant effects.
JOSEPH Bertrand, **LEFEBVRE Olga**, BELIN Marie-Thérèse, MEREAU-RICHARD Claude and FORMSTECHEP Pierre.
Conférence « Retinoids 97 », 28 September/1 October, 1997, Nice, France.

PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
AP-1 : activator protein-1
AR : acide rétinoïque
ARN : acide ribonucléique
ATRA : « all trans retinoic acid » : acide rétinoïque tout trans
Bcl-2 : B-cell lymphoma leukemia-2
bp : paire de bases
BSA : sérum albumine bovine
CAM : camptothécine
cdc : cyclin dependant cell cycle
Ced : « C. elegans cell death protein »
CPP32 : Ced-like protein p32 = Yama = Apopaine = caspase 3
CRABP : « cellular retinoic acid binding protein » : protéine cytoplasmique liant l'acide rétinoïque
DAB : diaminobenzidine
DABCO : 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane
DBD : « DNA binding domain » : domaine de liaison à l'ADN
Dex : dexaméthasone
DR : direct repeat
EDTA : acide tétraacétique éthylène diamine
ER : « estrogen receptor » : récepteur aux oestrogènes
FADD : Fas-associated death domain protéine
FITC : complexe d'isothiocyanate de fluorescéine
FLICE : FADD-like ICE/MORT1-associated Ced3 homologue
GADD45 : growth arrest and DNA damage inducible
GC : glucocorticoïde
GR : « glucocorticoid receptor » : récepteur aux glucocorticoïdes.
HRE : « hormone responsive element » : élément de réponse aux hormones
3HT : thymidine tritiée
IAP : inhibitor of apoptosis protein
ICE : « IL-1 β converting enzyme »
IFI : immunofluorescence indirecte
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IP : iodure de propidium
Kd : constante de dissociation
KD : kilo Dalton
kpb : kilo paire de base
LBD : « ligand binding domain » : domaine de liaison au ligand
Mch-2 : mammalian Ced-3 homologue-2
MCP : mort cellulaire programmée

MGG : May-Grünwald Giemsa
MM : myélome multiple
MR : « mineralocorticoid receptor » : récepteur aux minéralocorticoïdes
NAIP : neuronal apoptosis inhibitor protein
PAF : paraformaldéhyde
PARP : poly ADP-ribose polymerase
PBS : phosphate buffered saline
PCA : acide perchlorique
PCR : polymerase chain reaction : réaction de polymérisation en chaîne
PK : protéine kinase
PKC : protéine kinase C
PL : phospholipide
PR : « progesteron receptor » : récepteur de la progestérone
PS : phosphatidyl-sérine
9-cis RA : « 9-cis retinoic acid » : acide rétinoïque 9-cis
RAR : « retinoic acid receptor » : récepteur de l'acide rétinoïque
RARE : « retinoic acid responsive element » : élément de réponse à l'acide rétinoïque tout trans
Rb : produit du gène de rétinoblastome
RNase : ribonucléase
RT : « reverse transcriptase » : réaction de transcription inverse
RXR : « retinoid X receptor » : récepteur du rétinoïde X
RXRE : « retinoid X responsive element » : élément de réponse des RXRs
SDS : sodium dodécyl sulfate
SVF : sérum de veau foetal
TCA : trichloroacétique
TCR : « T cell receptor » : récepteur de cellule T
TdT : terminal deoxynucleotidyl transferase
TGt : Transglutaminase tissulaire
TNF : « tumor necrosis factor »
TPA : 12-O tétradecanolphorbol 13-acétate
TR : « thyroid receptor » : récepteur aux hormones thyroïdiennes
Tris : Tris hydroxyméthyl aminoéthane
TUNEL : TdT-dUTP Nick End Labeling
VDR : « vitamin D receptor » : récepteur à la vitamine D
WAF1 : wild-type p53-activated fragment = CIP1 : Cdk inhibiting protein

REVUE GENERALE

Chapitre I. L'APOPTOSE

A. DEFINITION

L'apoptose a été introduite en 1972 dans le vocabulaire biologique et médical par Kerr *et al*, c'est un mot grec qui signifie « chute des feuilles en automne ». Ce terme imagé désigne une forme particulière de mort cellulaire, où, chez l'animal, après de profonds remaniements structuraux et fonctionnels, la cellule apoptotique se détache de ses voisines pour être détruite par des macrophages.

Elle est directement impliquée dans le contrôle des populations cellulaires. Elle s'inscrit donc dans l'évolution normale de la cellule au même titre que la mitose ou la différenciation (mais s'oppose à la sénescence qui dépend de l'âge et du potentiel de division de la cellule).

L'apoptose se distingue ainsi de la nécrose, non seulement sur le plan morphologique mais aussi conceptuel. En effet, contrairement à cette forme de mort cellulaire passive et accidentelle, l'apoptose dépend non seulement de signaux provenant de son environnement extérieur mais aussi du terrain cellulaire où elle se produit : c'est donc un processus cellulaire actif qui met en action le métabolisme propre de la cellule. Cette constatation a permis d'introduire le concept de mort cellulaire programmée (MCP). Bien que ces termes soient parfois utilisés comme synonymes, il faut noter que l'apoptose n'est qu'une manifestation morphologique de la MCP, en effet certains auteurs considèrent que le processus de MCP n'implique pas toujours le phénomène de l'apoptose (Schwartz *et al*, 1993).

Elle constitue un phénomène complexe puisque qu'elle est régulée par de multiples signaux activateurs ou inhibiteurs provenant d'autres cellules : facteurs trophiques, stimuli physiologiques ou physico-chimiques dont les effets dépendent du type de cellule cible et de son stade de développement. Elle est également régulée par un nombre important de gènes, hautement conservés du nématode à l'homme. Leur liste continue de s'allonger chaque jour et leurs fonctions restent encore à découvrir.

La variété importante de conditions physiologiques et pathologiques sous laquelle elle se produit, ainsi que son extraordinaire complexité, justifient parfaitement l'énorme intérêt que suscite son étude.

B. ROLE ET IMPLICATIONS PHYSIOLOGIQUES

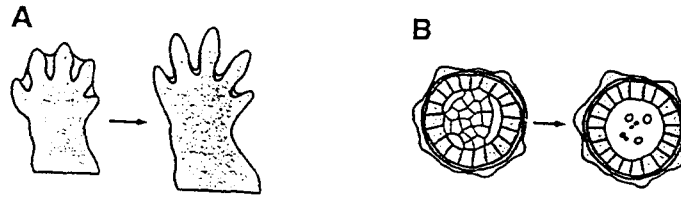
« Pendant que vous êtes en train de lire ce manuscrit, des millions de vos cellules sont en train de mourir. Relax ! la plupart le font pour assurer votre survie ! » (Duke *et al*, 1996)

En permettant l'élimination de cellules devenues indésirables (cellules lésées, en excès, qui ne sont plus à leur place, reconnues comme étrangères ou sénescents), la MCP joue un rôle central dans de nombreux processus physiologiques (Tableau I, Figure 1). Elle a été décrite aussi bien dans le développement des plantes (Greenberg *et al*, 1996) que dans des organismes aussi variés que Bactéries, Insectes, Nématodes, Poissons, Amphibiens, Oiseaux, et bien sûr, les Mammifères (Ameisen *et al*, 1995).

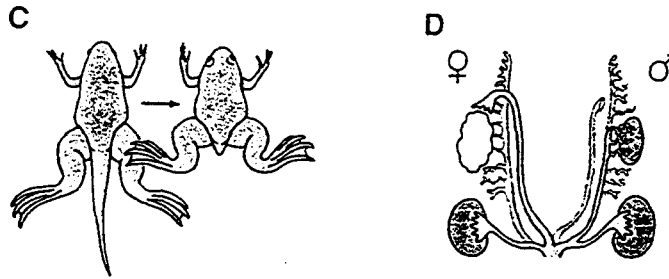
Tableau I : Physiologie de l'apoptose

Processus physiologique impliqué	Rôle de l'apoptose
Développement embryonnaire et foetal	<ul style="list-style-type: none"> - disparition de la queue de l'embryon humain - sculpture des membres - ouverture du tube digestif - remodelage des os et du cartilage - différenciation sexuelle - élaboration du système immunitaire - élaboration du système nerveux central (synaptogenèse) - formation des reins - formation du cristallin
Métamorphose et développement	<ul style="list-style-type: none"> - régression de la queue et des branchies des têtards au cours de leur métamorphose en grenouille - disparition des glandes nutritives de la chenille - maturation du nématode <i>C.elegans</i>.
Maintien de l'homéostasie tissulaire	<ul style="list-style-type: none"> - régulation de la croissance cellulaire - renouvellement cellulaire des tissus adultes normaux (peau) - élimination des cellules en fin de différenciation
Apoptose hormono-dépendante ou systémique	<ul style="list-style-type: none"> - régression de l'utérus après la grossesse - régression de l'endomètre lors de la menstruation - régression des glandes mammaires après la lactation - régression de la thyroïde après hypophysectomie - régression de la prostate
Système de défense immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> - autodestruction de la cellule infectée - moyen d'action des lymphocytes T cytotoxiques

Sculpture



Délétions de structure



Ajustement
du nombre de cellules

Elimination de cellules
dangereuses ou endommagées

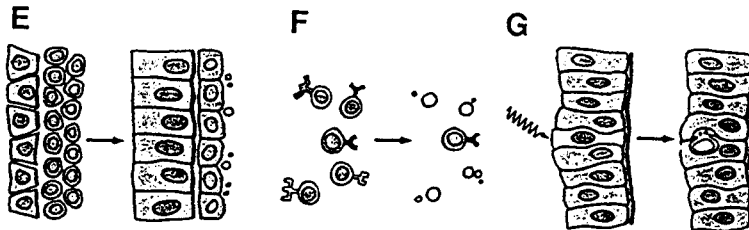


Figure 1 : Fonctions de la mort cellulaire programmée dans le développement animal (d'après Jacobson *et al*, 1997).

- (A et B) : Sculpture
- (C et D) : Délétion de structures indésirables
- (E) : Contrôle du nombre de cellules
- (F et G) : Elimination de cellules non fonctionnelles, anormales ou qui ne sont plus à leur place.

Par exemple, au cours du développement embryonnaire et foetal, la MCP, telle un sculpteur, modèle la forme de l'embryon par élimination de tissus. Ainsi, chez les Mammifères et les Oiseaux, elle sculpte les pattes, élimine les tissus interdigitaux et permet ainsi l'individualisation des doigts (l'atténuation de ce phénomène aboutit à la formation des pattes palmées chez les oiseaux aquatiques). Elle fait également disparaître les tissus ancestraux qui n'ont plus de fonction dans l'espèce comme la queue de l'embryon humain.

De la même manière, dans la métamorphose des Batraciens, la MCP permet l'élimination des branchies et de la queue du têtard (Figure 1C), utile dans le développement mais qui disparaissent lors de la métamorphose en grenouille (Wyllie *et al*, 1980 et Arends et Wyllie, 1991).

La MCP participe également à l'émergence de fonctions. Lors de l'élaboration du système immunitaire, elle permet l'élimination des lymphocytes T et B nuisibles ou inutiles : 95% des cellules T meurent lors de leur maturation dans le thymus, soit parce qu'elles ne présentent pas d'affinité pour les molécules du système majeur d'histocompatibilité autologue, soit parce qu'elles reconnaissent un antigène du soi. De façon analogue, lors de l'organisation du système nerveux central, plus de la moitié des neurones, produits en excès et établissant de mauvaises connexions, meurent par apoptose (Ameisen, 1995).

Chez l'adulte, la taille des organes est contrôlée par un équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire, cet équilibre est lui-même régulé par des facteurs de croissance ou des hormones. C'est l'apoptose qui assure partiellement cette homéostasie tissulaire ; et c'est encore elle qui est impliquée dans la régression des hyperplasies tissulaires physiologiques, comme celle de l'utérus après la grossesse ou des glandes mammaires après la lactation.

Enfin, elle constitue aussi un mécanisme de défense efficace en permettant aux cellules végétales (*Arabidopsis thaliana*) de répondre à une agression par un agent pathogène (Greenberg *et al*, 1994) et aux cellules animales, de lutter contre l'infection par un virus. Ainsi, en s'auto-détruisant, la cellule infectée empêche le virus de se répliquer et d'infecter les cellules voisines (Hacker et Vaux, 1994)

C. DESCRIPTION

1) Description morphologique

L'apoptose comporte une séquence d'événements orchestrés de manière tout à fait particulière et caractérisée par des changements morphologiques qui la distinguent de la mort cellulaire par nécrose : la condensation et la fragmentation de la chromatine, la segmentation consécutive du noyau, la rupture cellulaire après condensation et fragmentation cellulaires et enfin, la génération de corps apoptotiques (Tableau II, Figure 2).

Tableau II : Caractéristiques de la nécrose et de l'apoptose

CARACTERISTIQUES	NECROSE	APOPTOSE
Conditions de survenue	pathologique	physiologique
Mode	passif	actif
Cible	groupe de cellules	cellule isolée ou groupe de cellules
Cinétique	rapide	lente
Nucléaire		
condensation de la chromatine	aléatoire	marginale et en amas le long de l'enveloppe nucléaire
fragmentation de l'ADN	au hasard (smear), tardive	en haut poids moléculaire et/ou internucléosomique (échelle d'ADN), précoce
Cytoplasmique		
organites	lyse	maintien de l'intégrité
libération d'enzymes lysosomales	présente	absente
Membrane plasmique		
	rupture précoce (pénétration du bleu trypan)	maintien de l'intégrité (exclusion du bleu trypan)
Cellulaire		
volume	augmente	diminue
densité	diminue	augmente
aspect	gonflement puis désintégration cellulaire	condensation et fragmentation en corps apoptotiques
étape ultime	lyse	phagocytose des corps apoptotiques

Les études par microscopie électronique ont permis de révéler différentes étapes dans le déroulement de l'apoptose.

Arends *et al* (1991) les décrivent de façon détaillée, permettant de suivre la chronologie d'apparition du morphotype apoptotique :

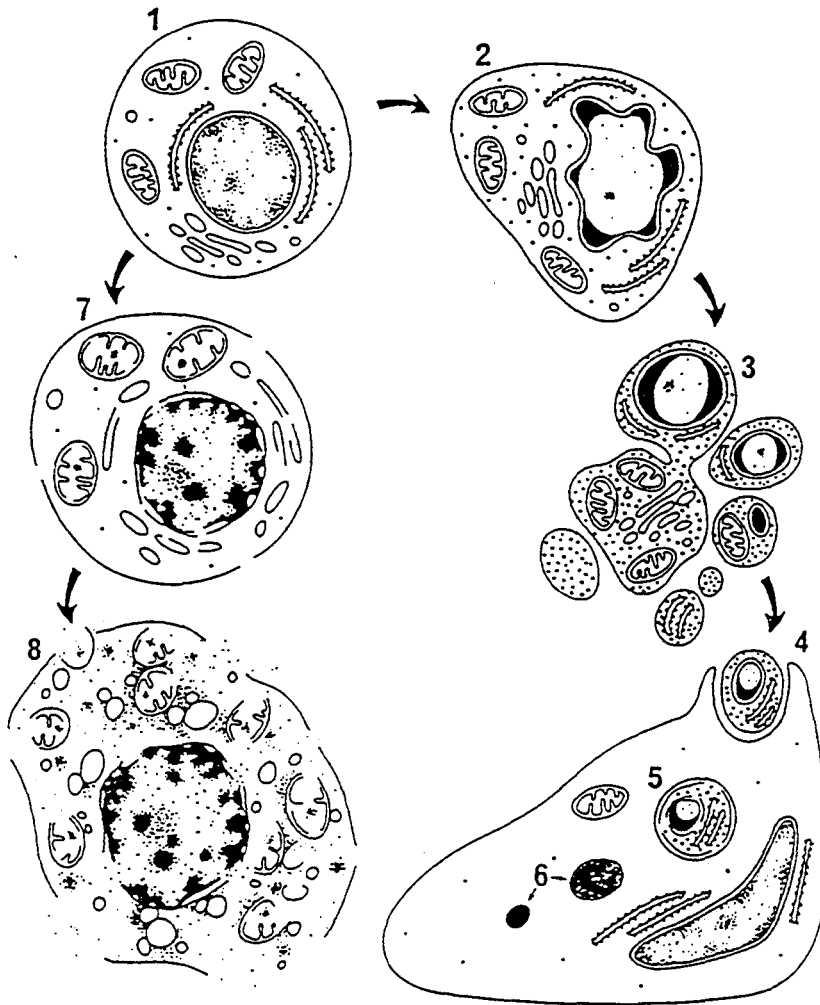


Figure 2 : Changements morphologiques essentiels dans l'apoptose, à droite et dans la nécrose, à gauche (d'après Wyllie *et al*, 1980).

- 1) Cellule normale
- 2) Condensation chromatinienne et cytoplasmique d'une cellule en début d'apoptose.
- 3) Fragmentation nucléaire et cellulaire
- 4) Phagocytose d'un corps apoptotique
- 5) Corps apoptotique phagocyté
- 6) Résidu apoptotique (apoptose terminale)
- 7) Gonflement d'une cellule en nécrose
- 8) Eclatement cellulaire

a) Première étape

La première étape est caractérisée par la survenue brusque d'altérations nucléaires et cytoplasmiques.

— **Dans le noyau**, la chromatine, qui, à l'état normal, se présente en microscopie électronique sous l'aspect d'amas de volume variable, distribués irrégulièrement contre la membrane interne du noyau, se condense pour former un croissant homogène plus ou moins volumineux. A l'extrême, un anneau de chromatine condensée entoure (presque) complètement le noyau donnant alors à la cellule un aspect ultrastructural typique de l'apoptose. Par ailleurs, les fibrilles et les granules nucléolaires sont dispersés dans le nucléoplasme alors que les centres organisateurs nucléolaires restent intacts.

Cette description correspond à ce qui se produit dans la majorité des cas. Cependant il faut noter qu'il existe plusieurs modes de déroulement de la fragmentation nucléaire dont la survenue dépend de l'inducteur et du type cellulaire concernés.

— **Dans le cytoplasme**, les organites se rapprochent et s'agglomèrent, particulièrement les mitochondries, les filaments du cytosquelette et les ribosomes libres. La cellule prend un aspect arrondi tandis que les desmosomes sont détruits et que les espaces intercellulaires s'élargissent. Par contre, fait essentiel aux stades précoces du déroulement, le réticulum endoplasmique et les mitochondries, en particulier l'ADN mitochondrial, restent intacts. Ceci, contrairement à la nécrose, au cours de laquelle apparaît très rapidement une profonde altération morpho-fonctionnelle des appareils de synthèse et énergétiques de la cellule. Dans les premières étapes, les lysosomes ne sont pas altérés et la membrane plasmique reste imperméable aux colorants vitaux.

b) Deuxième étape

La deuxième étape, qui peut chevaucher la première, est marquée par l'apparition d'un crénelage de la membrane nucléaire annonçant une fragmentation nucléaire et cytoplasmique, aboutissant à la formation de fragments cellulaires, plus ou moins volumineux, encore reliés entre eux par des ponts cytoplasmiques. Dans ces fragments, on peut voir des reliquats nucléaires, des organites apparemment encore intacts ou un mélange de débris nucléaires et cytoplasmiques plus ou moins faciles à identifier, même en microscopie électronique. A ce stade, la cellule voit son volume considérablement diminuer et sa densité augmenter (perte d'eau en même temps qu'un maintien de l'intégrité des macromolécules). La surface cellulaire montre, quand on l'examine en microscopie électronique à balayage, de volumineuses bulles cytoplasmiques déformant considérablement la membrane plasmique. Ceci traduit d'importantes modifications du cytosquelette dont

le rôle dans le mécanisme de la fragmentation est encore mal connu. Les fragments cellulaires ou corps apoptotiques se détachent les uns des autres et se séparent du tissu pour être phagocytés par des macrophages ou des cellules voisines.

c) Troisième étape

La troisième étape, ultime conséquence de la phagocytose, est marquée par la dégradation des corps apoptotiques. Cette dégradation provoque des lésions de la membrane plasmique avec comme conséquences une perméabilité aux colorants vitaux et une destruction des reliquats cytoplasmiques et nucléaires par les macrophages. Fait essentiel, la disparition des corps apoptotiques ne s'accompagne d'aucune réaction inflammatoire lymphocytaire et, à distance, d'aucun phénomène fibrosant, ce qui distingue encore l'apoptose de la nécrose. La mort apoptotique ne modifie pas en effet l'architecture tissulaire.

2) Description biochimique

Bien que ces caractéristiques morphologiques de l'apoptose soient bien conservées dans de multiples organismes, le processus biochimique impliqué reste lui encore mal compris (cela tient en particulier au fait que dans les tissus, la cellule en apoptose est isolée au sein des cellules non apoptotiques et que, sauf exception, il est difficile d'isoler des corps apoptotiques à partir d'un tissu ; on dispose en revanche de beaucoup plus d'informations à partir de cellules apoptotiques provenant de cellules isolées ou en culture).

La réalisation du programme apoptotique est le résultat de l'action coordonnée de plusieurs effecteurs. Ce sont des enzymes catalysant des changements irréversibles dans l'ADN (endonucléases/ DNAses) et dans les protéines (protéases, cf paragraphe D.3.a). Les liaisons covalentes entre les protéines cellulaires par la transglutaminase tissulaire (TGt) constituent aussi des réactions biochimiques irréversibles dans les systèmes vivants (Fesus, 1996). Enfin, l'externalisation des phosphatidyl-sérines (PS) sont des modifications biochimiques majeures de la membrane plasmique, déclenchées au cours de l'apoptose (Martin *et al*, 1995).

a) Endonucléases

La fragmentation de l'ADN est une caractéristique majeure de l'apoptose. Bien qu'elle soit un processus concomitant de la condensation de la chromatine, plusieurs études indiquent qu'elle se produirait indépendamment de cette manifestation morphologique. Son rôle le plus probable serait d'une part de détruire les informations génétiques de cellules devenues indésirables et donc agir comme une étape irréversible du processus de mort et d'autre part, de faciliter le

clivage nucléaire avant la formation et la phagocytose des corps apoptotiques (Oberhammer *et al*, 1993, Mundle *et al*, 1996). Différents modes de fragmentation, impliquant l'activité de différentes endonucléases endogènes, ont été mis en évidence dans des modèles cellulaires variés.

Dans la plupart des cas, ce processus s'effectue en deux étapes :

1) Une première fragmentation conduit à des fragments d'ADN de haut poids moléculaire (700 et 300 à 200 kpb) dégradés ensuite en fragments de 30 à 50 kpb. De façon intéressante, la taille de ces larges fragments est corrélée avec celle des boucles (30-50 kpb) et des rosettes (200-300 kpb) de chromatine (Figure 3). Enfin, elle a été mise en évidence assez tardivement (1991) grâce à la technique d'électrophorèse en champ pulsé. Elle ferait intervenir des nucléases spécifiques.

2) Une seconde forme de fragmentation, internucléosomique, conduit à des fragments multiples de 180 à 200 pb donnant un profil électrophorétique caractéristique en barreau d'échelle. Dans les premières études et dans de nombreux modèles, elle a été pendant longtemps la seule à pouvoir être détectée (Bortner *et al*, 1995) et donc considérée comme le critère biochimique majeur de l'apoptose (Wyllie *et al*, 1980). Depuis, des modèles où elle n'est pas observée ont été identifiés (Bortner, 1995). Elle semble actuellement presque toujours précédée par une fragmentation plus grossière de l'ADN en fragments de 300 et 50 kpb. Cette première étape permettrait de faciliter l'accès de l'endonucléase impliquée dans la fragmentation internucléosomique (Cohen *et al*, 1993, Walker *et al*, 1991, Brown *et al*, 1993).

A côté de ce schéma classique, des clivages 'simple brin' de l'ADN ont été mis en évidence par Peitsch *et al*, 1993, Yoshida *et al*, 1993. La signification de ce processus n'est pas encore clairement établie. Bortner *et al* (1995) émettent l'hypothèse qu'il impliquerait une étape d'induction de la fragmentation mais ne prendrait pas une part active dans l'apoptose. Alors que Mundle *et al* (1996) suggèrent que les coupures 'double brin' résulteraient soit de coupures simultanées sur les deux brins soit de coupures 'simple brin' à des intervalles courts dans l'espace et dans le temps.

A l'heure actuelle, les nucléases impliquées dans ces différents types de fragmentation ne sont pas encore caractérisées. Plusieurs candidates ont cependant pu être proposées dans un modèle déterminé. Il semblerait que leur expression varie en fonction du stade de différenciation cellulaire, du type cellulaire ou tissulaire. De plus, elles seraient activées sélectivement par différents stimuli (Mundle, 1996). Parmi elles, on trouve les endonucléases $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dépendantes (NUC-18, DNase I), les endonucléases Mg^{2+} dépendantes, les endonucléases Mn^{2+} dépendantes et les endonucléases acides (identiques ou similaires à la DNase II) (Tableau III).

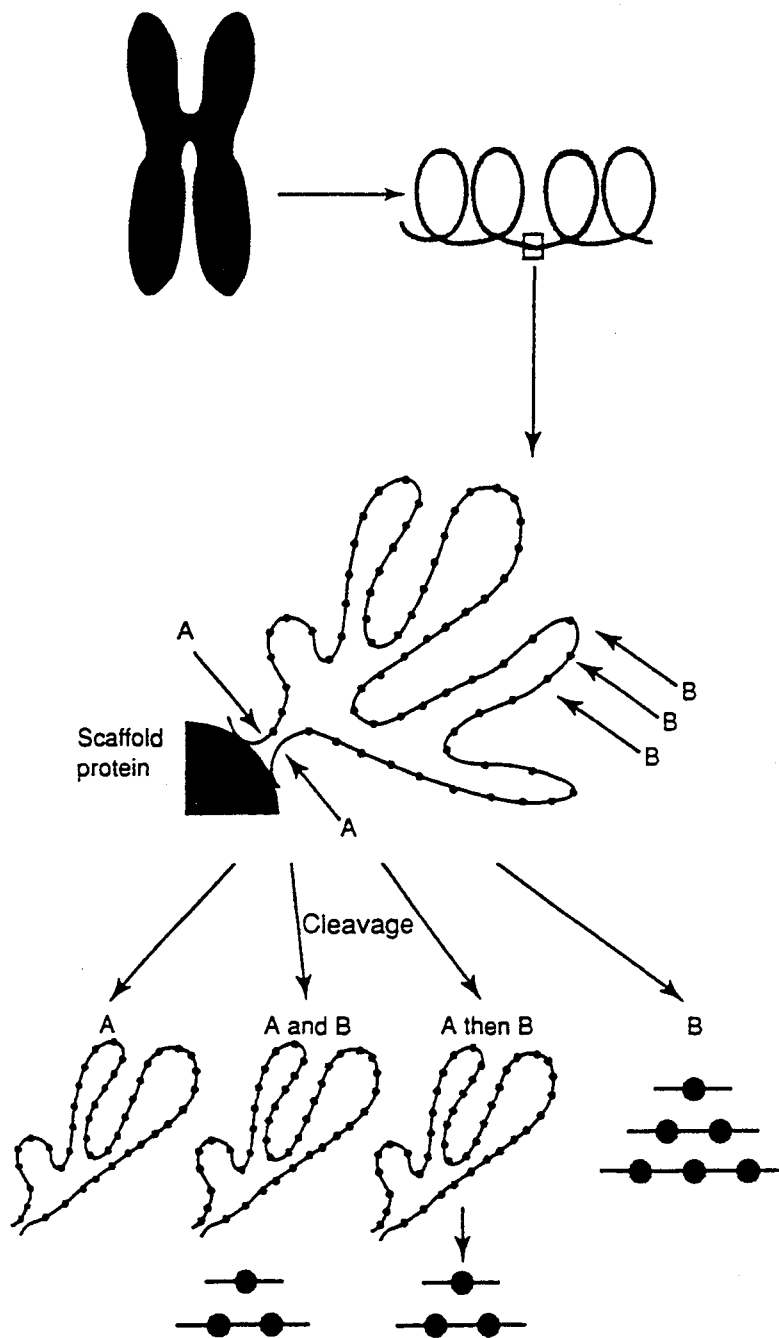


Figure 3 : Différentes voies possibles de dégradation observées pendant le processus apoptotique (d'après Bortner, 1996).

- 1) L'ADN associé à la charpente nucléaire serait clivé au point A pour donner de larges fragments.
- 2) Si les histones H1 sont supprimées au même moment, le clivage en B se produit pour donner à la fois de larges fragments d'ADN et le clivage internucléosomique de l'ADN,
- 3) Si les histones H1 sont libérées plus tardivement, les larges fragments d'ADN précéderont le clivage internucléosomique,
- 4) Enfin, si le clivage au point A est bloqué, seule la fragmentation internucléosomique sera observée.

Tableau III : Endonucléases impliquées dans la fragmentation de l'ADN
(d'après Peitsch *et al*, 1994)

Candidates	Caractéristiques	pH optimal	Ion nécessaires	Localisation cellulaire	Fragmentation de l'ADN
NUC-18	cyclophiline coupure de l'ADN	7,5	Ca ²⁺ et Mg ²⁺ inhibée par le Zn ²⁺	noyaux (thymocytes)	internucléosome et génération de larges fragments
DNase I (32-37 KD)	coupure de l'ADN sur des sites hyperméthylés	7,5	Ca ²⁺ et Mg ²⁺ et Mn ²⁺	réticulum endoplasmique et enveloppe nucléaire (lamine)	internucléosome
DNase II (29 KD)	coupure de l'ADN	5,5	aucun	localisation nucléaire ubiquitaire	internucléosome
DNase Ca ²⁺ indépendante	//	ND	aucun	noyaux (cellules MCF-7)	internucléosome (inhibée par d'EDTA et de novobiocine)
Nuc-1	//	4,5	inhibée par le Ca ²⁺ , Mg ²⁺ et Mn ²⁺	nématode <i>C.elegans</i>	ND
Nucléase (22-26 KDa)	//	ND	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ et inhibée par le Zn ²⁺	noyaux (splénocytes)	internucléosome
Nucléases (55 KDa)	//	ND	Ca ²⁺ et Mg ²⁺	noyaux (cellules CEM-C7)	internucléosome
Nucléase (97 KDa)	//	6	Ca ²⁺ et Mg ²⁺ , activée par Mn ²⁺ , Co ²⁺ et Zn ²⁺ (basse concentration), inhibée par Zn ²⁺ (forte concentration)	noyau (cellules 5123tc d'hépatome)	internucléosome (double et simple brin).
Nucléase (110-130 KD)	//	ND	Ca ²⁺ et Mg ²⁺	noyaux (thymocytes)	ND
Nucléase	//	ND	Mg ²⁺	noyaux (thymocytes)	haut PM (300 kp)
Nucléase	//	ND	Mg ²⁺ et facilitée par le Ca ²⁺	noyaux (thymocytes)	haut PM (30-50 kp)

La dégradation de l'ADN est toujours utilisée comme indicateur de l'apoptose, son rôle y est central bien que son importance dans l'initiation et la propagation de l'apoptose ait été écartée au profit d'un rôle effecteur. En effet, les caractéristiques morphologiques typiques de l'apoptose peuvent se produire en absence de clivage internucléosomique de l'ADN. De plus, elles peuvent être observées dans des cellules anucléées (Steller *et al*, 1995).

b) Transglutaminase tissulaire

La TGt est une enzyme à localisation cytoplasmique, dépendante du Ca^{2+} , qui constitue un élément important parmi les effecteurs de l'apoptose. Elle appartient à une famille de gènes codant pour des enzymes intra et extracellulaires et catalyse des modifications post-traductionnelles de protéines par formation de liaisons isopeptidiques γ -glutamyl- ϵ -lysine à l'intérieur d'un polypeptide ou entre différents polypeptides (Piacentini, 1995). Ces réactions s'accumulent dans des cellules qui ne se divisent plus, comme les kératinocytes et les chondrocytes et aussi dans les cellules évoluant vers l'apoptose (voir Piacentini, 1995). L'importance de ces réactions confère aux structures formées des propriétés physico-chimiques frappantes comme l'insolubilité au SDS et aux agents chaotropiques (Fesus *et al*, 1989). Une étude biochimique de ces structures a permis d'en caractériser les constituants (voir Piacentini, 1995) : des protéines intracellulaires connues comme l'actine, l'annexine II, la vinculine, la fibronectine et l'involucrine, des protéines encore inconnues et de l'ADN clivé en oligonucléosomes. La TGt, en étant responsable de modifications ultrastructurales du cytoplasme comme l'agglomération des organites et sa densification, permettrait ainsi de stabiliser temporairement le cytoplasme des cellules apoptotiques avant leur phagocytose et la formation des corps apoptotiques dont une des caractéristiques majeures est la résistance de la membrane cytoplasmique (Fesus *et al*, 1989). Ce phénomène favoriserait ainsi la prévention de la libération de composants intracellulaires endommagés dans l'espace extracellulaire (enzymes, DNA, RNA et virus) et expliquerait pourquoi l'apoptose est un événement immunologique silencieux, non associé à un processus inflammatoire ou à la formation de cicatrices dans le tissu environnant (Piacentini, 1995).

Cependant, l'action de la TGt n'est pas indispensable pour la survenue de la mort cellulaire car des études montrent que son inhibition par un nucléotide antisens provoque un changement dans l'apparence morphologique des cellules apoptotiques mais n'empêche pas la mort. D'autre part, elle est également compatible avec la survie cellulaire car la surexpression de son gène n'est associée à aucune maladie impliquant une dérégulation de la mort cellulaire (Fesus *et al*, 1996). Enfin, Szondy et son équipe montrent que l'induction et l'activation de la TGt font partie de la voie biochimique de l'apoptose des thymocytes induite par la dexaméthasone,

l'activation du complexe TCR/CD3 et des dommages causés à l'ADN mais non de celle initiée par la stimulation du récepteur Fas. De plus, l'absence d'activité de la TGT s'accompagne d'une morphologie apoptotique moins organisée (Szondy *et al*, 1997).

Toutes ces observations montrent que la TGT est induite et participe à la plupart des cas de mort par apoptose provoquées par différentes voies de signalisation et qu'elle joue un rôle important dans la formation des corps apoptotiques.

c) Modifications de la membrane plasmique

Plusieurs mécanismes moléculaires distincts, quatre identifiés à ce jour, permettent la reconnaissance des cellules de mammifères évoluant vers l'apoptose. Ce sont des événements biochimiques irréversibles, nécessaires pour la réalisation de la phagocytose, étape finale de l'apoptose (Hart *et al*, 1996). La perte de l'asymétrie des phospholipides (PL) membranaires à la surface de la cellule est un de ces mécanismes.

La phosphatidyl-sérine (PS) est un PL membranaire chargé négativement, qui se trouve normalement confiné dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Des études récentes ont montré que des PS apparaissent à la surface des cellules à des stades précoces de l'apoptose (Van den Eijnde *et al*, 1997). Cet événement est utilisé depuis peu comme marqueur de l'apoptose, détecté précocement, avant les cassures de l'ADN. Il est mis en évidence par l'annexine V (couplée à la FITC par exemple), qui est une protéine dépendante du Ca^{2+} , se liant aux PL et qui présente une forte affinité pour la PS (Koopman *et al*, 1994). La perte d'asymétrie des PS de la membrane intacte est indépendante du type cellulaire ou du stimulus apoptotique.

Deux enzymes seraient impliqués dans cet événement : l'inhibition d'une translocase et l'activation d'une scramblase. La translocase a normalement pour rôle d'assurer la translocation des PS du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane. La scramblase redistribue ces PS de façon symétrique au niveau des deux feuillets (Martin *et al*, 1995, Verhoven *et al*, 1995).

L'externalisation des PS semble être corrélée à l'activation des caspases. La maturation de la scramblase interviendrait par exemple après l'activation des caspases au cours de l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules U937 (Naito *et al*, 1997) et serait donc sous leur dépendance. L'action de la translocase pourrait être contrebalancée par des protéines du réseau protéique sous membranaire lié au cytosquelette. Parmi elles, la fodrine, dont la protéolyse permettrait l'externalisation rapide des PS, jouerait un rôle crucial dans l'apoptose (Patel *et al*, 1996).

D. REGULATION DE L'APOPTOSE

Le devenir d'une cellule, la prolifération, la différenciation, la quiescence ou l'apoptose, vont dépendre d'un certain nombre d'informations externes (la présence ou l'absence de molécules de signalisation, d'interactions avec d'autres cellules, ou avec un substrat), et d'informations internes (génotype cellulaire, type cellulaire, stade de développement, stade dans le cycle cellulaire, stade métabolique, présence ou non de dommage dans l'ADN, etc.). L'expression spécifique de gènes inducteurs ou modulateurs de l'apoptose, en réponse à ces différents signaux, va permettre la mise en route ou non du programme (Williams et Smith, 1993, Figure 4A).

Dans ce chapitre, nous allons passer successivement en revue les signaux externes les plus connus de la modulation de l'apoptose, les éléments impliqués dans la transduction du signal de mort et les gènes impliqués ou associés dans l'exécution de l'apoptose. Enfin, nous étudierons les principaux composants de la machinerie effectrice.

Malgré la diversité des éléments participant à la décision cellulaire en réponse à un signal, les grandes étapes impliquées dans le contrôle de l'apoptose commencent à être bien décryptées. Elles sont résumées dans un schéma d'après Thompson (1996, Figure 4B). L'idée généralement admise est que les différents signaux apoptotiques (1) convergent vers un premier point de contrôle intracellulaire de l'apoptose assuré par les protéines de la famille Bcl-2 (2). Il mène à l'activation d'une cascade de protéases appartenant à la famille ICE (appelée désormais CASPASES) (3). La protéolyse de cibles spécifiques entraîne la réalisation du programme (4).

La cascade précise des événements, qui se succèdent en réponse à un signal inducteur et qui aboutit à l'apoptose, commence à être bien documentée pour certains signaux externes comme la liaison du ligand de Fas et du TNF sur leur récepteur (Nagata, 1997).

Jusqu'à présent, les recherches se sont focalisées sur les différents signaux de mort cellulaire (Système Fas/TNF, retrait de facteurs de croissance du milieu de culture, glucocorticoïdes, agents génotoxiques, certains produits d'oncogènes comme Myc, etc...), les différents membres de la famille Bcl-2 et les protéases de type ICE. Mais les relations moléculaires entre ces étapes restent à être clairement établies.

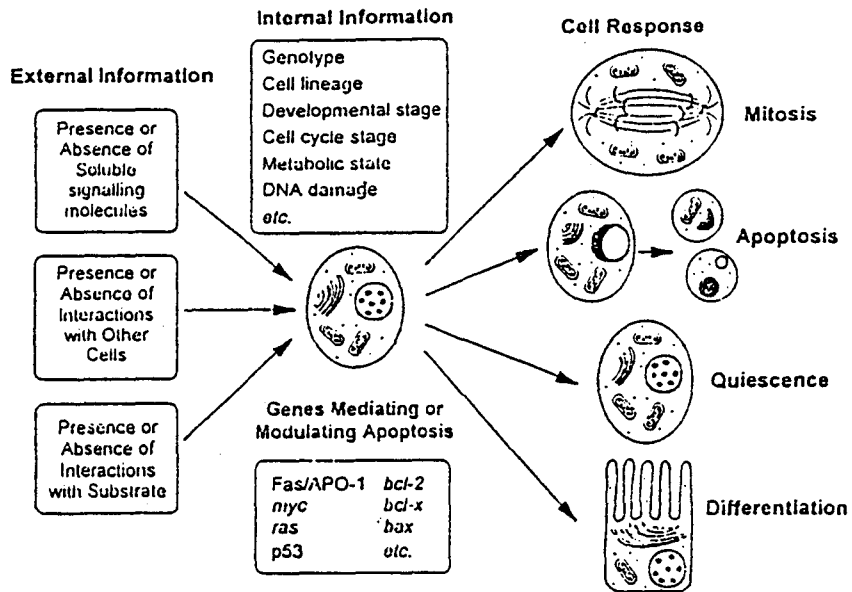


Figure 4A : Réponses cellulaires à des signaux externes et internes (d'après Williams et Smith, 1993).

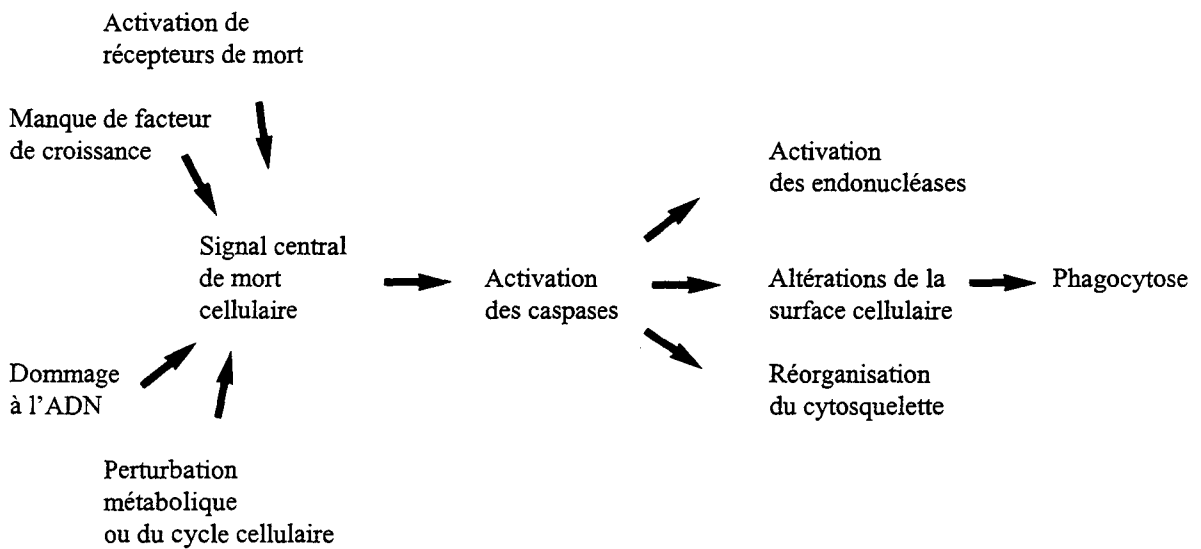


Figure 4B : Modèle hypothétique pour la régulation de la mort par apoptose (d'après Thompson, 1996).

1) Régulation physiologique (rôle des signaux externes)

A ce jour, il existe une myriade de signaux qui ont été décrits comme activateurs ou inhibiteurs de l'apoptose (Thompson, 1995, Tableau IV). Les signaux inducteurs de l'apoptose incluent les activateurs physiologiques [comme les membres de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor), la privation de facteur de croissance ou d'hormones], des inducteurs de dommages causés à la cellule [choc thermique, infection virales], des agents utilisés en thérapies [agents anticancéreux ou rayonnements γ] et enfin des toxines.

Le mode d'action de ces signaux est complexe et leur effet dépend du type cellulaire et de son stade de développement. Par exemple, un même signal peut entraîner la mort ou la prolifération selon l'état de différenciation de la cellule. De plus, les inducteurs peuvent cibler, de façon spécifique, des compartiments particuliers de la cellule (la surface cellulaire, le cytoplasme, le cytosquelette, le noyau et les voies de signalisation intracellulaires) et y provoquer des perturbations irréversibles qui déclencheront le signal de mort (Wertz et al, 1996).

Ainsi, la régulation de l'apoptose apparaît aussi complexe que celle de la prolifération cellulaire, deux phénomènes qui semblent d'ailleurs souvent soumis au même type de contrôle.

a) Privation de facteurs de survie

Dans la plupart des tissus, la survie des cellules est dépendante de la présence constante de signaux de survie, apportés par les cellules environnantes ou la matrice extracellulaire. Ainsi, certaines cellules d'organes de Vertébrés meurent par apoptose si elles sont cultivées individuellement, en absence de facteurs trophiques exogènes. C'est le cas des neurones de Vertébrés en cours de développement dont la survie dépend de facteurs neurotrophiques, sécrétés par les cellules cibles, en l'occurrence, celles qui sont sélectionnées pour l'innervation. De la même manière, la survie des cellules endothéliales dépend de la présence de FGF (Fibroblast Growth Factor). L'induction de l'apoptose en l'absence de ces facteurs de survie ne nécessite pas de nouvelles synthèses protéiques, ce qui suggère que les protéines impliquées dans le suicide cellulaire sont exprimées de façon constitutive. Une interprétation possible est que la plupart des cellules de Vertébrés sont programmées pour se suicider si elles ne reçoivent pas constamment, ou à intervalles réguliers, des facteurs de survie environnementaux (Raff, 1992).

Tableau IV : Signaux activateurs et inhibiteurs d'apoptose (d'après Thompson, 1995).

SIGNAUX INDUCTEURS D'APOPTOSE			
Activateurs physiologiques	Inducteurs provoquant des Dommages	Agents thérapeutiques	Toxiques
<ol style="list-style-type: none"> 1. Famille TNF (ligand Fas, TNF) 2. TGFβ (transforming growth factor β) 3. Neurotransmetteurs (glutamate, dopamine, N-méthyl-D-aspartate) 4. Manque de facteurs de croissance 5. Perte d'attachement à la matrice extracellulaire 6. Calcium 7. Glucocorticoïdes 8. Céramides 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Choc thermique 2. Infection virale 3. Toxines bactériennes 4. Oncogènes (myc, rel, E1A) 5. Produits de gènes suppresseurs de tumeurs (p53) 6. Signal engendré par les cellules T cytotoxiques 7. Oxydants 8. radicaux libres 9. Privation d'éléments nutritifs-antimétabolites 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agents anticancéreux cisplatine, doxorubicine, bléomycine, méthotrexate, cytosine arabinoside, vincristine 2. Rayons γ 3. Rayonnement ultraviolet 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ethanol 2. peptide β-amyloïdes
SIGNAUX INHIBITEURS D'APOPTOSE			
Inhibiteurs physiologiques	Produits de gènes viraux	Agents pharmacologiques	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Facteurs de croissance 2. Matrice extracellulaire 3. Ligand CD40 4. Acides aminés neutres 5. Zinc 6. Oestrogènes 7. Androgènes 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Adénovirus E1B 2. Baculovirus p35, IAP 3. Virus de la variole crm A 4. Virus d'Epstein-Barr BHRF1, LMP-1 5. Virus de la fièvre porcine africaine LMW5-HL 6. Herpèsvirus γ 1 34.5 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inhibiteurs de la calpaïne 2. Inhibiteurs des protéases à cystéine 3. « promoteurs » de tumeur (PMA, phénobarbital, α-hexachlorocyclohexane) 	

b) Fas/TNF

Fas (ou APO-1, ou CD95) est une molécule de surface, identifiée en 1989, qui provoque la mort des cellules qui l'expriment lorsqu'elle est reconnue par un anticorps. Elle appartient à la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) et au NGF (Nerve Growth Factor). Elle est constituée d'un domaine extracytoplasmique contenant trois régions riches en cystéine, et d'un domaine intracytoplasmique, très proche de celui du récepteur au TNF de type I, permettant la transmission d'un signal apoptotique. Chez l'homme et la souris, un grand nombre de tissus expriment Fas, mais à des degrés divers. Par contre le ligand Fas (Fas-L) est une protéine qui s'exprime essentiellement à la surface des lymphocytes T.

La fixation de Fas-L sur Fas, présent à la surface d'une cellule infectée par un virus, permet la transmission d'un signal de mort qui complète celui dépendant des perforines et granzymes dans le système de cytotoxicité médié par les cellules T. De plus, le développement de maladies autoimmunes par les souris *lpr* et *gld*, respectivement déficientes en Fas et en son ligand, suggère l'importance de ce système dans les processus d'élimination des clones T périphériques autoréactifs. De même, le fonctionnement exagéré du système cause la destruction cellulaire.

La cascade précise des événements qui se succèdent en réponse à la liaison du ligand de Fas et du TNF sur leur récepteur commence à être bien documentée (Nagata, 1997, Figure 5). La liaison de Fas-L à Fas induit une trimérisation du récepteur Fas, qui recrute alors la caspase 8 (FLICE/MACH) par l'intermédiaire d'une protéine adaptateur, FADD/MORT-1 (FADD pour Fas-Associated protein with Death Domain). L'oligomérisation de FLICE provoquerait alors une autoactivation de l'activité protéolytique et le déclenchement de la cascade des caspases. Les membres des caspases activées peuvent cliver différents substrats, comme la PARP, les lamines et l'actine, et ainsi causer des changements morphologiques dans la cellule et dans le noyau.

2) Transduction du signal

Le signal de transduction peut déclencher l'apoptose par l'activation d'un grand nombre de voies communes à la signalisation d'autres processus (prolifération ou différenciation) : les plus étudiées sont celles des kinases/phosphatases, et du Ca^{2+} car elles interviennent à la fois comme des signaux de régulation du processus apoptotique et comme des éléments effecteurs du programme. D'autres voies existent, elles incluent l'AMPc, l'activation de ras, la formation de céramides. Elles peuvent agir au sein d'une même cascade d'événements. Nous nous limiterons à l'étude du rôle du Ca^{2+} et des kinases.

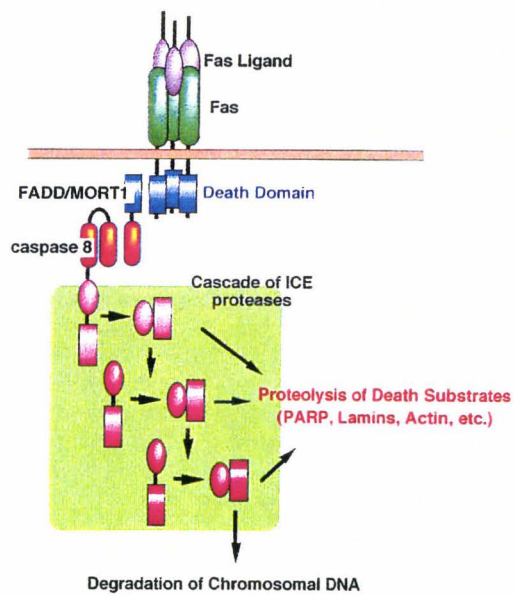


Figure 5 : Modèle de signalisation de l'apoptose induite par Fas (d'après Nagata, 1997).

a) Calcium

Des travaux sur de nombreux modèles suggèrent que l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (par augmentation de l'influx de Ca^{2+} provenant de l'extérieur, ou par mobilisation des stocks internes du réticulum endoplasmique ou de la mitochondrie) joue un rôle important dans l'initiation, la régulation ou l'activation de certains effecteurs de l'apoptose (Mc Conkey et Orrenius, 1996). L'altération de l'homéostasie calcique peut survenir en réponse à différents types de signaux inducteurs selon le modèle impliqué (par exemple dans les thymocytes induit par la dexaméthasone ou la privation d'IL-3 dans une lignée myéloïde dépendante de ce facteur, Kaiser *et al*, 1977 et Baffy *et al*, 1993 respectivement). Des études récentes montrent également qu'un stress oxydatif pourrait modifier l'homéostasie calcique en provoquant l'oxydation de sulfhydryles, présents dans les translocases à Ca^{2+} (localisées dans la membrane plasmique, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Orrenius *et al*, 1989).

L'élévation de Ca^{2+} exercerait ses effets à différents niveaux de la cascade d'événements menant à l'apoptose. Elle est nécessaire pour l'activation de certaines enzymes cytosoliques et nucléaires qui sont des intermédiaires de signaux de transduction (protéines kinases et phosphatases dépendantes du Ca^{2+}), des protéases (la calpaïne), des endonucléases (dépendantes du Ca^{2+} et du Mg^{2+} , la DNase I) et de la transglutaminase tissulaire. Elle provoque également des changements dans les flux d'eau et d'ions à travers la membrane plasmique, ce qui mènerait à la condensation du cytosol (Mc Conkey et Orrenius, 1996).

Selon Mc Conkey *et al* (1996), deux théories permettent d'expliquer le rôle des altérations de l'homéostasie calcique dans le déclenchement de l'apoptose : 1) la déplétion des stocks intracellulaires de Ca^{2+} et probablement l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique permettrait l'augmentation soutenue du taux de Ca^{2+} et agirait comme signal apoptotique, peut-être en partie par l'activation d'enzymes clef de la machinerie effectrice ; 2) c'est la 'vidange' des stocks de Ca^{2+} intracellulaire plutôt que l'augmentation de Ca^{2+} qui déclencherait l'apoptose, peut-être en brisant l'architecture intracellulaire et en permettant ainsi aux éléments clef de la machinerie intracellulaire d'avoir accès à leurs substrats. Ces 2 modèles sont certainement tous deux impliqués.

Certaines apoptoses sont toutefois indépendantes du Ca^{2+} (c'est le cas des cellules lymphocytaires humaines, CEM-C7, induites par la dexaméthasone, la novobiocine ou l'inhibiteur de la topoisomérase II) (Alnemri *et al*, 1990).

b) Kinase

La phosphorylation est de loin le mécanisme cellulaire le plus commun pour permettre l'activation ou la suppression d'activité d'une protéine spécifique. Il est donc normal qu'elle soit

un élément important dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Il existe un nombre important de résultats ayant montré l'implication de la phosphorylation de protéines dans l'apoptose. Cependant, les données sont souvent contradictoires et aucune hypothèse quant à ses effets (dans l'apoptose) n'a été émise à ce jour, les recherches étant encore à but « exploratoire ».

L'implication des protéines kinases (PK) dans l'apoptose s'effectue à différents niveaux dans la voie de transduction du signal de la membrane plasmique au noyau : pratiquement toutes les voies de signalisation impliquent l'action de protéines kinases (le Ca^{2+} , ras, la céramide, AMPc, etc...), d'autre part, la plupart des protéines impliquées dans l'apoptose (p53, c-Myc et Max, Bcl-2 et Bad) sont des protéines régulées par la phosphorylation. Enfin, la phosphorylation faciliterait des modifications irréversibles de macromolécules, comme la protéolyse des composants du cytosquelette, dont les modifications sont responsables de manifestations morphologiques importantes (perte d'attachement, bourgeonnement cellulaire, fragmentation cellulaire ou désintégration de l'enveloppe nucléaire) (Gjertsen et Doskeland, 1995).

Différents types de PK sont impliqués dans l'apoptose : les Tyrosine-kinases, les Sérine/Thréonine-kinases [Raf-kinases, MAPK-Kinases, MAP-kinases et kinases dépendantes des cyclines, kinases dépendantes de second messagers (comme les PKC et kinases activées par la céramide), kinases dépendantes de l'AMPc et kinases activées par les acides nucléiques, le stress et le Ca^{2+}] (Gjertsen *et al*, 1995). Nous allons nous limiter aux cas des PKC et montrer combien, pour ce seul exemple, les informations sont paradoxales.

Les PKCs sont des protéines kinases qui phosphorylent sur des résidus Sérine/Thréonine, qui appartiennent à une même famille et qui sont dépendantes des phospholipides. A ce jour, plus de 11 isoformes ont été identifiées dans les tissus de Mammifères. Elles sont subdivisées en 4 groupes en fonction de leur dépendance au Ca^{2+} et de leur activation possible par les esters de phorbol (Tableau V, Goodnight *et al*, 1994): les PKCs classiques ou conventionnelles (cPKC : α , β I, β II et γ), dépendantes du Ca^{2+} et activées par le DAG et le TPA, les nouvelles PKCs (nPKC : δ , ϵ , η et θ), indépendantes du Ca^{2+} et activées par le DAG et le TPA, et les PKCs atypiques (aPKCs : ζ , λ) indépendantes du Ca^{2+} et de l'activation par le DAG et le TPA et enfin une nouvelle PKC atypique (naPKC : μ). Ce sont des composants importants des voies de transduction des signaux intra-cytoplasmiques. Elles sont connues pour leur implication dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (Nishizuka *et al*, 1992, Lucas *et al*, 1995).

Leur rôle dans la régulation de l'apoptose reste controversé. La plupart des études sont basées sur l'utilisation d'activateurs de la PKC comme l'ester de phorbol (TPA) et d'inhibiteur,

comme H7 et montrent que l'activation et l'inhibition peuvent soit prévenir soit induire l'apoptose, en fonction de la cellule étudiée (Leszczynski, 1996). Les nombreuses observations conflictuelles reflètent d'une part la complexité de la famille des PKCs (les PKCs sont exprimées de façon et à des niveaux variables dans différentes cellules, tissus ou organes ; de plus une même iso-enzyme répondrait de manière différente à un même stimulus dans des tissus différents) (Hug *et al*, 1993) et d'autre part la limite des approches expérimentales utilisées pour la démonstration de l'implication des PKC dans la régulation de l'apoptose (aucun activateur ou inhibiteur de PKC disponibles actuellement ne semble avoir d'effets spécifiques sur toutes les iso-enzymes en particulier la PKC ζ) (Leszczynski, 1996).

Tableau V : Résumé des caractéristiques des isoformes de PKC
(adapté à partir de Tahayato, 1996, Goodnight, 1994, Nishizuka, 1995)

Groupes de PKCs	Activateurs	Isoformes	Expression tissulaire
cPKC	dépendantes du Ca^{2+} , activée par DAG, TPA	α βI βII γ	ubiquitaire quelques tissus cerveau uniquement plusieurs tissus
nPKC	indépendantes du Ca^{2+} , activées par DAG, TPA	δ ϵ $\eta(L)$ θ	ubiquitaire cerveau et autres peau, poumon, coeur muscle, cellule T, etc...
aPKC	indépendantes du Ca^{2+} , indépendantes de DAG, TPA	ζ λ	ubiquitaire plusieurs tissus
naPKC		μ	cellules NRQ

Comme l'a présenté Leszczynski (1996) dans sa revue, un élément important pour la compréhension des effets des PKC dans l'apoptose est la considération que l'activation et la translocation simultanée des PKC sont suivis par une diminution de l'enzyme suite à sa dégradation protéolytique. De façon intéressante, il présente les résultats de différents travaux suggérant que la diminution du taux de PKC dans la cellule pourrait être responsable de l'apoptose : Emoto *et al* (1995) et Ghayur *et al* (1996) ont montré qu'une protéase ICE-like (CPP32) active la PKC δ par protéolyse partielle suite au traitement par différentes conditions (des dommages de l'ADN, le

TNF et l'anticorps anti-Fas) et que cette réaction s'accompagne de l'induction de l'apoptose dans la cellule. Selon Leszczynski, cette situation ressemble à la première étape de la down-régulation de la PKC. D'autre part, la down-régulation de la PKC δ et de la PKC ζ par l'utilisation de nucléotides antisens semble être corrélée à l'induction de l'apoptose (Leszczynski *et al*, 1995). En fin, Pongracz *et al*, 1995 observent une diminution de l'expression de la PKC ζ dans les cellules U937 évoluant vers l'apoptose.

La question selon Leszczynski serait : quelles altérations de l'activité de la PKC est la cause de l'apoptose régulée par la PKC ? (i) l'inhibition de la PKC ?, (ii) la down régulation de l'expression de la PKC qui suit son activation ? ou (iii) l'activation de la PKC ? Des études supplémentaires sont nécessaires pour répondre à ces questions et ainsi clarifier le rôle des PKC dans la régulation de l'apoptose.

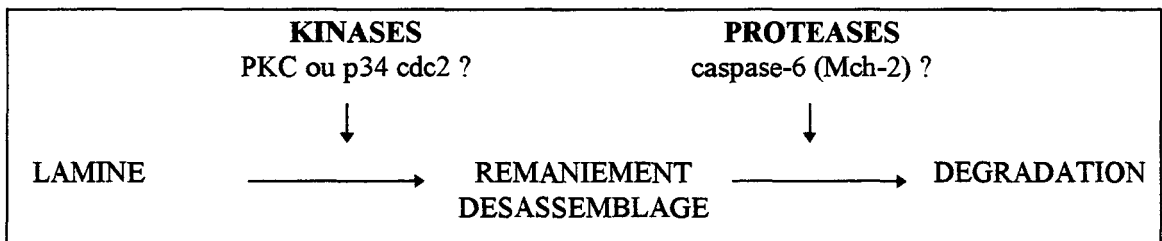
Illustration de l'implication des kinases et des protéases dans la modification des Lamines au cours de l'apoptose

La lamina nucléaire est un réseau de protéines fibrillaires qui tapisse la face interne de l'enveloppe nucléaire des cellules en interphase. Elle est constituée principalement de trois protéines (de masse moléculaires voisines de 60 à 70 kda) qui présentent de fortes homologies avec les protéines du cytosquelette. Elles s'associent pour former un réseau fibreux. Les lamines A et C, protéines issues de deux épissages différents d'un même ARN, forment la trame qui est reliée à l'enveloppe nucléaire par l'intermédiaire de la lamine B. La lamine B a un rôle de fixation de la lamina à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire pendant l'interphase cellulaire. Elle a également un rôle dans le maintien d'une localisation périchromatinienne des vésicules formées à partir de l'enveloppe nucléaire lors de la mitose par son interaction avec une protéine du cytosquelette : la vimentine. Enfin, elle permet l'association indirecte de la lamina à la chromatine par l'intermédiaire d'autres protéines, notamment le récepteur de la lamine B (molécule qui présente un site d'attachement à l'ADN). La lamina a ainsi un rôle d'organisation générale de la chromatine pendant l'interphase des cellules et celle de la structure du noyau.

Au cours de la mitose, le noyau des cellules subit de profonds changements qui vont permettre à la cellule de se diviser en deux cellules filles. Les membranes externes et internes des cellules en interphase se dépolymérisent réversiblement en début de mitose (nécessitant le désassemblage de la lamina nucléaire) : en prophase, la phosphorylation des lamines par le complexe formé par la cdc2-cycline B entraîne la dépolymérisation de la lamina en petits oligomères de lamines. Survient ensuite une désagrégation des membranes nucléaires de l'enveloppe nucléaire en petites vésicules dispersées dans le cytosol.. La lamine B reste associée à ces petites vésicules de membrane. Pendant ce temps, la chromatine se condense et s'organise en chromosomes. En fin

de mitose, les chromosomes mitotiques condensés se résolvent de nouveau en chromatine. Cela provoque la déphosphorylation des lamines et donc leur polymérisation en un réseau fibreux. Puis il y a fusion des vésicules bordées de membranes qui reforment les membranes caractéristiques de l'interphase.

Au cours de l'apoptose, le noyau cellulaire subit un certain nombre de changements : certains sont communs à la mitose comme la condensation de la chromatine, d'autres différents, comme le maintien initial de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire dans l'apoptose. Là aussi, les modifications nucléaires nécessitent au préalable un remaniement des lamines : on trouve au niveau des cellules apoptotiques un désassemblage de la lamina, mais il est ici irréversible car suivi de leur dégradation. On a donc le schéma suivant :



Les modifications de la lamina au cours du déroulement de l'apoptose s'illustrent par un désassemblage suivi d'une dégradation. Ces remaniements sont nécessaires pour la fragmentation et la condensation initiale de la chromatine puis la formation des corps apoptotiques (l'interaction qui existe entre les chromosomes et l'enveloppe nucléaire a besoin d'être rompue avant la réorganisation de l'ADN et la formation des corps apoptotiques hypercondensés, cela n'est possible que s'il y a un désassemblage des lamines qui sont reliées à l'ADN). Par contre, ces remaniements sont indépendants de la fragmentation de l'ADN donnant l'échelle d'ADN. L'observation d'une cellule apoptotique montre ainsi une chromatine condensée et fragmentée, recouverte d'une couche de membrane associée aux lamines.

En ce qui concerne l'implication des kinases dans le remaniement de la lamina des cellules apoptotiques, les données sont nombreuses. Leur rôle apparaît incontournable, en effet : 1) des modifications nucléaires dans l'apoptose nécessitent le remaniement des lamines et des modifications de la matrice nucléaire, 2) ces événements ne sont possibles que s'il y a phosphorylation des protéines constitutives de ces structures, 3) pour qu'il y ait phosphorylation, il faut donc l'expression d'une kinase appropriée, 4) son transport au noyau, 5) et enfin son activation.

Contrairement au cas de la mitose, la kinase impliquée dans la phosphorylation des lamines au cours de l'apoptose n'a pas encore été clairement déterminée, plusieurs candidates existent, il semblerait que l'implication d'une kinase particulière soit dépendante du modèle cellulaire

envisagé ainsi que du signal déclenchant. Tous ces paramètres ont été pris en compte pour essayer d'établir la liste des candidats possibles pour la phosphorylation des lamines au cours de l'apoptose. Dans la littérature, deux catégories de kinases ont été décrites comme jouant un rôle dans la phosphorylation des lamines apoptotiques : les PKCs et la p34 cdc2.

Zauli *et al* (1996) a montré une activation et une accumulation des PKC α et PKC ζ dans le noyau de cellules HL-60 traitées par l'acide rétinoïque. Il suppose que cette translocation permettrait la transduction de signaux externes et la phosphorylation de certains substrats comme les lamines. Sachant que les cellules HL-60 induites par l'AR, entrent en apoptose lorsqu'elles ont terminé leur processus de différenciation le long de la lignée granulocytaire, l'implication de ces PKC serait probable.

D'autres PKCs ont été associées au processus du changement des lamines pendant l'apoptose. Lord *et al* (1995) ont montré que l'utilisation d'activateurs spécifiques de PKCs entraînent l'induction de l'apoptose dans les cellules HL-60. La DOPPA (activateur spécifique de la PKC β) et la Bis A (activateur spécifique de la PKC δ) provoquent l'apoptose des cellules. Ces deux PKCs sont exprimées, transloquées du cytoplasme au noyau et activées dans les cellules. De plus, un double marquage a permis de montrer une colocalisation de la PKC β avec la lamine B et une colocalisation de la PKC δ avec les sites de réplication de l'ADN d'où la suggestion du rôle de ces PKCs dans le déroulement de l'apoptose nucléaire des cellules myéloïdes. De la même manière Pongracz *et al* (1994) ont montré que les cellules U937, traitées par l'activateur de la PKC β , la DOPPA, sont induites en apoptose. Ils posent la question de l'implication de la PKC β dans la modulation morphologique nucléaire, la topologie de l'ADN et l'interaction avec les protéines du cytosquelette au cours de l'apoptose, mais aucun substrat n'a été défini dans ce travail. Enfin, Knox (1993) a travaillé sur des cellules épithéliales et a montré que leur induction en apoptose est accompagnée d'une augmentation de l'expression de PKC β ainsi que sa translocation au noyau, d'une down-régulation de bcl-2 et d'une diminution de l'expression de Ki-67.

Outre la PKC β , la PKC δ est la deuxième PKC la plus probablement impliquée dans la phosphorylation des lamines pendant l'apoptose. En effet, outre l'étude de Lord *et al*, 1995, Emoto *et al* (1995) ont fait la découverte intéressante de l'activation protéolytique de la PKC δ clivée par une protéase ICE-like dans les cellules U-937 induite en apoptose par des radiations ionisantes. Le clivage permet l'obtention d'un fragment de 40 kDa (correspondant à la kinase activée) à partir de la protéine de 78 kDa. Il montre que cet événement est sensible à la surexpression de bcl-2 et bclx qui sont des gènes anti apoptose.

Enfin, une augmentation de l'expression de la PKC ϵ a été démontrée par Iwato *et al* (1994) parallèlement à l'apoptose des thymocytes induite par les glucocorticoïdes.

La p34-cdc2 (complexée à la cycline B) est un enzyme qui phosphoryle sur des résidus Serines/Thréonine qui joue un rôle important dans le déroulement de la mitose, lorsqu'elle est activée par son association à la cycline B. Elle a notamment pour substrat la lamine B et permet, en la phosphorylant, la dissociation de la lamina. Certains auteurs ont montré son implication dans l'apoptose de certains modèles. Shi *et al* (1994) ont montré que l'activation prématurée de la p34-cdc2 est nécessaire pour l'obtention de la réponse apoptotique des lymphocytes T cytotoxique au granzyme (protéases). Ils supposent que l'initiation d'une mitose avortée par l'activation prématurée de la p34-cdc2 serait un mécanisme général pour l'induction de l'apoptose et parlent du phénomène de catastrophe mitotique dont les caractéristiques morphologiques sont similaires à l'apoptose. Cependant Oberhammer *et al* (1994) a montré que la condensation de la chromatine pendant l'apoptose des fibroblastes est due à une rapide protéolyse de la matrice nucléaire n'impliquant pas l'intervention de la p34-cdc2.

3) Gènes contrôlant l'apoptose

Plusieurs oncogènes participent à l'aiguillage de la cellule vers un processus de prolifération, de différenciation ou d'apoptose, leur expression étant fonction de signaux transmis à la cellule. On distingue le groupe des gènes activateurs de l'apoptose et celui des inhibiteurs (Guidotti *et al*, 1995, Tableau VI). Leur nombre continue toujours de s'agrandir et la plupart d'entre eux sont conservés du Nématode aux Mammifères en passant par les virus.

Les produits d'oncogènes qui ont été impliqués dans la régulation de l'apoptose, sont des récepteurs membranaires, des facteurs de transduction, des kinases, des protéases ou des facteurs de transcription. Certains, comme Bcl-2, sont essentiellement inhibiteurs de l'apoptose, tandis que d'autres, tels que c-myc, sont aussi impliqués dans le contrôle de la prolifération. D'autres encore agissent comme des points de contrôle où le métabolisme cellulaire s'oriente soit vers la mort soit vers la prolifération : c'est le cas de p53. La caractérisation de la fonction de produits d'autres gènes permettra de définir plus précisément le processus de la mort cellulaire au niveau biochimique (White, 1996).

Dans notre revue, nous n'aborderons que le cas des gènes les plus couramment étudiés dans l'apoptose, à savoir ICE/ced-3, bcl-2, c-myc et p53.

Tableau VI: Principaux gènes activateurs ou inhibiteurs de l'apoptose

GENES INDUCTEURS OU EXPRIMÉS PENDANT L'APOPTOSE			
Gènes	Produit de gènes	Effets	Références
c-myc	facteur de transcription	active dans certains cas le programme apoptotique	Evan <i>et al</i> , 1992
c-fos	facteur de transcription	induit l'apoptose quand il est exprimé de façon continue	voir Guidotti <i>et al</i> , 1995
fas/Apo-1/CD95	récepteur membranaire	la liaison du ligand induit l'apoptose	voir Nagata <i>et al</i> , 1997
TNF-R1	récepteur membranaire	la liaison du ligand (TNF α) induit l'apoptose	Smith <i>et al</i> , 1994
reaper, hid	homologue à Fas/TNF	induit l'apoptose dans <i>D. melanogaster</i>	White, 1994
famille ICE	protéases à cystéine	initie la phase active de l'apoptose	voir Patel <i>et al</i> , 1996
ced-4	?	induit l'apoptose dans <i>C-elegans</i>	Ellis et Horvitz, 1986
p53	facteur de transcription	induit l'apoptose après dommage causé à l'ADN et perte de la fonction Rb	Oren <i>et al</i> , 1992
TGt	transglutaminase	s'accumule dans les cellules apoptotiques	Fesus <i>et al</i> , 1991
Grb-3	facteur de transduction	exprimé pendant l'apoptose dans certains tissus	voir Guidotti <i>et al</i> , 1995
Trpm2	clustérine, SGP-2	exprimé pendant l'apoptose dans certains tissus	voir Guidotti <i>et al</i> , 1995
nur77	récepteur nucléaire	son expression pendant l'apoptose initie la transcription de gènes	Woronicz <i>et al</i> , 1994
c-rel	facteur de transcription	contrôle de l'apoptose dans les cellules B	Abbadie <i>et al</i> , 1993 Wu <i>et al</i> , 1996
RP-2	récepteur membranaire	exprimé pendant les phases précoces de l'apoptose	voir Guidotti <i>et al</i> , 1995
GENES INHIBITEURS DE L'APOPTOSE ET GENES DE SURVIE			
bcl-2	famille Bcl-2	inhibe le programme apoptotique	White <i>et al</i> , 1996
ced-9	famille Bcl-2		White <i>et al</i> , 1996
bcl-x _L	famille Bcl-2		White <i>et al</i> , 1996
MCL-1	famille Bcl-2		White <i>et al</i> , 1996
A1	famille Bcl-2		White <i>et al</i> , 1996
abl	protéine kinase à tyrosine	inhibe le programme apoptotique comme Bcr-Abl	Mc Gahon <i>et al</i> , 1994 Dorsch et Goff, 1996
ras	facteur de transduction	inhibe l'apoptose	voir Hale <i>et al</i> , 1996
raf	protéine kinase à sérine et thréonine	inhibe l'apoptose	voir Hale <i>et al</i> , 1996

a) ICE/Ced-3

i) Définition

Une analyse génétique chez le nématode *C. elegans* a permis d'identifier Ced-3 comme étant le produit d'un des deux gènes (l'autre étant ced-4) absolument nécessaires pour la réalisation de l'apoptose au cours du développement de cet animal. Ced-3 code pour une protéase à cystéine qui présente une forte homologie de séquence avec ICE (pour Interleukin-1 β Converting Enzyme)/Ced-3, enzyme dont la fonction connue est la maturation de la pro-IL-1 β en IL-1 β , une cytokine inflammatoire biologiquement active (Nicholson, 1996 et Kaufman, 1996). De nombreux travaux ont mis en avant un rôle essentiel d'ICE dans l'apoptose.

Des études de clonage moléculaire ont permis récemment d'identifier plusieurs membres homologues de la famille ICE et CED-3 et de définir une nouvelle famille de protéases ICE-like. Elle inclut la CPP32/Yama/Apopain, Nedd2/Ich-1, TX/Ich-2/ICEII, ICE-rel-III, Mch2 et ICE-LAP3. De nouveaux membres continuent d'être identifiés et une nomenclature uniforme a récemment été proposée (la sélection du mot caspase est basée sur deux propriétés catalytiques de ces enzymes : 'C' pour protéase à cystéine, 'ASPASE' pour leur capacité à cliver après des résidus d'acide aspartique et un numéro correspondant à l'ordre de publication des différents ADNc, Tableau VII).

Les caspases sont exprimées dans une large gamme de tissus et de lignées cellulaires. Leur expression ectopique entraîne l'apoptose dans une grande variété de cellules. Elles présentent toutes les caractéristiques suivantes : elles possèdent une séquence commune (QACRG) contenant le site actif de l'enzyme, elles clivent leurs substrats protéiques au niveau de sites comportant des résidus aspartique (D) et elles sont toutes synthétisées initialement sous forme d'une pro-enzyme qui est activée par clivage au niveau d'un résidu aspartate sur des sites ressemblant à leurs propres cibles. Des phénomènes d'automaturation et de transactivation entre certaines caspases ont été démontrés. Cela suggère l'existence d'une cascade d'activations protéolytiques (Figure 6A, Martins et Earnshaw, 1997).

ii) Cibles des protéases

Il est désormais établi que la protéolyse joue un rôle central dans l'initiation et la propagation du processus apoptotique (Martin et Green, 1995, Takahashi et Earnshaw, 1996 et Patel, 1996). Parmi les protéases impliquées, les protéases à cystéine de la famille ICE jouent un rôle essentiel. D'autres protéases à cystéines sont également impliquées (Patel *et al*, 1996) ainsi que des protéases à sérine comme le groupe des fragmentines/granzymes, des calpaïnes et des protéases du complexe d'ubiquitination.

Tableau VII : Protéases de la famille ICE/CED-3
(d'après Patel, 1996, Martin et Earnshaw, 1997, Nicholson et Thornberry, 1997)

Superfamilles de protéases à cystéines	Protéases Nouvelle nomenclature	Anciens noms	Site actif	Séquence de reconnaissance	Substrats	Inhibiteurs synthétiques
ICE-like proteases	caspase-1	ICE	QACRG	YVAD	pro-IL1 β , pro-ICE pro-YAMA	YVAD-aldéhyde, YVAD-cmk
	caspase-4	ICERel-II, TX, ICH-2	QACRG	WEHD	pro-ICE , pro-TX	
	caspase-5	ICERel-III, TY		WEHD	?	
Ced3-like proteases	/	ced3	QACRG	DETD	?	
	caspase-3	CPP32, Yama, apopain	QACRG	DEVD	PARP, SREBP-1 et SRBP-2 Mch-2, Mch-6 huntingtin, U1-70kDa, DNA-PK	DEVD-aldéhyde, DEAD-aldéhyde, YVAD-cmk, TLCK, TPCK
	caspase-6	Mch2	QACRG	VEHD	PARP, Lamin, CPP32	
	caspase-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	QACRG	DEVD	PARP, SREBP	TPCK
	caspase-10	Mch4	QACRG	/	CPP32, Mch-3	
	caspase-8	Mch5, FLICE, MACH	QACRG	LETD	CPP32, pro-TX	DEVD-AMC, YVAD-AMC
	caspase-9	Mch6, ICE-LAP6	QACRG	LEHD	PARP	
	NEDD-2-like proteases	caspase-2	ICH-1, NEDD-2	QACRG	DEHD	?
Sérine protease		granzyme B	N/A	IEPD	CPP32, pro-Mch-3, proMch4 proMch5	

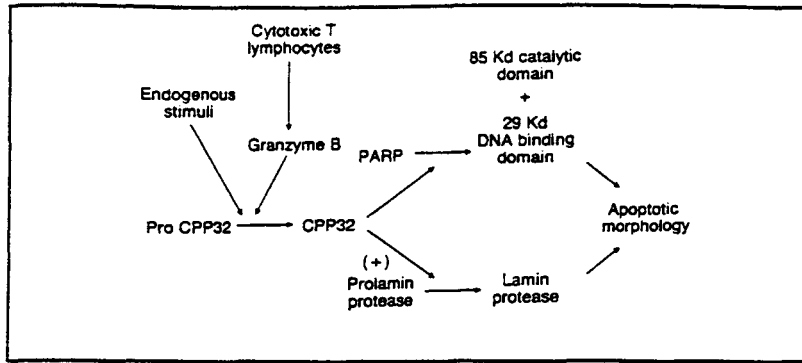


Figure 6 : Une cascade hypothétique d'activation de protéases dans l'apoptose (d'après Patel, 1996)

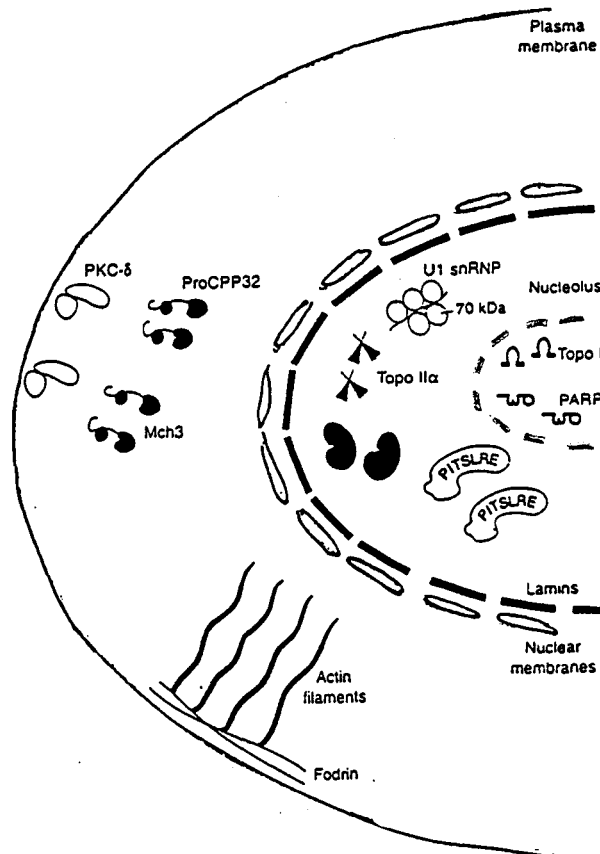


Figure 6B : Substrats de protéases apoptotiques et leur localisation dans la cellule (d'après Kaufmann , 1995)

La cascade d'activation de telles enzymes entraîne des clivages protéolytiques nombreux qui mènent à des modifications irréversibles des protéines. La liste des substrats et des cibles potentiels de ces protéases, principalement pour les protéases ICE-like, s'agrandit constamment (Tableau VIII, d'après Patel *et al.*, 1996 et Casiano et Tan, 1996). Elle inclut de nombreuses protéines nucléaires et cytoplasmiques qui contribuent au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du noyau ou de la cellule entière (Figure 6B). Parmi elles, on trouve la polymérase poly(ADP-ribose) ou PARP, la petite ribonucléoprotéine U1 de 70kda (U1-70kDa snRNP), les lamines et la protéine kinase C δ (PKC δ). Pour certains de ces substrats, la protéolyse entraîne une perte de fonction. C'est le cas de la PARP qui ne pourra plus être activée par des dommages causés à l'ADN après protéolyse (Kaufmann, 1996). De la même manière, le clivage des lamines joue en faveur de l'apoptose en dissociant les lamines de leurs protéines nucléaires associées (lamin receptors) (Kaufmann, 1996). Il provoque ainsi la diminution de la rigidité de l'enveloppe nucléaire et permet la formation de petits fragments nucléaires pouvant être emballés dans des corps apoptotiques. Pour d'autres substrats, la protéolyse va entraîner un gain de fonction. C'est le cas de la PKC δ ou de la kinase PITSLRE qui semblent être activées après protéolyse (Kaufmann, 1996). De plus, rappelons que les protéases sont elles-mêmes activées par autoclivage.

En conclusion, les observations rapportées, principalement dans le domaine de la famille ICE et celle des granzymes, suggèrent fortement que les effets de nombreux clivages protéolytiques sont directement impliqués dans la production de manifestations morphologiques typiques de l'apoptose. Les protéases sont donc bien des effecteurs de l'apoptose, comme l'ont démontré de nombreuses équipes. L'identification d'autres substrats fait actuellement l'objet de recherches soutenues.

Exemple : Implication des protéases dans la dégradation de l'ADN : Différents événements apoptotiques nécessitent une activité protéasique. L'une d'elle est la génération de chromatine clivée. Elle pourrait se produire par deux voies, la première faciliterait la libération de l'ADN de la charpente nucléaire, permettant aux nucléases un meilleur accès à l'ADN. Il a été montré que des protéases à sérine, régulées par le Ca²⁺ sont associées à la charpente nucléaire et que leur activation permet le clivage des lamines A et C, ce qui entraîne la rupture de la structure nucléaire. Cette rupture pourrait séparer la chromatine de ces protéines de la charpente et permettre l'accès des nucléases aux sites d'action. Une seconde voie est l'activation des nucléases elles-mêmes, les libérant de complexes d'inhibition ou modifiant leur conformation. La mort rapide causée par la libération de granzymes (sérine protéases) des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK dans des cibles inclut la fragmentation caractéristique de l'ADN, suggérant que la libération de granzymes activerait des nucléases endogènes (Montague et Cidlowski, 1996)

Tableau VIII: Principales cibles des protéases apoptotiques
(d'après Patel *et al.*, 1996 et Casiano et Tan, 1996)

SUBSTRATS	Signification	Fonctions normales	Conséquence du clivage	Références
Nucléaires				
PARP	polymerase poly (ADP-ribose)	- réparation de l'ADN - interagit avec chromatine dans la matrice nucléaire	perte de fonction (116→85 KD)	Patel <i>et al.</i> , 1996
topoisomérase II	/	- modification de la topologie de l'ADN - attache la chromatine à la matrice nucléaire	perte de fonction (170/180→multiple)	Kaufmann, 1996
endonucléase	/	clivage de l'ADN	gain de fonction	Patel <i>et al.</i> , 1996
histone H1	/	structure de la chromatine	perte de fonction	Patel <i>et al.</i> , 1996
U1-70KDa	petite ribonucléoprotéine U1 de 70kda (SnRNP)	- épissage d'ARNm précurseur - association à la matrice nucléaire ?	réduction des transcrits actifs 70→40 KD	Patel <i>et al.</i> , 1996
NuMA	protéines de la matrice nucléaire	- formation de fuseaux mitotiques - attache la chromatine à la matrice nucléaire	désassemblage nucléaire 210-240→160-180 KD	Patel <i>et al.</i> , 1996
lamine B		- formation de l'enveloppe nucléaire structure du noyau - attache la chromatine à la matrice nucléaire	désassemblage nucléaire (68→45 et 21 KD ou 67→46 KD)	Patel <i>et al.</i> , 1996 Zhivotovsky <i>et al.</i> , 1996
Rel	facteur de transcription de la famille NF-kB/Rel			Zhivotovsky <i>et al.</i> , 1996
PITSLRE-PK			gain de fonction	Patel <i>et al.</i> , 1996
Cytoplasmiques				
Rb	protéine de prédisposition au rétinoblastome	suppression de la croissance et protection contre la mort	arrêt en G1	Patel <i>et al.</i> , 1996 Wang, 1997
PKCδ	protéine kinase Cδ	progression dans le cycle	arrêt en G2-M (78kD Π 40 kD)	Zhivotovsky <i>et al.</i> , 1996
β-actine	protéine du cytosquelette		désassemblage	Zhivotovsky <i>et al.</i> , 1996
fodrine	protéine du cytosquelette associée à la membrane	ancrage des filaments d'actine à la membrane plasmique	désassemblage	Patel <i>et al.</i> , 1996

b) Bcl-2

i) Définition

Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) est actuellement le protooncogène le plus étudié pour son rôle dans la régulation de l'apoptose.

Le gène *bcl-2* a tout d'abord été individualisé en raison de son implication dans la translocation chromosomique t(14;18) qui est retrouvée dans 90% des cas de lymphomes folliculaires (Bakhshi *et al*, 1985). Cette translocation place le gène *bcl-2* sous le contrôle de l'activateur du gène d'une chaîne lourde d'immunoglobuline et provoque une expression constitutive élevée de Bcl-2. L'incapacité des cellules, portant cette translocation, d'évoluer vers l'apoptose, suggère que, contrairement à d'autres oncogènes, Bcl-2 est un gène protecteur de l'apoptose.

Un homologue structural et fonctionnel de Bcl-2, *ced-9*, a été identifié chez le nématode *C. elegans* par analyse génétique classique et met en relief la conservation de ce type de gène dans le règne animal (Hentgartner *et al*, 1994).

De nombreux travaux montrent l'importance et l'implication de Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose, particulièrement dans les modèles où Bcl-2 est normalement très fortement exprimé (c'est à dire dans certains tissus durant le développement embryonnaire (Lebrun *et al*, 1993), ou chez l'adulte, dans les cellules souches, les cellules à durée de vie très longue comme les lymphocytes B ou au repos et dans les neurones périphériques (Hockenbery *et al*, 1991). Cependant, il existe des situations où l'apoptose n'est pas inhibée par Bcl-2. Par exemple, la stimulation de l'immunoglobuline de surface des cellules de la lignée B immature WEHI-231 déclenche un signal d'apoptose qui n'est pas inhibé par Bcl-2 (Cuende *et al*, 1993). Aujourd'hui on sait qu'il existe toute une classe de protéines homologues du produit du gène Bcl-2 qui régulent la mort cellulaire programmée, soit en inhibant ce processus, soit en le stimulant (Larsen, 1996) (Tableau IX).

Outre cette parenté d'activité biologique, il existe une parenté structurale qui est fondée sur la présence de domaines conservés appelé BH pour *Bcl-2 Homology Domain* : BH1, BH2, BH3, BH4. Ces différents domaines sont nécessaires à la dimérisation des protéines de la famille ainsi qu'à leur activité biologique (Larsen, 1996) (Figure 7A).

ii) Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action exact de Bcl-2 est encore inconnu mais plusieurs processus y participant ont été suggérés ou mis en évidence.

1) Avec l'observation que les membres de la famille Bcl-2 forment des homo- ou hétérodimères pouvant apparemment agir de façon opposée, l'équipe de Korsmeyer a apporté une explication mécanistique quant à leurs effets différentiels dans la régulation de l'apoptose. Ainsi,

Tableau IX : Présentation des membres de la famille Bcl-2

Protéines des gènes inhibiteurs de l'apoptose		Queue hydrophobe	Origine
Bcl-2	B cell lymphoma/leukemia	+	mammifère
Bcl-xL		+	mammifère
Bcl w		+	mammifère
Mcl-1	myeloid celle leukemia 1	+	mammifère
A1		+	virus
NR-13		+	virus
ASFV LMW5-HL		-	virus
EBV BHRF1		+	virus
Ced-9		+	nématode
Protéines des gènes stimulateurs d'apoptose			
Bax	Bcl-2 associated X protein	+	mammifère
Bak-1	Bcl-2 homologous antagonist/killer-1	+	mammifère
Bak-2	Bcl-2 homologous antagonist/killer-2	?	mammifère
Bik	Bcl-2 interacting killer	+	mammifère
Bcl-xS		+	mammifère
Bad		-	mammifère
Nbk	Natural born killer		mammifère
Protéines de gènes à statut non défini			
bfl-1		?	mammifère

l'engagement ou non d'une cellule dans la voie de l'apoptose est le résultat d'un équilibre entre les formes pro-apoptotiques (essentiellement Bax et Bak) et les formes anti-apoptotiques (essentiellement Bcl-2 et Bcl-x_L) via des jeux multiples d'homo- ou hétérodimérisation (Oltvai *et al*, 1996). De cette manière, le niveau d'expression d'inhibiteurs ou d'activateurs de l'apoptose dans une cellule, va déterminer la tendance de la cellule à entrer en apoptose, induite par divers stimuli. Quand l'hétérodimère Bcl-2/Bax prédomine, les cellules sont résistantes à l'apoptose. Tandis que la prépondérance de l'homodimère Bax/Bax favorise la survenue de l'apoptose, l'homodimère Bcl-2/Bcl-2 lui n'a pas d'effet protecteur (Figure 7B).

2) Des interactions existent très vraisemblablement avec d'autres protéines de la famille Bcl-2 et/ou des protéines non apparentées (Larsen, 1996). Par exemple, Bcl-2/Bax et Bcl-x_L/Bax peuvent interagir avec un troisième partenaire, Bad (Takayama *et al*, 1995). Cette protéine, contrairement à la plupart des autres membres de cette famille, ne possède pas de domaine d'ancrage membranaire. Elle semble capable de dissocier deux hétérodimères précipités en s'associant avec l'une et l'autre des protéines protectrices et libérant Bax. Ce déplacement abolit l'activité protectrice de Bcl-x_L, alors qu'il est sans effet apparent sur celle de Bcl-2.

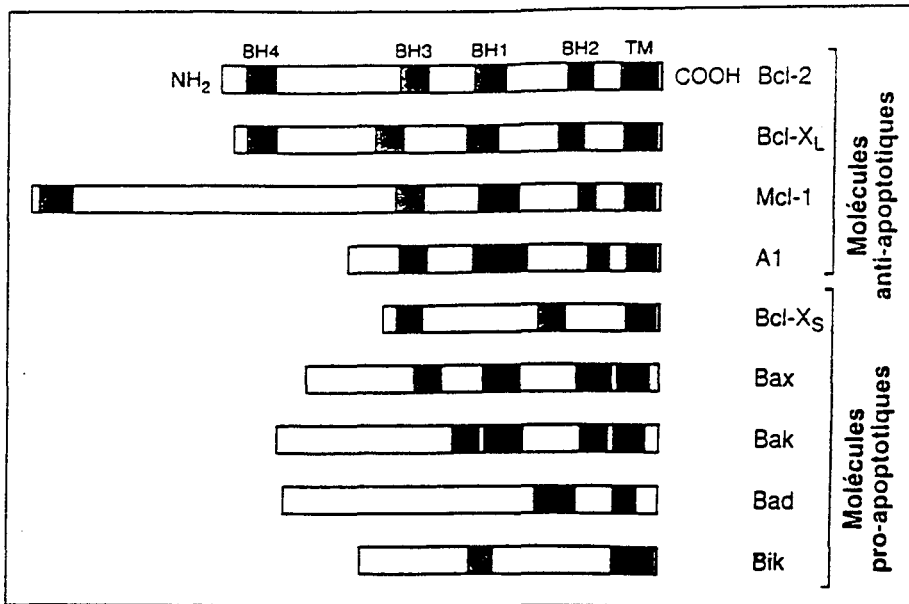


Figure 7A : Comparaison de la structure des protéines de la famille Bcl-2 (d'après Zha *et al*, 1996)

BH: Bcl-2 homology domain ; TM : domaine transmembranaire

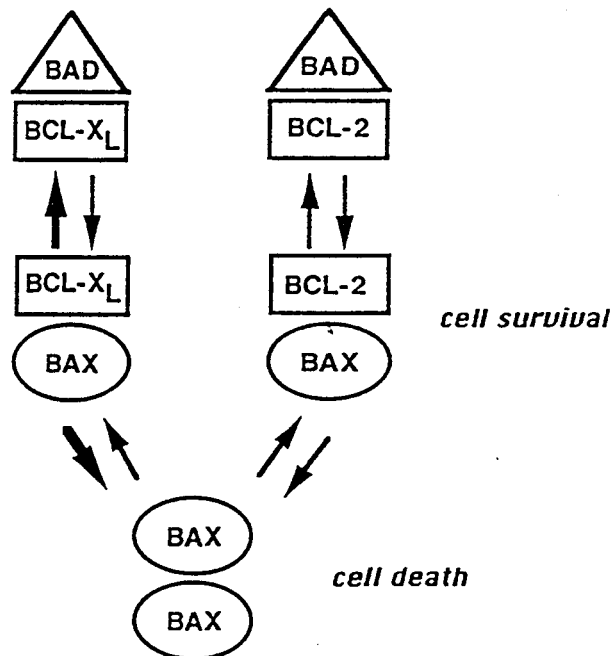


Figure 7B : Bad est un régulateur négatif de l'apoptose (d'après Yang et Korsmeyer, 1996).

Bad déplace Bax des hétérodimères Bcl2/Bax ou Bclx_L/Bax, permettant la formation d'homodimères Bax/Bax, qui favorise la mort.

3) Outre le niveau d'expression de chacun des membres de la famille, un autre facteur semble jouer un rôle très important : c'est l'état de phosphorylation des protéines (Gajewski, 1996). Ainsi, la phosphorylation de Bcl-2 semble inhiber ses fonctions anti-apoptotiques. Par contre, la phosphorylation de Bad, jouant un rôle essentiel dans sa localisation, aurait une fonction inverse. Une théorie récente avance que Bad, sous sa forme phosphorylée serait liée à la protéine cytosolique 14-3-3 et serait ainsi séquestrée dans le cytosol. En revanche, Bad, sous sa forme non phosphorylée, serait associé à Bcl-x_L et de ce fait, serait localisée au niveau des membranes intracellulaires. Bad serait ainsi la protéine cible des facteurs de survie. Ainsi, un des mécanismes par lesquels Bcl-2 et Bcl-x_L permettent la survie impliquerait un rôle de récepteurs pour les signaux émis dans la cascade d'événements contrôlant l'apoptose (Gajewski et Thompson, 1996)

Un autre mécanisme est suggéré par la structure 3D de Bcl-x_L, récemment déterminée. Cette analyse a révélé la présence de 2 hélices alpha hydrophobes centrales (Muchmore *et al*, 1996). Cette structure tertiaire présente des homologies avec les domaines de translocation membranaires de la colchicine et de la toxine diphtérique. Sachant que Bcl-2 et Bcl-x sont localisés sur la membrane externe de la mitochondrie, dans le réticulum endoplasmique, et la membrane nucléaire, ils pourraient donc former un pore impliqué dans l'homéostasie des organites cellulaires, particulièrement dans la mitochondrie. Ils protégeraient ainsi les cellules contre des changements électrochimiques qui se produisent sous des conditions physiologiques de stress. Bad interférerait avec l'assemblage ou la fonction de tels pores, ce qui éliminerait la capacité de Bcl-2 et Bcl-x_L à protéger les cellules de la mort (Gajewski, 1996). Au niveau de la membrane mitochondriale, les protéines Bcl-2/Bcl-x_L pourraient modifier la perméabilité à des protéines mitochondriales : le cytochrome c ou le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) qui sont des facteurs apoptogéniques, sont libérés de l'espace intermembranaire mitochondrial et fuient vers le cytosol. Le cytochrome c apparaît dans le cytoplasme avant la dépolarisation de la membrane mitochondriale, qui est un phénomène assez tardif dans le déroulement de l'apoptose ; il induit l'activation de la cascade des protéases ICE/Caspases, et avant tout de la protéase CPP-32. En revanche, AIF, probablement une protéase de 50 kDa, est libéré plus tardivement, parallèlement à la dépolarisation de la membrane mitochondriale, et semble agir directement et indépendamment des caspases. Ce mécanisme d'action, encore largement incompris, reste à éclaircir (Kahn, 1997). Outre la libération de AIF et du cytochrome c, il existe plusieurs conséquences de la modification de la perméabilité mitochondriale : la rupture du potentiel transmembranaire mitochondrial, le changement du potentiel redox principalement (avec la déplétion de glutathion réduit et hyperproduction de l'anion superoxyde), la modification du métabolisme énergétique (déplétion de

NAD(P)H₂ et d'ATP) et la compartimentalisation des ions (Kroemer, 1997). Ces processus favorisent eux-même le système, créant ainsi une boucle rétroactive positive. Bcl-2 peut soit agir en inhibant l'ouverture des pores ou rompre une ou plusieurs boucles rétroactives auto-amplificatrices (par exemple, en influençant la libération du cytochrome c).

Le mécanisme exact par lequel Bcl-2 inhibe la modification de perméabilité est inconnu.

c) c-Myc

L'oncogène c-myc, une des clés de la régulation de la prolifération cellulaire, intervient dans la régulation de l'apoptose. La première démonstration directe montrant que c-myc est impliqué dans l'apoptose provient d'une étude réalisée sur une lignée cellulaire IL-3 dépendante (32D.3). En effet, suite à une privation en IL-3, l'expression de c-myc est diminuée parallèlement à une accumulation de ces cellules en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire, suivie d'une mort par apoptose (Askew *et al*, 1991). Par ailleurs, le groupe d'Evan a montré que dans des fibroblastes, une forte expression de c-myc parallèlement à une privation en sérum induisait l'apoptose (Evan *et al*, 1992).

La protéine agit comme un facteur de transcription. En effet, myc possède un domaine de transactivation et un domaine en hélice-boucle-hélice contenant un motif «leucine-zipper», lui permettant de s'hétérodimériser avec la protéine Max. L'hétérodimère Max-Myc serait un régulateur de l'expression de gènes spécifiques impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose (Amati *et al*, 1994). Deux modèles permettraient d'expliquer la survenue de l'apoptose induite par c-myc : selon le premier, l'apoptose survient lorsqu'il existe un découplage entre des niveaux élevés d'expression de c-myc et la disparition de signaux mitogéniques. Selon le second, c-myc induit à la fois un programme de prolifération et d'apoptose. L'orientation vers l'apoptose serait le résultat d'un manque de facteur de survie, comme des cytokines ou Bcl-2 (Yang et Korsmeyer, 1996).

Ainsi, ces observations suggèrent que l'activation du protooncogène c-myc, provoquant sa surexpression, pourrait provoquer la mort quand les facteurs paracrines sont déplétés. Cependant quand il y a survenue simultanée ou additionnelle d'événements supprimant la mort, comme la surexpression de Bcl-2, elle mènerait à la carcinogenèse (Yang et Korsmeyer, 1996).

c-Myc jouerait donc un rôle très important dans l'aiguillage de la cellule vers le choix de la prolifération ou de la mort.

d) P53

La protéine P53 est une phosphoprotéine nucléaire, produit d'un gène suppresseur de tumeur. Son inactivation par mutation ou délétion génique, ou par liaison à une protéine virale (antigène T de SV40) ou cellulaire (MDM2) est observée dans une grande partie des tumeurs humaines (Solary *et al*, 1993).

Elle joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, en particulier au cours de la transition de la phase G1/S du cycle cellulaire. Ainsi, P53 contrôle la transcription de gènes spécifiques tels que GADD45 (Growth Arrest related to DNA Damage) et p21^{WAF1/Cip1}, qui concourent séparément à empêcher la progression du cycle cellulaire de G1 à S (le gène p21^{WAF1/Cip1} code pour une protéine qui, en se fixant à une kinase cycline-dépendante (Cdk-2), inhibe la réplication de l'ADN). Cet arrêt forcé en phase G1 permet à la cellule de réparer son ADN, évitant ainsi la perpétuation de la mutation dans les cellules filles (Harrison *et al*, 1995).

D'autre part, P53 est capable d'induire l'apoptose (Oren *et al*, 1992). En effet, la surexpression de P53 sauvage dans une lignée myéloïde murine induit une mort par apoptose. Cet effet peut être inhibé par l'IL-6 (Yonish-Rouach *et al*, 1991). Bien que les mécanismes impliqués dans cette induction soient encore mal connus, il semble que le rôle de régulateur de la transcription médié par P53 soit primordial. En particulier, P53 augmente l'expression du messager de Bax, parallèlement à une diminution de celui de Bcl-2 (Miyashita *et al*, 1994). Comme on l'a déjà rappelé, l'équilibre Bax/Bcl-2 joue un rôle clé dans l'apoptose. De plus, P53 est capable de réprimer la transcription de c-myc mais aussi de c-fos et de c-jun.

Par ailleurs, il semble que l'implication de P53 dans le processus apoptotique soit dépendant du type d'inducteur et que l'on puisse distinguer des voies dépendantes et indépendantes de P53. Par exemple, des thymocytes murins déficients en p53 présentent une résistance à l'apoptose induite par une irradiation ou par l'étoposide. En revanche, la sensibilité de ces thymocytes aux glucocorticoïdes, à une stimulation du TCR ou aux ionophores calciques reste inchangée, indiquant bien qu'il doit exister plus d'un mécanisme de transduction du signal apoptotique dans les thymocytes. En conclusion, il semble que p53 soit surtout essentielle à l'initiation d'une mort par apoptose induite par des cassures de l'ADN (White, 1996 ; Bettaïeb et Laurent, 1997)

Ainsi la p53 agit physiologiquement comme un gardien du génome cellulaire, selon le terme employé par Lane (1992). Si l'ADN est altéré, la p53 s'accumule et bloque le cycle cellulaire en G1 pour permettre au système de réparation de fonctionner. Si les lésions de l'ADN persistent ou si la cellule ne reçoit pas de signaux appropriés, la p53 pourrait induire l'apoptose. Si la p53 est absente, mutée, ou inactivée, la cellule ne s'arrête pas pour réparer son génome. Mutations et réarrangements chromosomiques s'accumulent alors et conduisent à la sélection de clones malins .

E. APOPTOSE ET PATHOLOGIE

Au regard de ces nombreuses implications physiologiques, il est logique que toute dérégulation de ce programme de mort ait des conséquences néfastes sur l'organisme. De nombreuses maladies sont en effet liées à l'incapacité de certains types cellulaires à entrer en apoptose d'où une survie néfaste pour l'organisme (c'est le cas du cancer et des maladies auto-immunes), inversement, un emballement du système entraîne la mort inconsidérée de cellules non vouées normalement à disparaître (c'est le cas du SIDA et des maladies neuro-dégénératives) (Tableau X).

1) Conséquences d'un excès d'apoptose

Le SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquisée) induit par le virus HIV est sans doute l'exemple majeur de déplétion cellulaire associée à une infection virale. Il entraînerait la diminution de certaines populations cellulaires comme les lymphocytes T CD4+, principale cible de l'infection virale, et celle des neurones cérébraux. Il a été montré que CD4 agit comme un récepteur pour l'attachement viral ce qui facilite l'infection par HIV au niveau des LT CD4+. De façon surprenante, la plupart des cellules qui meurent pendant l'infection par le virus ne sont pas forcément infectées. Des données récentes suggèrent que la liaison du produit viral soluble gp120 sur le récepteur CD4 agit comme une pré-stimulation des lymphocytes T non infectés dont l'apoptose serait induite dès l'activation du TCR (pour T Cell Receptor) (Ameisen *et al*, 1995).

Plusieurs maladies neurodégénératives sont associées à un excès de mort par apoptose :

Dans la maladie d'Alzheimer, les neurones de l'hippocampe meurent prématurément par apoptose ce qui entraîne une perte progressive et irréversible de la mémoire et du 'cognitif'. Bien que ce qui provoque ce suicide précoce soit encore inconnu, il semblerait que le dépôt de peptide β -amyloïde en soit responsable (Loo *et al*, 1993).

Dans l'atrophie musculaire spinale, il semblerait que la perte de motoneurones au niveau de la moelle épinière soit liée à un défaut dans le gène qui code pour une protéine d'inhibition de l'apoptose (NAIP pour Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein), homologue d'un inhibiteur de l'apoptose viral connu (IAP pour Inhibitor of Apoptosis Protein). La perte de l'effet protecteur anti-apoptotique de NAIP permettrait peut-être à l'apoptose des motoneurones de s'effectuer (Bredesen, 1995).

Tableau X : Apoptose et pathologie

Maladies associées à l'inhibition de l'apoptose	
Cancer	<ul style="list-style-type: none"> - lymphome folliculaire - carcinomes avec des mutations p53 - tumeurs hormono-dépendantes : <ul style="list-style-type: none"> - cancer du sein - cancer de la prostate - cancer de l'ovaire
Maladies autoimmunes	<ul style="list-style-type: none"> - lupus érythémateux systémique (LES) - forme autoimmune de glomérulonéphrite - diabète de type I
Infections virales	<ul style="list-style-type: none"> - virus de l'Herpes - virus de la Variole - Adenovirus
Maladies associées à une augmentation de l'apoptose	
Maladie du système immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> - SIDA
Maladies neurodégénératives	<ul style="list-style-type: none"> - maladie d'Alzheimer - maladie de Parkinson - maladie de Creutzfeld-Jakob - maladie de Huntington - sclérose latérale amyotrophique (SLA) - rétinite pigmentaire - dégénérescence cérébelleuse
Syndrome myélodysplasique	<ul style="list-style-type: none"> - anémie aplasique
Lésions ischémiques	<ul style="list-style-type: none"> - infarctus du myocarde - congestion cérébrale - lésions après reperfusion
Pathologies hépatiques provoquée par une toxine	<ul style="list-style-type: none"> - alcoolisme
Autres	<ul style="list-style-type: none"> - vieillesse

2) Conséquences d'un manque d'apoptose

Par ailleurs, certaines maladies pourraient être associées à un défaut d'apoptose. C'est le cas de nombreux cancers pour lesquels un défaut de mort cellulaire apoptotique aurait des conséquences tout aussi importantes que la croissance exagérée qui, au départ, était la seule à être envisagée. Deux défauts génétiques, associés de façon importante aux désordres prolifératifs (p53 et bcl-2, voir le chapitre I-G) sont à présent connus pour être les régulateurs de ce processus. Quand p53 n'est plus fonctionnel, l'apoptose ne se produit plus, en partie à cause de la perte des points de contrôle du cycle cellulaire et par défaut d'activation transcriptionnelle de gènes qui vont promouvoir la mort (comme bax). La surexpression de protéines inhibitrices de la mort comme Bcl-2, observée dans la plupart des lymphomes folliculaires en conséquence d'une translocation chromosomique t(14 ;18), retarde également le processus d'élimination normal et mène à une accumulation cellulaire.

Un autre exemple de défaut d'apoptose est illustré par les maladies autoimmunes, où des lymphocytes autoréactifs apparaissent pendant le développement ou consécutivement à une réponse immune. Le lupus érythémateux est une forme de maladie auto-immune qui impliquerait un échec complet de l'exécution de l'apoptose. En effet, la plupart des auto-anticorps produits pendant la maladie, reconnaissent des épitopes situés à l'intérieur d'une série de polypeptides qui sont les cibles de clivages protéolytiques au cours des processus apoptotiques normaux.

Enfin, des infections virales persistantes sont maintenues et se développent car la réponse normale de la cellule hôte, qui devrait disparaître par apoptose en réaction à l'infection virale, est supprimée par les produits de gènes viraux (comme la protéine E1B-19K, les IAP viraux ou la protéine p35 du baculovirus chez les insectes)(Theodoro et Branton, 1996 et Cuff et Ruby, 1996).

Ainsi, en raison de l'importance des conséquences produites par un manque ou un excès d'apoptose en pathologie humaine, il est primordial d'en mieux connaître les mécanismes moléculaires afin de pouvoir développer des thérapies adaptées et efficaces contre toutes ces maladies.

F. APOPTOSE : SON IMPLICATION DANS LE TRAITEMENT DU CANCER

Comme on l'a déjà évoqué, le processus de mort cellulaire est maintenant connu comme étant un composant important de la carcinogenèse : la progression tumorale serait, dans de nombreuses circonstances, davantage la conséquence d'un taux diminué de mort cellulaire que d'une prolifération augmentée (dans le lymphomes folliculaires par exemple). Quatre catégories d'interventions non chirurgicales couramment utilisées dans le traitement de patients cancéreux,

la chimiothérapie, le traitement par radiations, le traitement biologique et la thérapie génique impliquent la mort par apoptose des cellules cancéreuses (Mc Donnell, 1995)

1) Les résultats récents concernant la chimiothérapie ont permis d'établir que la plupart (sinon tous) les agents anticancéreux agissent en induisant l'apoptose dans les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*. Des avancées dans la connaissance des mécanismes impliqués pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles et le développement d'agents anticancéreux plus spécifiques (Hannun, 1997).

2) La thérapie biologique est basée sur l'utilisation de composants, comme des cytokines ou des anticorps, dans le but de contrôler la croissance cellulaire. En effet, certaines cytokines spécifiques, qui inhibent la croissance cellulaire, induisent aussi l'apoptose (IL-4, IL-10, TGF β , TNF α ,). Il est également possible de bloquer ou déléter l'action d'une cytokine connue comme étant nécessaire pour la croissance ou la survie d'un type de tumeur donné en utilisant des récepteurs de cytokine soluble, un antagoniste du récepteur, ou un anticorps monoclonal anti-cytokine pour inhiber les interactions récepteur-ligand. La stratégie basée sur l'activation de l'antigène Fas/APO-1 est également un recours (McDonnell *et al*, 1995).

3) la thérapie génique est une stratégie impliquant la correction directe d'anomalies génétiques anormales (dans le cas de défauts génétiques récessifs, le but est d'augmenter la fonction de l'allèle normal pour produire le phénotype normal dans la cellule ; Dans le cas de défauts génétiques dominants, le but est d'abolir la fonction de gènes anormaux). Par exemple, il est envisagé d'utiliser un antisens de Bcl-2, ou de BCR/ABL, ou encore de remplacer la fonction sauvage de p53 par un rétrovirus défectueux pour la fonction de réplication et exprimant la p53 sauvage (Mc Donnell *et al*, 1995).

Chapitre II :

LES RECEPTEURS NUCLEAIRES IMPLIQUES DANS L'APOPTOSE

A. GENERALITES

1) Définition

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription dont l'activité est régulée par un ligand (Wahli et Martinez, 1991). Ils constituent une superfamille, qui à ce jour, englobe plus de 150 membres (Figure 8A). Elle couvre une large diversité d'espèces animales, du ver à l'insecte et à l'homme. Leur structure, conservée dans l'évolution, suggère qu'ils ont un rôle primordial en tant qu'intermédiaire entre une panoplie complexe de signaux extracellulaires et la réponse transcriptionnelle qui en découle (Mangelsdorf *et al*, 1995).

Le premier récepteur nucléaire cloné a été le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) en 1985 (Hollenberg *et al*, 1985). Puis le clonage d'autres récepteurs nucléaires comme ceux des oestrogènes (ER), de la progestérone (PR), et de la vitamine D (VDR) ont permis de mettre en évidence les fortes homologues de structure entre toutes ces protéines. Cette notion de superfamille confirme la notion de caractère commun du mécanisme d'action des hormones stéroïdes mais aussi des vitamines liposolubles (vitamines A et D).

La superfamille des récepteurs nucléaires est composée de deux groupes principaux : d'une part, celui comprenant les récepteurs aux hormones stéroïdes : oestrogènes (ER), progestérone (PR), androgènes (AR), glucocorticoïdes (GR), minéralocorticoïdes (MR) et ecdystéroïdes chez les Invertébrés et d'autre part, celui regroupant les récepteurs aux hormones non stéroïdiennes, c'est à dire thyroïdiens (TR), à la vitamine D3 (VDR) et aux rétinoïdes (RAR et RXR) principalement (Figure 8B) (Mangelsdorf *et al*, 1995).

La phylogénie de tous ces récepteurs est reprise dans la figure 8B. Contrairement aux hormones hydrophiles et aux facteurs de croissance qui eux se lient à des récepteurs de surface membranaires, ces hormones et vitamines, ligands de ces récepteurs, sont de petites molécules liposolubles peuvent traverser la bicouche lipidique membranaire pour ensuite interagir avec leurs récepteurs intracellulaires. Le complexe ligand-récepteur formé provoque une cascade

d'événements dont le point culminant est la réponse cellulaire à l'effet de l'hormone ou de la vitamine : la liaison du ligand au récepteur induit un changement conformationnel de la protéine, le complexe formé devient alors compétent pour une fixation à des sites spécifiques de la chromatine, appelés éléments de réponse ou HRE (pour « hormone responsive element ») : le récepteur peut alors moduler la transcription par un processus non encore clairement établi.

Outre les récepteurs aux hormones stéroïdes, thyroïdes, des rétinoïdes et de la vitamine D, la superfamille des récepteurs nucléaires comprend un nombre toujours croissant de récepteurs dits orphelins, pour lesquels aucun ligand n'a été identifié. D'autres types de signaux tels des nutriments ou des intermédiaires du métabolisme pourraient cependant activer certains de ces orphelins.

La mise en jeu de l'interaction protéines-protéines (dissociation de corépresseurs, recrutement de coactivateur) fait l'objet de recherche intense (Glass *et al*, 1997).

2) Organisation structurale

Les récepteurs nucléaires présentent tous la même structure générale et se composent de six domaines fonctionnels distincts notés de A à F (pour revues : Evans, 1988 ; Green et Chambon, 1988, Figure 9A). Ils présentent des degrés de conservations divers, le domaine C étant le plus conservé (Figure 9B). Deux domaines, C et E, sont essentiels à leur fonction. Le domaine C ou DBD (« DNA binding domain ») est le domaine de liaison à l'ADN, il est composé de deux domaines en doigts de zinc ; le domaine E ou LBD (« ligand binding domain ») est le domaine de liaison des ligands, il assure la spécificité et la sélectivité de la réponse physiologique. Ces domaines C et E sont reliés entre eux par le domaine D qui contribue à la fois à la liaison de l'ADN du ligand et de corépresseurs, mais conférerait également une flexibilité entre les deux domaines. D'autres fonctions mettent en jeu plusieurs domaines à la fois, c'est le cas de la dimérisation portée par les domaines C et E. Deux motifs de transactivation (AF1 et 2 pour activation fonction 1 et 2) ont été caractérisés. L'un, localisé dans le domaine A/B, est dit constitutif ; le second est ligand-dépendant et localisé dans le domaine E, c'est une région impliquée dans la liaison de co-activateurs. Une séquence signal de transfert nucléaire a été identifiée dans le domaine D. Le domaine F ne semble pas porter de fonction connue, il n'est d'ailleurs pas présent dans tous les récepteurs (Mangelsdorf, 1995). Dans le cas du récepteur aux oestrogènes, le domaine F serait impliqué dans la liaison d'un ligand antagoniste (Montano *et al*, 1995).

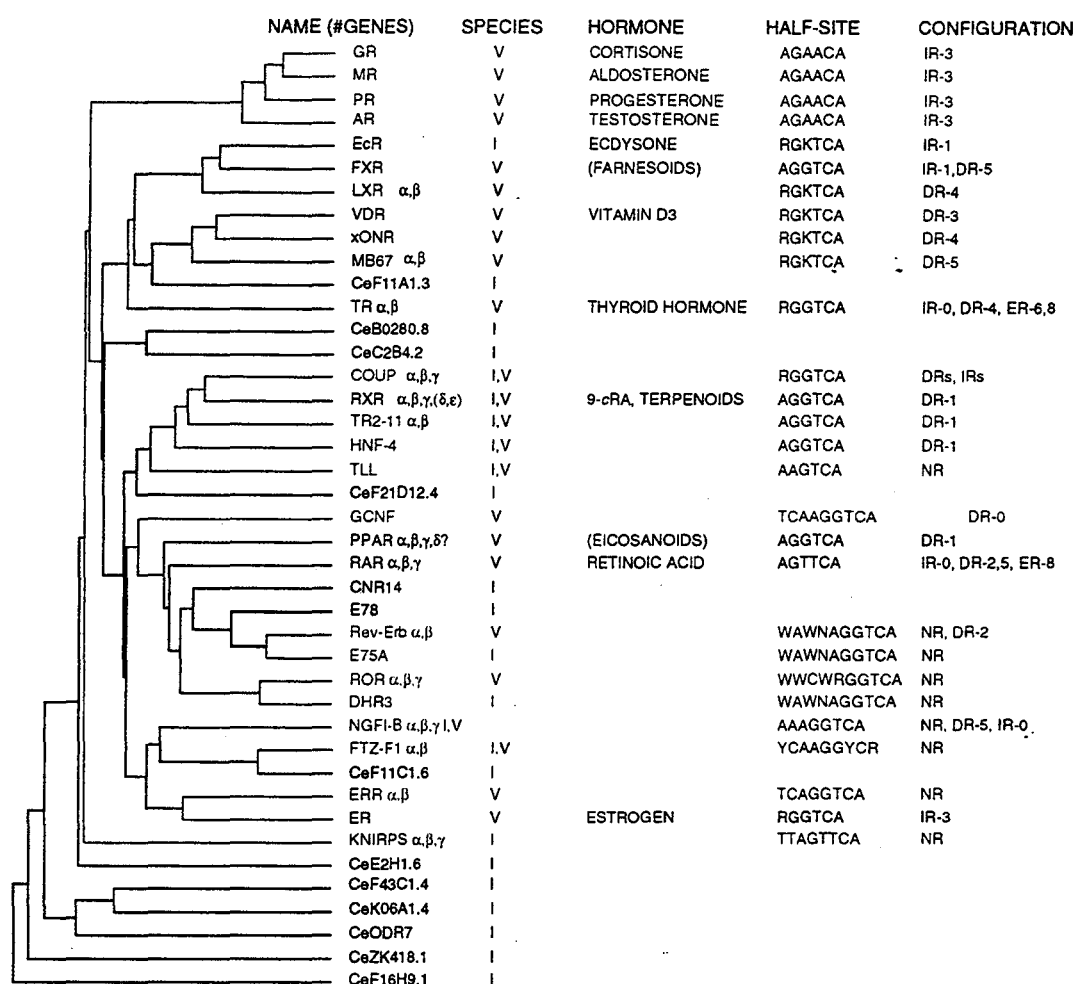


Figure 8A : Membres connus de la superfamille des récepteurs nucléaires (d'après Mangelsdorf *et al*, 1995).

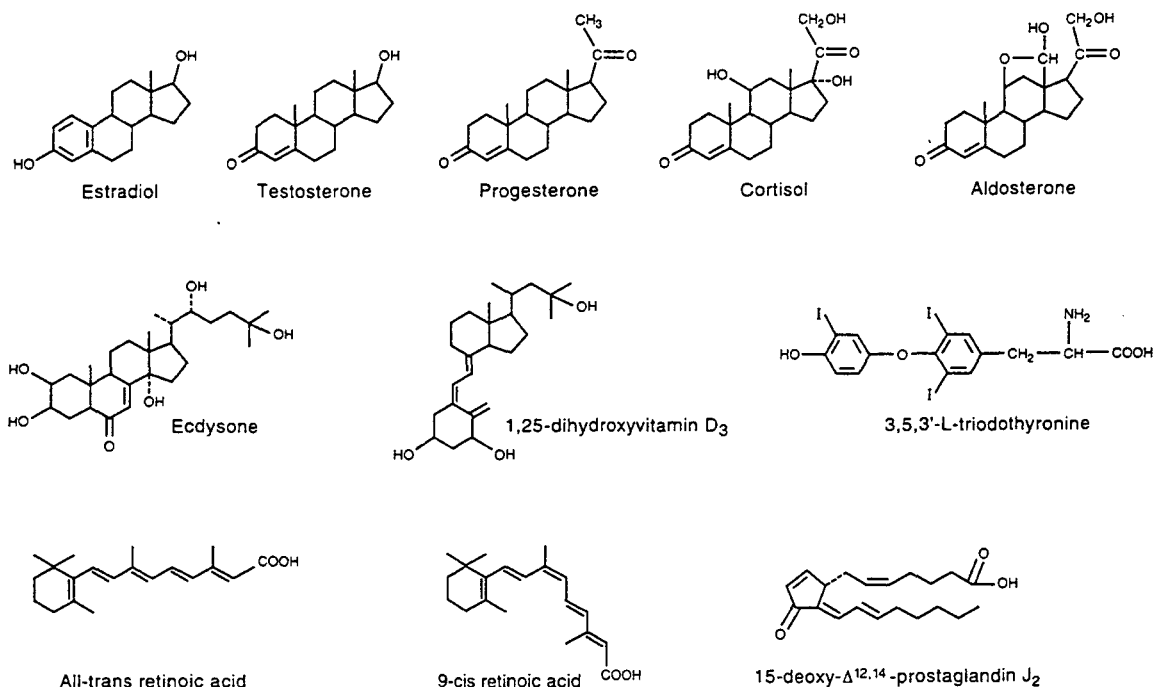


Figure 8B : Structures de ligands connus pour les récepteurs d'hormones nucléaires (d'après Mangelsdorf *et al*, 1995).

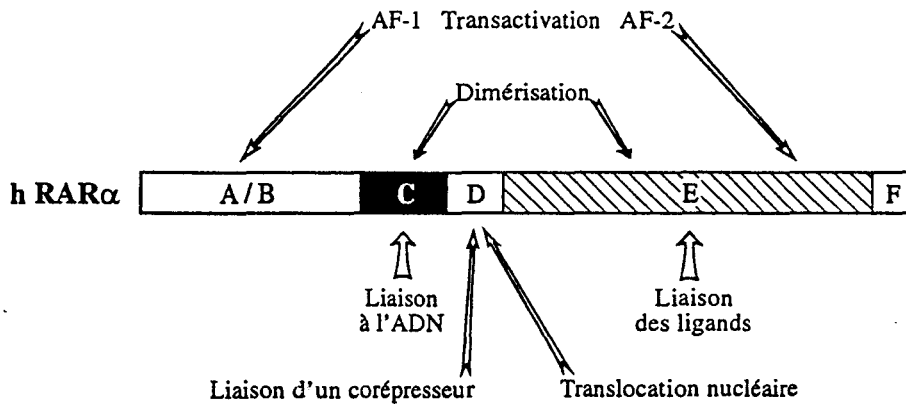


Figure 9A : Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires

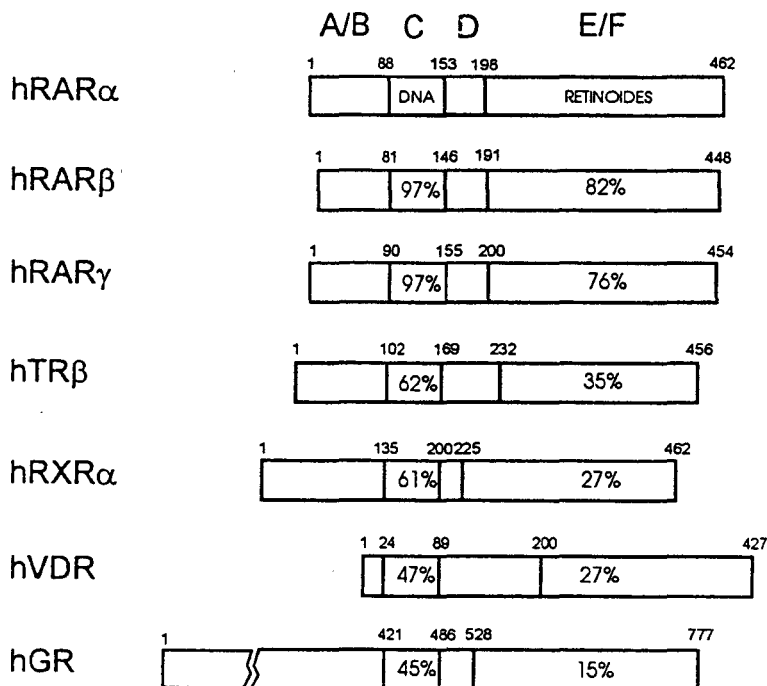


Figure 9B : Homologies de séquence des différents domaines de hRAR α et ceux des autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. (d'après Mangelsdorf *et al*, 1994).

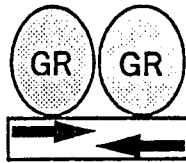
La liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires est une étape cruciale du processus de transduction du message hormonal. Ces récepteurs nucléaires se lient sous forme de dimères à des séquences d'ADN appelées « éléments de réponse » ou HRE. Ces HRE sont présents dans la région promotrice des gènes cibles. Elles sont configurées en une variété de motifs structurés différents qui leur confèrent une spécificité et un caractère unique pour un dimère de récepteurs donné. Ainsi, les récepteurs stéroïdiens se lient sous forme d'homodimères sur des HRE qui se composent de deux séquences nucléotidiques de reconnaissance (AGGTCA) orientées en palindrome. D'autres récepteurs ont comme partenaire le RXR avec lequel ils forment des hétérodimères et se lient à des éléments de réponse en répétition directe séparés d'un nombre précis de nucléotides (Stunnenberg, 1993). Ainsi, un DR5 (répétition directe d'un élément de réponse, séparés de 5 nucléotides) et un DR2 servirait d'HRE pour l'hétérodimère RAR-RXR, un DR1 sert d'HRE pour l'homodimère RXR-RXR (Forman *et al*, 1995).

La superfamille des récepteurs nucléaires peut être divisée en 3 classes selon leurs propriétés de liaison du ligand, de liaison à l'ADN et de dimérisation (Figure 10) : les récepteurs de classe I (récepteurs stéroïdiens) se lient sous forme d'homodimère sur des HRE composés de deux séquences nucléotidiques orientées en palindrome. Les récepteurs de classe II hétérodimérisent avec RXR et se lient à des HRE en répétitions directes (bien que certains soient capables de se lier à des répétitions symétriques). Les récepteurs de classe III (récepteurs orphelins monomériques) se lient sous forme de monomères à des demi sites HRE. Toutefois, ces récepteurs orphelins peuvent dans certains cas s'hétérodimériser avec RXR (Perlmann et Jansson, 1995).

3) Récepteurs nucléaires et apoptose

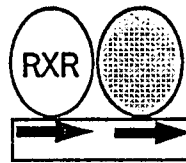
Vitamines et hormones se liant aux récepteurs nucléaires sont de puissants régulateurs du développement, de la différenciation cellulaire et de la physiologie des organes. Leur dérégulation peut également être associée à de graves pathologies humaines (cancers hormono-dépendants, leucémie aiguë à promyélocytes), la plupart d'entre eux sont la cible de médicaments utilisés en thérapeutiques. Ces effets s'exercent par une modulation de la prolifération, de la différenciation ou de l'apoptose. L'implication des récepteurs nucléaires dans ce dernier processus est tout à fait variable.

Type I
Récepteurs Stéroïdiens



Récepteurs
Homodimères
HRE Palindrome

Type II
Récepteurs des Rétinoïdes,
de la Vitamine D, et
des Hormones Thyroïdiennes;
NGFI-B



Récepteurs
Hétérodimères
HRE Répétition Directe

Type III
Récepteurs Orphelins
NGFI-B, ROR,...



Récepteurs
Monomères
HRE Demi-Site

Figure 10 : Trois groupes de récepteurs suivant leur configuration sur l'ADN (type I et II d'après Stunnenberg, 1993)

D'une manière générale, les résultats concernant les récepteurs aux hormones stéroïdes ne sont ni clairs ni constants : leur action sur la régulation de l'apoptose varie en fonction du modèle utilisé (Streichert *et al*, 1997 et Low *et al*, 1997 pour l'exemple des ecdystéroïdes), si elle existe, elle est souvent indirecte (Nagasue *et al*, 1996 pour l'exemple des AR) ou la conséquence d'une combinaison avec d'autres agents (Arnett *et al*, 1996 pour l'exemple des oestrogènes). Les glucocorticoïdes représentent une exception puisqu'ils constituent un modèle spectaculaire d'induction de l'apoptose dans les thymocytes (Iwata, 1995) comme nous le verrons plus loin.

Concernant les récepteurs non stéroïdiens, le récepteur à la vitamine D est clairement impliqué dans l'apoptose. En effet, de nombreux travaux montrent l'effet d'inducteur apoptotique de cette hormone dans des modèles de tumeurs mammaires, principalement dans les cellules de la lignée MCF-7 (Narvaez *et al*, 1996, Simboli-Campbell *et al*, 1997 et James *et al*, 1997 pour exemples). Elstner et son équipe (1996) ont récemment montré que la combinaison d'un analogue de la vitamine D3 avec le 9-cis-RA possédait une action synergique d'inhibition de la prolifération, d'induction de la différenciation et d'induction de l'apoptose dans la lignée cellulaire HL-60. Ces effets de la vitamine D se révèlent très prometteurs dans le cadre du traitement de certains cancers. Par ailleurs, la vitamine D peut avoir un rôle d'inhibiteur de l'apoptose : l'inhibition antisens de l'expression du récepteur de la vitamine D induit l'apoptose dans les cellules monoblastoïdes U937 (Hewison *et al*, 1996). Les rétinoïdes sont également des régulateurs importants de l'apoptose (ce sujet fait l'objet d'une revue particulière dans ce chapitre).

Enfin, concernant le récepteur orphelin, nur77 (récepteur stéroïdien orphelin, également appelé NGFI-B, N10, NAK-1 et TR3) est impliqué dans l'apoptose de lignées cellulaires T (thymocytes et hybridomes de cellules T) induites par activation du TCR. En effet, nur77 est rapidement et fortement induit après l'activation de thymocytes immatures. De plus, l'expression d'un antisens des transcrits nur77 empêche l'apoptose de cellules T induite par leur activation (Kastner et Chambon, 1995). D'autre part, il peut être exprimé par d'autres cellules qui n'évoluent pas vers l'apoptose. Il serait donc une molécule qui peut être utilisée comme faisant partie du mécanisme activateur de la machinerie induisant l'apoptose mais ne déclenchant pas l'apoptose dans tous les cas (Davis *et al*, 1991).

B. RECEPTEURS DES GLUCOCORTICOÏDES

Les glucocorticoïdes (GC) représentent une classe d'hormones stéroïdes qui jouent un rôle fondamental dans le contrôle physiologique, prolifératif et développemental de divers tissus animaux en régulant une diversité de gènes et de processus pléiotropiques complexes (Gustafsson *et al*, 1987). Ils ont également des applications médicales étendues pour leurs effets immunosup-

presseurs, anti-inflammatoires, et dans certaines cellules, cytostatiques. Ils sont pour cela des éléments clefs dans le traitement de diverses maladies autoimmunes, de leucémies lymphoblastiques, de lymphomes (Parillo et Fauci, 1979 ; Haynes, 1990) et du myélome multiple (Alexanian, 1983). En dépit de leur importance, l'utilisation des GC dans ces conditions est encore empirique et les mécanismes par lesquels passent ces effets bénéfiques restent à établir (Haynes, 1990). L'induction de la mort cellulaire par apoptose semble être un mécanisme important. Elle a été décrite dans de nombreux modèles comme les thymocytes immatures, les cellules pré-B et immatures et plusieurs lignées cellulaires leucémiques et myélomateuses (Iwata, 1995, Sarthou *et al*, 1995, Montague et Cidlowski, 1995 et Lichtenstein *et al*, 1995). L'involution thymique est d'ailleurs un test pharmacologique classique de l'activité des GC. Cependant, les GC sont également des inhibiteurs de l'apoptose dans d'autres modèles cellulaires comme les neutrophiles et les hépatocytes.

1) Glucocorticoïdes et induction de l'apoptose

L'induction de l'apoptose par les GC dans les thymocytes immatures est un élément important du processus de sélection thymique auquel les GC participent activement (Iwata *et al*, 1995). C'est un modèle spectaculaire d'étude de l'apoptose et un grand nombre d'expériences l'utilisant ainsi que de nombreuses descriptions et analyses de l'apoptose, basées sur son étude, ont été effectuées (Montague et Cidlowski, 1995). Cependant, la cascade d'événements classiquement décrite lors de cette apoptose, induite par les GC dans les thymocytes murins, n'est pas généralisable à tous les modèles cellulaires (Smith *et al*, 1995 ; Montague et Cidlowski, 1995).

Des expériences montrant que le RU486 (un puissant antagoniste de la dexaméthasone) est capable d'inhiber l'apoptose induite par les GC, indiquent que la mort cellulaire passe bien par le GR (Schwartzman et Cidlowski, 1994). Actuellement, deux modèles sont proposés pour expliquer l'induction de l'apoptose par les GC : 1) le modèle transcriptionnel dans lequel l'activation de la transcription et en particulier l'induction spécifique de l'expression de « gènes de mort » par les GC jouerait un rôle primordial dans le déclenchement de la cascade apoptotique ; 2) le modèle transrépressionnel, dans lequel interviendrait une inhibition de l'expression de gènes impliqués dans la survie de la cellule, probablement par interaction protéine-protéine entre le GR et d'autres facteurs de transcription tels que AP-1 (activator protein-1).

1) Afin de déterminer l'implication du modèle transcriptionnel, des travaux ont été menés pour caractériser les domaines du GR nécessaires à l'induction de l'apoptose. Les résultats sont controversés (Nazareth *et al*, 1991 ; Dieken et Miesfield, 1992) et ne permettent pas de déterminer de façon générale si la fonction transactivatrice du récepteur est nécessaire ou non pour

l'induction de l'apoptose. Aucune des nombreuses études entreprises pour l'identification de gènes dits « gènes de mort », spécifiquement induits par les GC, et indispensables au déroulement du processus d'apoptose (Osborne et Schwartz, 1994), n'ont pas débouché sur des résultats pouvant confirmer ce premier modèle. Seuls quelques gènes ont une expression modifiée par les GC (Briehl *et al*, 1990) : parmi eux, les plus importants sont c-myc, c-fos et c-jun.

Dans des lignées de myélome multiple, où la Dexaméthasone (Dex) agit comme un puissant agent anti-tumoral, Bcl-2 semble jouer un rôle majeur dans la résistance à l'apoptose induite par la Dex. En effet, l'induction de l'apoptose dans des cellules sensibles à la Dex s'accompagne en effet d'une diminution d'expression précoce des protéines Bcl-2 et P53. Par contre, les niveaux de Bcl-2 et de P53 restent inchangés dans les lignées cellulaires résistantes à la Dex (Hu et Gazzit, 1996).

Ces observations suggèrent que les GC agiraient plutôt en réprimant l'expression de certains gènes, en particulier ceux impliqués dans le cycle cellulaire comme c-myc plutôt qu'en induisant celle de nouveaux gènes. L'inhibition de l'expression de c-myc pourrait alors conduire à l'induction de l'expression de gènes, jusque là réprimés (Nazareth et Thompson, 1995). Par ailleurs, il est possible que les GC augmentent directement l'expression d'une protéase, responsable de la dégradation d'un répresseur de protéines impliquées dans la réalisation de l'apoptose (Montague et Cidlowski, 1995).

2) De façon plus probable, les premières étapes de la cascade apoptotique induite par les GC seraient corrélées à une répression transcriptionnelle de gènes « de survie » plutôt qu'à une activation de l'expression de gènes « de mort ». En effet, les travaux de Helmberg *et al* (1995) ont montré que des mutants de récepteurs des GC (défectueux pour l'activation de gènes) sont aussi efficaces que le récepteur sauvage lui-même pour la répression de l'activité de AP-1, l'inhibition de l'expression de c-myc et l'induction de l'apoptose. La répression transcriptionnelle pourrait être médiée par l'interférence avec d'autres facteurs de transcription, nécessaires pour la survie cellulaire, tel que AP-1. (Helmberg *et al*, 1995).

2) Glucocorticoïdes et inhibition de l'apoptose

Dans certains modèles, les GC ont un effet inhibiteur de l'apoptose. Par exemple, les GC prolongent la durée de vie, normalement courte des neutrophiles via l'inhibition de l'apoptose (Conrad Liles *et al*, 1995). Le mécanisme par lequel les GC exercent cet effet reste à établir. Cox et Austin (1997) ont montré qu'il impliquait nécessairement la stimulation continue de nouvelles synthèses protéiques. Une élévation transitoire du niveau du Ca^{2+} libre cytosolique, une modula-

tion de l'expression de P53 ou Bcl-2 sont des événements qui inhibent également l'apoptose des neutrophiles et qui pourraient être des médiateurs des GC.

Chaya *et al* (1996) ont également montré l'effet inhibiteur de la Dexaméthasone dans le processus d'apoptose spontanée de lignées cellulaires d'hépatome de rat. Dans ce cas, la Dex agirait en maintenant des contacts cellule-cellule, normalement nécessaires pour la survie de différents types cellulaires épithéliaux.

Enfin, alors que les GC, seuls, induisent fortement l'apoptose des hybridomes de cellules T, ils inhibent l'apoptose induite par l'activation du complexe TCR/CD3 en empêchant la régulation positive de l'expression du ligand Fas (Iwata *et al*, 1992). Cet antagonisme serait médié par l'interaction physique et fonctionnelle entre le GR et des facteurs de transcription tels que AP-1 (Zacharchuk *et al*, 1990 dans Yang, 1993).

C. RECEPTEURS DES RETINOÏDES

1) Les rétinoïdes

La vitamine A (ou rétinol) est la principale source naturelle des rétinoïdes. Elle intervient dans de nombreux processus biologiques tels que la reproduction, la croissance, les mécanismes de la vision, la différenciation des cellules épithéliales, les fonctions immunes et constitue pour cela un facteur nutritionnel indispensable. La déficience en vitamine A est d'ailleurs cause de nombreuses maladies, d'une cécité, et même de la mort. Les effets de la vitamine A sont médiés par certains dérivés physiologiques dont l'acide rétinoïque tout-trans (ATRA) et son isomère, l'acide 9-cis rétinoïque (9-cis RA). Leur mécanisme d'action passe par la liaison à deux types de récepteurs nucléaires, RAR et RXR (Figure 11).

L'acide rétinoïque présente une diversité d'effets étonnante par son implication dans la morphogénèse, l'inhibition de la prolifération, l'induction de la différenciation et, mise en évidence plus récemment, l'induction de l'apoptose. Il suscite pour cela un intérêt considérable dans de nombreux domaines de la recherche et dans la chimiothérapie de certains cancers.

2) Rétinoïdes naturels et synthétiques

Les rétinoïdes sont des molécules globalement hydrophobes dont la structure est subdivisée en trois parties : une extrémité cyclique terminale hydrophobe, une chaîne polyénique, et une extrémité polaire porteuse du groupement fonctionnel carboxylique.

La structure de la vitamine A, découverte par Karrer *et al* en 1931, a constitué le point de départ pour l'identification de métabolites dérivés naturels, autre que l'ATRA, et pour la synthèse de composés analogues sur le plan structural à la vitamine A, mais moins toxiques et plus efficaces.

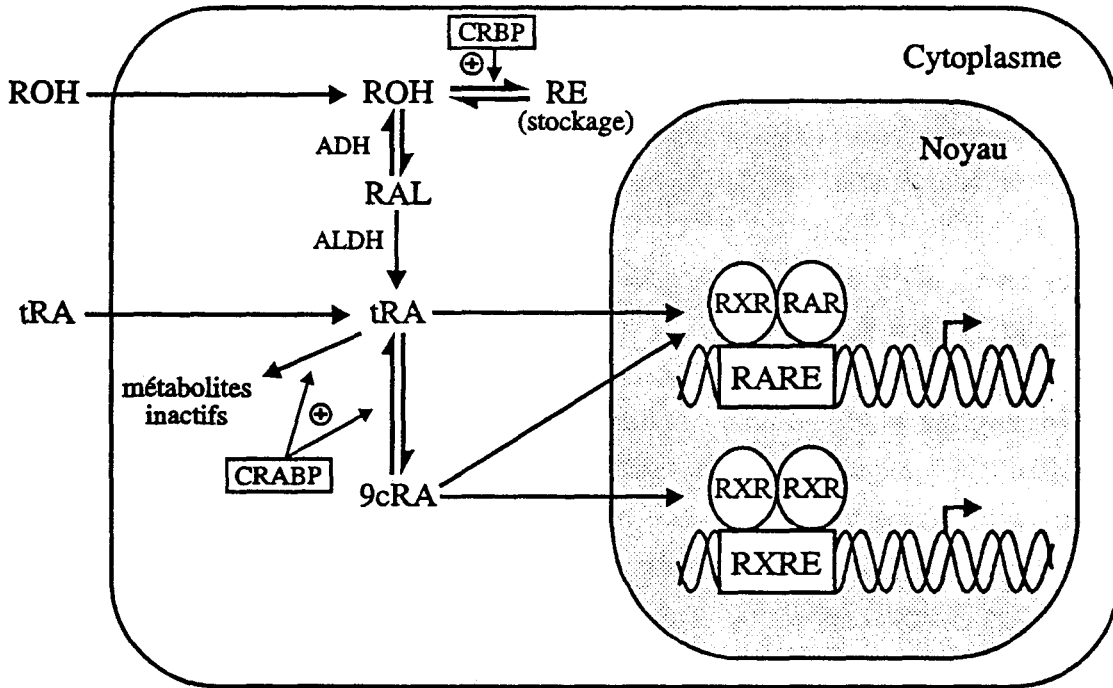


Figure 11 : Mécanisme d'action des rétinoïdes dans la cellule
(d'après Mangelsdorf *et al*, 1994)

ROH : rétinol

RAL : rétinol

t-RA : acide rétinoïque tout trans

9-cis RA : acide rétinoïque 9-cis

RE : rétinyl ester

ADH : alcool deshydrogénase

ALDH : aldéhyde deshydrogénase

CRABP : cellular RA binding protein

CRBP : cellular ROH

RAR : retinoic acid receptor

RXR : retinoid-X receptor

a) Dérivés naturels et biologiquement actifs

Il existe un grand nombre de métabolites dérivés directement de l'acide rétinoïque ou plus largement du rétinol (Blaner et Olson, 1994). Parmi ces molécules naturelles, certaines sont de simples produits du catabolisme, mais d'autres sont pourvues d'une activité biologique propre. Par exemple, le rétinaldéhyde, issu du rétinol, est une molécule impliquée dans le processus de la vision nocturne, le 14-hydroxy-retro-rétinol (14-HPR), également issu du rétinol, peut médier des messages intracellulaires indispensables à la croissance (Buck *et al.*, 1991) (Figure 12A). L'isomère en 9-cis de l'ATRA, l'acide 9-cis rétinoïque, semble jouer un rôle dans le contrôle de nombreuses voies métaboliques ainsi que dans la morphogenèse (Zhang *et al.*, 1990; Mangelsdorf *et al.*, 1994). Enfin, le dérivé 13-cis RA est souvent utilisé en thérapeutique (sous le nom d'isotrétinoïne). Cette diversité de métabolites actifs contribue à la diversité des effets médiés par la vitamine A.

b) Rétinoïdes de synthèse

Les effets des rétinoïdes en font des agents thérapeutiques prometteurs, mais leur utilisation est restée limitée à quelques pathologies graves, en raison de leur toxicité qui est la source d'effets secondaires importants. C'est l'une des raisons du développement de la recherche de rétinoïdes synthétiques moins toxiques mais aussi efficaces que les molécules naturelles.

Ainsi, il existe à présent des ligands sélectifs de divers sous-types de RAR : RAR α , RAR β et RAR γ (Delescluse *et al.*, 1991 ; Martin *et al.*, 1992) ou bien des ligands spécifiques de RXR. Il existe aussi des ligands synthétiques à activité antagoniste des récepteurs RAR α (Apfel *et al.*, 1992) ou RAR α et β (Eyrolles *et al.*, 1994). Ces ligands spécifiques fournissent des outils d'étude des récepteurs qui permettent de disséquer les différents effets induits par les rétinoïdes *in vivo*. (Figure 12B).

3) Les protéines intracellulaires liant les rétinoïdes

a) Les récepteurs à l'acide rétinoïque

L'AR tout-trans (ATRA) et 9-cis sont des ligands physiologiques des récepteurs nucléaires de l'AR qui sont d'une part les RARs (pour Retinoic Acid Receptor) et d'autre part les RXRs (pour Retinoid X Receptor). L'ATRA et l'9-cis RA activent de la même manière les RARs tandis que l'activation de RXR par l'ATRA est 50 fois plus faible que par l'9-cis RA. Les récepteurs de l'AR peuvent fonctionner sous forme d'hétérodimères RAR/RXR ou d'homodimères RXR/RXR en présence de 9-cis RA. RXR, cependant, peut aussi former des hétérodimères avec d'autres

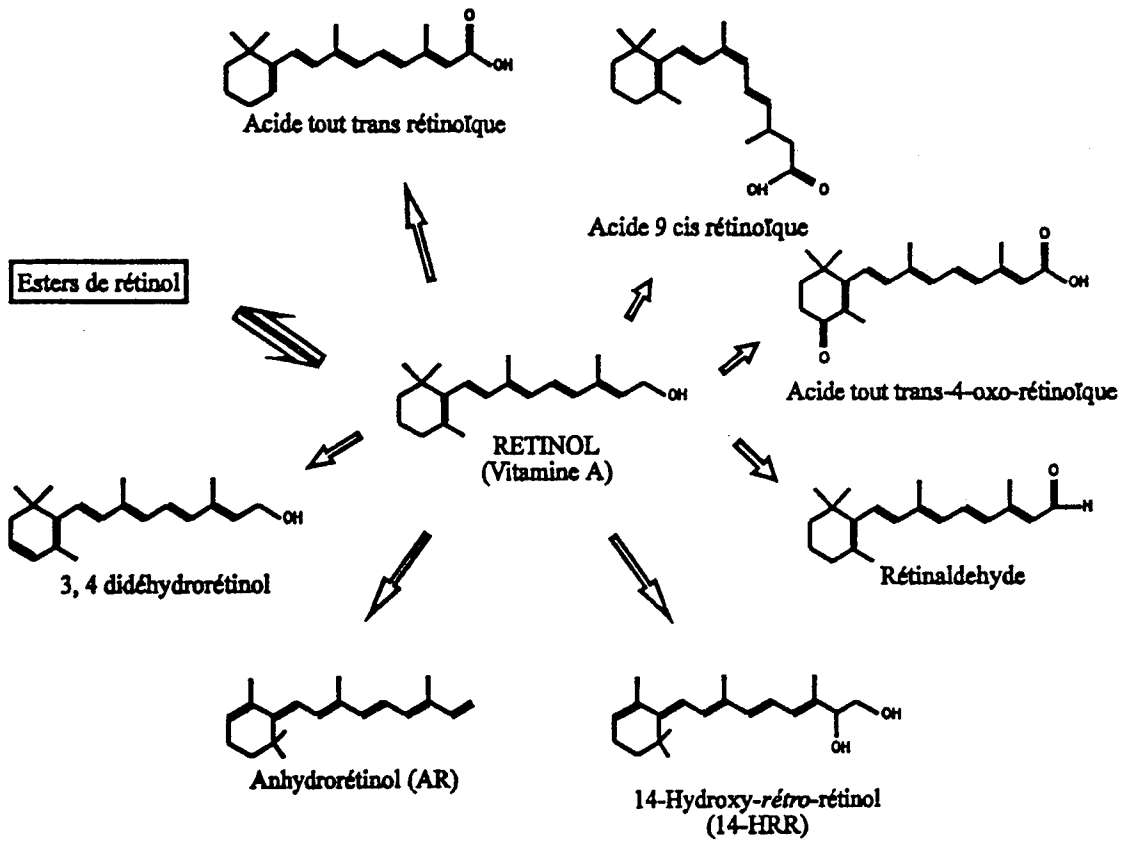


Figure 12A : Structure des principaux rétinoïdes naturels (d'après Gudas, 1994).

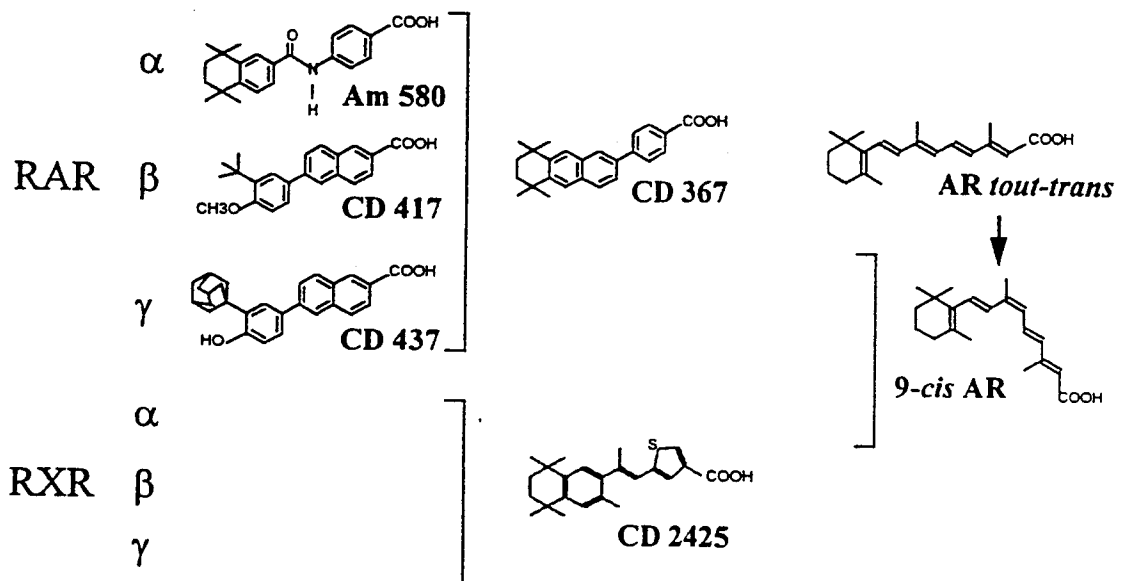


Figure 12B : Structure de quelques rétinoïdes synthétiques

membres de la famille des récepteurs nucléaires comme le VDR ou le TR. Ces complexes une fois formés se lient à des éléments de réponse spécifiques de l'hormone (RARE et RXRE) sur l'ADN et ainsi activent des gènes cibles spécifiques.

L'étonnante diversité de récepteurs, ainsi représentée par l'existence des deux ligands naturels (ATRA et 9-cis RA), de deux classes de récepteurs (RAR et RXR) et leurs trois isoformes (α , β et γ), exprimées de façon différente dans des différents tissus et types cellulaires, explique les effets pléiotropiques des rétinoïdes dans pratiquement toutes les cellules (Chambon, 1996).

b) Les protéines de transport intracellulaire

Deux types de protéines, CRABP I et II, ont été caractérisés jusqu'à présent. Elles sont présentes dans le cytoplasme. Une augmentation du niveau de CRABPI provoque une diminution de la sensibilité des cellules de tératocarcinome à l'ATRA et une augmentation de son métabolisme (Boylan et Gudas, 1992) suggérant qu'elle empêcherait son interaction avec les récepteurs nucléaires (Ong et Chytil, 1994). Ces protéines pourraient agir comme transporteurs de l'ATRA dans les cellules et dans la régulation de leur métabolisme, mais ne seraient pas forcément indispensables à l'action de l'ATRA (Lampron *et al*, 1995). De plus, leur dérégulation pourrait être impliquée dans la résistance aux rétinoïdes (Chomienne, 1996).

4) Effets biologiques dans les cellules normales et les cellules cancéreuses

L'importance des rétinoïdes dans le domaine de la recherche et de la santé remonte au début du siècle avec l'élucidation du rôle nutritionnel de la vitamine A dont ils constituent des dérivés actifs. La connaissance de leur implication dans d'importants processus biologiques tels que la morphogenèse embryonnaire, l'homéostasie tissulaire et la cancérogenèse a progressé de façon rapide ces dernières années, et a permis une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action. Ces études ont suggéré tout l'intérêt potentiel des rétinoïdes dans la thérapie de nombreuses pathologies depuis 25 ans. Ils sont aujourd'hui utilisés dans le traitement de différentes maladies de la peau et de la leucémie à promyélocytes et suscitent aussi des espoirs pour le traitement et la prévention de certains cancers.

L'ATRA est impliqué dans la régulation physiologique du développement embryonnaire et intervient dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose des tissus adultes. Ses effets sont multiples, réversibles ou non et varient selon le type cellulaire et la concentration d'ATRA (Lotan, 1995).

a) Rétinoïdes et prolifération

L'effet des rétinoïdes le plus fréquemment observé, *in vitro*, est l'inhibition de la croissance de nombreuses lignées tumorales (Lotan, 1980 ; Lotan *et al*, 1990 ; Amos et Lotan, 1991). Presque tous les types histologiques de tumeurs sont affectés : épithélial, nerveux, embryonnaire, mélanique et conjonctif (Tableau XI). Certaines cellules non transformées sont également sensibles à cet effet inhibiteur (fibroblastes murins, cellules épidermiques, Lotan, 1980).

Tableau XI : Inhibition de la croissance de cellules tumorales humaines par l'acide rétinoïque (d'après Pfahl *et al*, 1994)

Cellules tumorales	Références
APL (leucémie promyélocytaire)	Grignani <i>et al</i> , 1993
AML (leucémie aiguë myéloblastique)	Lawrence <i>et al</i> , 1987 ; Gallagher <i>et al</i> , 1987
carcinome mammaire	Marth <i>et al</i> , 1986 ; Halter <i>et al</i> , 1988
sarcome chondroblastique	Thein <i>et al</i> , 1982
cellules germinales	Dmitrovsky <i>et al</i> , 1990 ; Andrews <i>et al</i> , 1984
cancer du poumon	Munker <i>et al</i> , 1987 ; Doyle <i>et al</i> , 1989
mélanome	Lotan <i>et al</i> , 1979
neuroblastome	Sidell <i>et al</i> , 1985 ; Reynolds <i>et al</i> , 1991
ostéosarcome	Thein <i>et al</i> , 1982
tumeur neuro-ectodermale périphérique	Reynolds <i>et al</i> , 1991
prostate	Peehl <i>et al</i> , 1991
carcinome des cellules squameuses	Jetten <i>et al</i> , 1990 ; Sacks <i>et al</i> , 1989
myélome multiple	Sidell <i>et al</i> , 1991

L'inhibition de la croissance induite par l'ATRA est médiée par deux types d'effets, suivant que les cellules sont adhérentes, peu attachées (cellules de neuroblastome) ou en suspension (cellules lymphoïdes) : la réduction du taux de croissance est l'effet le plus général, alors que celui de la restauration du contrôle de la croissance dépendante de la densité de saturation ne concerne que les cellules adhérentes. Ainsi, l'ATRA est capable de s'opposer à la multiplication sans attachement de certaines cellules tumorales (Lotan *et al*, 1990). Cette propriété est très importante dans la mesure où la croissance indépendante de l'attachement, c'est à dire dans un milieu semi-solide comme l'agar, est un critère indirect du pouvoir tumorigène des cellules malignes

(Courtenay *et al*, 1978). Ces résultats permettent donc de penser que l'ATRA pourrait diminuer la malignité des cellules cancéreuses .

Les effets inhibiteurs de prolifération sont réversibles et se produisent pour des concentrations de 1 nM à 10 µM. Ils dépendent de la dose, de la durée du traitement et de la lignée cellulaire concernée (des lignées cellulaires dérivées d'un même type histologique de tumeur ne répondent pas forcément de la même manière aux rétinoïdes). Cependant, dans certaines lignées cellulaires comme la lignée d'adénocarcinome mammaire MCF-7 (Butler et Fontana, 1992), ou de leucémie HL-60 (Kisaki *et al*, 1993), l'ATRA possède un double effet avec stimulation de la croissance pour de faibles concentrations et inhibition pour des concentrations plus élevées. De plus, la réversion de l'inhibition de croissance obtenue après élimination de l'ATRA du milieu de culture des cellules MCF-7 confère à ce dérivé un rôle cytostatique.

Enfin, bien que rares, il existe également des cas où les rétinoïdes stimulent la croissance cellulaire (Schroder *et al*, 1982). C'est le cas de certaines cellules épidermiques, fibroblastes ou encore une lignée de mélanome humain (Lotan, 1980).

Le mécanisme d'action de l'ATRA dans l'inhibition de la prolifération dépend du type cellulaire et n'a encore jamais été complètement caractérisé dans un modèle donné. Les travaux menés jusqu'à présent ont tenté d'identifier les récepteurs, la fonction (de transactivation ou transrépression) et les relais moléculaires impliqués dans cet effet.

Concernant la caractérisation des récepteurs, les données sont nombreuses. Par exemple, dans certaines lignées tumorales mammaires (MCF-7 et MDA-MB-231), RAR β joue un rôle important. En effet, dans ces lignées, dépourvues de RAR β fonctionnel, l'utilisation d'un vecteur d'expression de RAR β entraîne la restauration de l'effet inhibiteur de la prolifération de l'ATRA (Seewaldt *et al*, 1995). Un autre exemple est celui des cellules HL-60 où l'utilisation d'un ligand sélectif de RAR α en association avec un ligand sélectif des RXRs génère la même réponse que l'ATRA et le 9-cis RA, suggérant un rôle important de RAR α parmi les sous-types des récepteurs de l'ATRA dans la réponse cellulaire d'inhibition de la prolifération (Brooks *et al*, 1996).

Un des mécanismes possibles par lequel l'ATRA inhibe la prolifération est la modulation directe ou indirecte de molécules de régulation qui contrôlent la croissance. Ainsi, dans le myélome multiple, l'effet inhibiteur de l'ATRA est associé à une diminution de l'expression du récepteur de l'IL-6, le facteur de prolifération majeur de la maladie (Sidell *et al*, 1991). Dans des lignées épithéliales ectocervicales humaines, les rétinoïdes inhibent la prolifération cellulaire en partie en augmentant le niveau d'IGFBP-3 (la protéine liant les facteurs de croissance insulino-like) (Hembree *et al*, 1996).

Une attention considérable a été portée récemment sur le rôle des cyclines, des kinases dépendantes des cyclines (CDK) et les inhibiteurs des CDK dans la régulation de la progression du cycle cellulaire. Ces molécules constituent des cibles potentielles des rétinoïdes dans la prolifération. La protéine p21^{WAF1/CIP1} bloque le cycle cellulaire en se liant à des complexes CDK-cycline, supprime leur activité kinase et empêche ainsi l'entrée en phase S. Son expression est augmentée et maintenue élevée durant la suppression de la croissance et l'induction de la différenciation des cellules HL-60 traitées par l'ATRA. Cela se produit indépendamment de la p53 dont l'action est médiée par la protéine p21 (Jiang *et al*, 1994). De plus, très récemment, un RARE (type DR5) a été identifié dans le promoteur du gène de la protéine p21 (Liu *et al*, 1996).

La cycline E est une des protéines qui se lie à CDK2 (Cyclin Dependant Kinase-2) et permet son activation. Le complexe cyclineE-CDK2 ainsi formé phosphoryle un certain nombre de protéines, non encore identifiées (Sherr *et al*, 1994), permettant l'entrée en phase S (complexée à la CDK2, elle peut être inhibée par p21^{WAF1/CIP1}). Sa régulation négative a été observée parallèlement à l'inhibition de croissance et à l'accumulation des cellules en G1 après le traitement par l'AR de cellules épithéliales bronchiques humaines, normales ou transformées par un carcinogène (Langenfeld *et al*, 1996). Un autre exemple est l'induction de la différenciation granulocytaire par l'AR des cellules HL-60 qui s'accompagne d'un blocage des cellules en phase G1, avec comme conséquence une diminution de l'expression de la cycline E (Bürger *et al*, 1994).

Une cible des complexes cycline-CDK (*in vitro*) et ayant une signification fonctionnelle potentielle *in vivo*, est le produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome, RB-1. **pRB** est maintenu dans un état hypophosphorylé pratiquement tout le long de G1 mais devient hyperphosphorylé en fin de G1, avec pour conséquence une libération de facteurs de transcription comme E2F (Buchkovich *et al*, 1989). Dans les cellules épithéliales mammaires humaines, l'AR induit une suppression de croissance et un arrêt en G1 qui sont temporairement associés à une diminution des niveaux de pRb hyperphosphorylée sans changements de l'expression de c-myc, p53, p21 ou p27. L'expression de la cycline D1, de la CDK4 et de la cycline E diminue également. Dans ce modèle, la cible moléculaire du récepteur de l'ATRA qui entraîne l'arrêt en G1 lorsqu'il est activé, semble être associée à la voie dépendante de la protéine Rb (Seewaldt *et al*, 1997). Dans le même ordre d'idée, Wilcken a étudié la répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire de cellules tumorales mammaires induites par l'ATRA et un antioestrogène et l'a comparé avec l'expression de gènes ayant des fonctions connues dans le contrôle du cycle cellulaire. Il montre ainsi que les mécanismes d'action de l'ATRA et de l'antioestrogène sont différents mais convergent au niveau de pRB, et que l'ATRA affecte l'activité de CDK sans réduire les niveaux de

cycline ou de CDK. pRB représenterait donc une voie commune finale pour les agents antiprolifératifs ayant des modes d'action différents (Wilcken *et al*, 1996).

Enfin, des expériences utilisant des rétinoïdes capables de dissocier les fonctions de transactivation et de transrépression ont permis de démontrer dans certains modèles (cancers mammaires et fibroblastiques) que c'est principalement par une action anti-AP1 que les rétinoïdes exercent leurs effets antiprolifératifs (Chen *et al*, 1995, Fanjul *et al*, 1996).

b) Rétinoïdes et différenciation

Outre l'inhibition de prolifération, les rétinoïdes sont également impliqués dans la régulation de la différenciation lors du développement embryonnaire et dans de nombreux tissus adultes (Morris-Kay, 1992). C'est dès 1925 que leurs effets sur la différenciation des cellules épithéliales ont été mis en évidence (Wolbach et Howe, 1925). Ainsi, par leurs propriétés antikératinisantes, les dérivés de la vitamine A ont été employés en Dermatologie dans le traitement de troubles de la kératinisation comme les formes d'acné sévère, le psoriasis étendu et diverses hyperkératoses (Peck, 1982).

De nombreux travaux ont également montré que l'ATRA était capable de restaurer la régulation de la différenciation cellulaire dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales issues de tératocarcinomes, de leucémies myéloïdes, de neuroblastomes et de mélanomes (Lotan, 1995). Dans la plupart de ces types cellulaires, l'ATRA se comporte comme un inducteur de la différenciation. Il ne déterminerait pas la direction de ce processus mais favoriserait plutôt des programmes de différenciation prédéterminés. En effet, dans les cellules HL-60 de leucémie myéloïde, qui peuvent suivre une différenciation myéloïde ou monocyttaire, les rétinoïdes ne sont capables d'induire que la première voie (Breitman *et al*, 1980). Pour certains de ces modèles, cet effet inducteur de la différenciation a été utilisé comme base de traitement de certains cancers. L'effet de l'ATRA sur la leucémie aiguë à promyélocytes (APL) est le premier exemple de traitement anticancéreux par différenciation cellulaire (Degos, 1993). Le traitement de cette leucémie par l'ATRA conduit à la différenciation des cellules malignes et une rémission complète est observée chez 90% des patients en quelques semaines (Huang *et al*, 1988). Mais des rechutes peuvent apparaître en quelque mois car l'apport massif d'ATRA induit son propre métabolisme. Actuellement, ce type de traitement est couplé à la chimiothérapie. L'APL est associée à une translocation entre les chromosomes 15 et 17, qui fusionne le gène du récepteur alpha de l'ATRA (RAR α situé sur le chromosome 17) avec un gène du chromosome 15 appelé PML. La protéine PML est spécifiquement associée à une structure fonctionnelle du noyau appelé corps nucléaire dont le rôle

pourrait être lié à la prolifération cellulaire. La protéine de fusion PML/RAR α semble agir en bloquant la différenciation des cellules promyélocyaires mais le mécanisme impliqué dans ce phénomène est encore inconnu. Certains auteurs démontrent que PML/RAR α conduit à une localisation intranucléaire aberrante de RAR α et de PML, phénomène réversible par un traitement par l'ATRA (Lavau *et al*, 1994). Il apparaît donc que RAR α peut être impliqué dans le processus normal de différenciation des promyélocytes et l'expression aberrante de ce récepteur serait une source de leucémogénèse.

c) Rétinoïdes et apoptose

i) Rétinoïdes et induction de l'apoptose

L'induction du processus d'apoptose est un des effets irréversibles de l'ATRA. Ce phénomène a été mis en évidence dans de nombreux modèles cellulaires (Tableau XII). On peut citer notamment l'exemple des cellules de leucémie myéloïde HL-60 (Martin *et al*, 1990) qui constituent un modèle d'étude de l'apoptose, induite par l'ATRA, le mieux caractérisé. L'index apoptotique est également augmenté sous l'effet de l'ATRA dans les lignées de carcinome du col utérin (HeLa) ou de neuroblastome (SK-N-BE) (Piacentini *et al*, 1992 ; Davies *et al*, 1992), dans les cellules du cancer de l'ovaire (Krupitza *et al*, en 1995). D'autres rétinoïdes comme l'HPR (4-hydroxyphenyl retinamide) sont aussi capables d'entraîner l'apoptose dans des lignées de carcinome pulmonaire (Kalemkerian *et al*, 1995) ainsi que dans des cellules HL-60 mutantes résistantes à l'ATRA (Delia *et al*, 1993).

Différentes relations peuvent exister entre inhibition de prolifération, différenciation et apoptose. L'arrêt de croissance par les rétinoïdes peut entraîner, soit la différenciation terminale, soit l'apoptose (Lotan, 1995b). Concernant différenciation et apoptose, trois possibilités existent. Tout d'abord, la différenciation peut être nécessaire pour que les cellules rentrent en apoptose. C'est le cas des cellules de leucémie myéloïde (lignées HL-60) qui, sous l'action de l'ATRA, se différencient en neutrophiles avant de mourir (Martin *et al*, 1990). La deuxième possibilité correspond à l'induction simultanée de ces deux processus, comme pour les cellules de tétatocarcinome F9 (Atencia *et al*, 1994) ou encore les cellules leucémiques myélomonocytaires P39 (Anzai *et al*, 1994). Enfin, la différenciation et l'apoptose peuvent être induites de manière totalement indépendante, comme pour les cellules de neuroblastomes (Piacentini *et al*, 1992).

Tableau XII : Rétinoïdes et apoptose

Modèle cellulaire	Lignée cellulaire	Récepteur(s) impliqué(s)	Relais moléculaires	Référence
Leucémie aiguë myéloblastique	HL-60	RXR	TGt (RAR/RXR) bcl-2 (RAR α)	Martin <i>et al</i> , 1991, Nagy <i>et al</i> , 1996, Davies <i>et al</i> , 1997
Leucémie aiguë à promyélocytes (t15;17)	NB4			Bruel <i>et al</i> , 1995
Lymphome de cellules T Ki-1	SR786	RAR α		Su <i>et al</i> , 1993 et 1994
Syndrôme myélodysplasique	P39			Anzai <i>et al</i> , 1994
Myélome multiple	RPMI 8226	RAR/RXR	TGt	Lefebvre <i>et al</i> , 1997, Joseph <i>et al</i> , 1997
Carcinome du col de l'utérus	HeLa			Piacentini <i>et al</i> , 1992, Davies <i>et al</i> , 1992
Carcinome ovarien		(4-HPR)		Krupitza <i>et al</i> , 1995, Supino <i>et al</i> , 1996
Carcinome pulmonaire		(4-HPR)		Kalemkerian <i>et al</i> , 1995
Carcinome embryonnaire (différenciation neuronale)	P19	RAR RAR/RXR		Horn <i>et al</i> , 1996
Carcinome embryonnaire (différenciation endodermique)	F9	RXR α	WT-1 (gène suppresseur de tumeur Wilms)	Atencia <i>et al</i> , 1994, Clifford <i>et al</i> , 1996, Kudoh <i>et al</i> , 1996
Carcinome mammaire	MCF-7	RAR β		Liu <i>et al</i> , 1996
Neuroblastome	SK-N-BE		Bcl-2 TGt	Piacentini <i>et al</i> , 1992, Melino <i>et al</i> , 1994
Cellules épithéliales trachéobronchiales	SPOC-1	RAR α		Zhang <i>et al</i> , 1995
Cellules mésenchymateuses (bourgeon de membre de souris)			TGt	Jiang <i>et al</i> , 1992
Cellules mésenchymateuses (primordia facial de souris)		RAR β		Motoyama <i>et al</i> , 1994

Holman et son équipe ont montré que c'était la proportion de Bax (protéine favorisant l'apoptose) par rapport à Bcl-2 (inhibiteur de l'apoptose) qui détermine la survenue de l'apoptose après la différenciation. En effet, dans les cellules de HL-60 induites par l'ATRA, Bax est induit de façon constante alors que Bcl-2 n'est induit que transitoirement, la proportion de Bax/Bcl-2 augmente donc avec le temps et favorise l'apoptose après la différenciation. Dans les cellules de neuroblastome (SHSY-5Y et KCNR) qui se différencient également sous l'effet de l'ATRA mais ne meurent pas par apoptose en réponse terminale, Bax est induit, mais contrairement aux cellules HL-60, un haut niveau d'expression de Bcl-2 est maintenu de telle manière que la proportion de Bax/Bcl-2 n'augmente pas, et l'apoptose reste inhibée (Holman *et al*, 1995).

La lignée cellulaire HL-60 constitue un modèle pratique pour l'étude des mécanismes de régulation de la différenciation myéloïde ainsi que ceux de l'apoptose après la différenciation terminale. C'est pour ce modèle que le mécanisme d'action de l'ATRA dans l'induction de l'apoptose est le mieux connu.

Plusieurs équipes ont caractérisé la contribution de chaque classe de récepteurs dans les processus de différenciation et de mort et ont observé que l'activation des récepteurs RARs est suffisante pour l'induction de la différenciation. Celle-ci est associée à une suppression globale de Bcl-2 (Naumovski *et al*, 1994) qui dépend de l'activation des RARs (Nagy *et al*, 1995). Cependant il est peu probable que la suppression de Bcl-2 soit un élément nécessaire à la voie de différenciation dans ces cellules, puisque l'expression constitutive de Bcl-2 n'interfère pas avec la différenciation alors qu'elle supprime l'apoptose induite par les rétinoïdes (Park *et al*, 1994). Par contre, l'activation des récepteurs RXRs déclenche un signal menant à l'apoptose dans ces cellules (Davies *et al*, 1997, Nagy *et al*, 1995 et Mehta *et al*, 1996). Cette apoptose est corrélée à l'augmentation de l'expression de la TGt, médiée par l'activation des RARs et RXRs (Nagy *et al*, 1995).

La corrélation entre l'induction de l'apoptose et de la TGt a été observée dans plusieurs autres modèles cellulaires comme la lignée d'adénocarcinome cervical HeLa-TV et les cellules de neuroblastome SK-N-BE-2 (Piacentini *et al*, 1991) (tableau XII). Par exemple, dans les cellules épithéliales trachéobronchiales de rat SPOC-1, l'induction de l'apoptose et de la TGt s'effectue simultanément et sous le contrôle de RAR α (Zhang *et al*, 1995). Dans les tissus interdigitaux de bourgeons de membres de Mammifères et d'Oiseaux, la forte expression de TGt des cellules apoptotiques est associée à une forte expression de RAR β . Enfin, l'ATRA et le 9-cis RA induisent l'apoptose dans des cultures de thymocytes de souris *ex vivo*, cette apoptose médiée par RAR γ est aussi associée à l'induction de la TGt (Fesus *et al*, 1996, revue).

Une séquence de 1,7 kb chez l'homme, et de 2 kb chez le cochon d'Inde a été clonée en amont du site d'initiation de la transcription du gène de la TGt (Lu *et al*, 1995, Suto *et al*, 1993). Ces deux séquences ne contiennent aucun des éléments de réponse des rétinoïdes RARE ou RXRE. Cependant un RARE a pu être cloné dans le promoteur du gène de l'activateur du plasminogène humain, à 7kb en amont du site d'initiation de la transcription (Bulens *et al*, 1995).

D'autre part, chez la souris, les rétinoïdes régulent la transcription du gène de la TGt par l'activation d'un élément de régulation contenu à l'intérieur d'une séquence de 4 kb à l'extrémité 5' du gène. Des études de cotransfection avec des vecteurs d'expression des récepteurs des rétinoïdes ont révélé que le promoteur de la TGt de souris est activé par un ligand permettant l'activation d'hétérodimère RAR/RXR ou homodimère RXR/RXR (Nagy *et al*, 1996).

ii) Rétinoïdes et inhibition de l'apoptose

L'ATRA (utilisé entre 0,1 et 10 μ M) inhibe l'apoptose des hybridomes de cellules T et des thymocytes induits par l'activation du complexe TCR/CD3 (Iwata *et al*, 1992). Les études de Yang suggèrent que l'inhibition de la surexpression du ligand Fas, observée parallèlement à l'inhibition de l'apoptose est responsable de cet effet (Yang *et al*, 1995). Les RXRs semblent jouer un rôle important dans ce processus car le 9-cis RA est 10 fois plus puissant que l'ATRA dans cette action d'inhibition de l'apoptose (Yang *et al*, 1993). Mais des expériences utilisant la surexpression de RAR β sous sa forme sauvage et dominant négatif ainsi que l'utilisation de rétinoïdes agonistes sélectifs des RARs et/ou des RXRs ont montré que les RARs et les RXRs sont tous deux impliqués dans cette prévention de l'apoptose induite par activation des cellules T par les rétinoïdes (Yang *et al*, 1995).

L'AR inhibe l'apoptose ainsi que la croissance et la différenciation en macrophage, dans une lignée cellulaire hématopoïétique murine Y6 induite par l'IL-6 (Oritani *et al*, 1992). Cet effet inhibiteur de l'ATRA n'interfère pas avec l'expression du récepteur fonctionnel de l'IL-6 mais avec la voie de transduction du signal médié par l'IL-6 qui mène ainsi à la suppression du gène c-myc sans aucun effet sur la voie de transduction du signal activant le gène jun B.

5) Interrelation entre la voie des rétinoïdes et d'autres voies de signalisation cellulaires : Synergie, antagonisme, cross-talk.

a) Rétinoïdes et Dexaméthasone

Les voies des rétinoïdes et celles des glucocorticoïdes présentent de nombreuses interrelations. Chacune de ces molécules possède la propriété de réguler au niveau transcriptionnel un certain nombre de réponses induites par l'autre agent. Les exemples sont nombreux et vont aussi

bien dans le sens d'une synergie (ou stimulation) que d'un antagonisme (ou inhibition) de l'effet induit.

Un premier exemple où l'ATRA augmente l'effet des GC est celui se rapportant aux travaux déjà mentionnés d'Iwata et son équipe : L'ATRA, tout comme les GC, inhibe l'apoptose induite par l'activation du complexe TCR/CD3 dans les hybridomes de cellules T. Les GC utilisés seuls induisent l'apoptose dans ces hybridomes non activés, alors que l'ATRA seul n'a pratiquement pas d'effet. Par contre, l'ATRA augmente les effets des GC aussi bien pour la réponse d'induction de l'apoptose que pour celle de l'inhibition de l'apoptose induite par TCR/CD3 par un processus de transrépression de l'activité AP-1 (Iwata *et al*, 1992).

Un autre exemple montre la possibilité d'un effet synergique entre les deux molécules : dans certaines cellules myélomateuses humaines, la Dex inhibe la croissance cellulaire probablement par son effet de régulation négative de l'IL-6. L'ATRA induit le même effet en régulant négativement son récepteur. L'association ATRA+Dex entraîne *in vitro* une synergie de l'inhibition de croissance, obtenue par le blocage de l'expression de la boucle autocrine d'IL-6 à des sites multiples (Chen *et al*, 1996).

Enfin, les effets de l'un peuvent parfois être inhibés par l'autre. C'est ce que montrent les travaux de Defacque (1995) où la réponse d'induction de la TGt par l'ATRA dans les cellules HL-60 est inhibée par les GC et réversée par l'utilisation d'un puissant antagoniste des GC, le RU486, montrant que cet effet passe bien par le GR.

b) Rétinoïdes et interféron alpha (IFN α)

Les rétinoïdes et l'IFN α sont également connus pour réguler tous deux des fonctions cellulaires basiques incluant la croissance, la différenciation et l'activité immunitaire (De Mayer *et al*, 1988, Borden *et al*, 1990). L'IFN α , comme l'ATRA, exerce un effet antiprolifératif sur de nombreuses cellules normales ou transformées et possède, *in vivo*, un effet antitumoral contre divers cancers (Moore *et al*, 1994). Il est également connu pour potentialiser certains effets d'autres agents comme l'inhibition de la prolifération, l'induction de la différenciation et de l'apoptose (Lotan *et al*, 1995, Bezwoda *et al*, 1993).

De nombreux travaux ont montré que l'association d'agents chimiopréventifs du cancer et thérapeutiques, comme les rétinoïdes et l'IFN α , peut aboutir à un effet antiprolifératif augmenté, comparé à celui provoqué par chacun de ces agents utilisés seuls, dans un certain nombre de maladies et de types cellulaires malins. Des études *in vitro* ont ainsi démontré que la combinaison des rétinoïdes et de l'IFN α résultent en des effets additifs et synergiques sur l'inhibition de croissance et éventuellement de l'induction de la différenciation de plusieurs lignées de carcino-

mes squameux (Lotan *et al*, 1995). Cela est le résultat direct ou indirect de changements de l'expression de gènes. De plus, Giandomenico et son équipe (1997) montrent que dans ce type de lignées cellulaires, l'association de ces deux agents entraîne l'induction de l'apoptose ainsi que l'expression d'IRF-1 (facteur de régulation de l'IFN) mais non celle de la TGt.

Dans le modèle du myélome multiple des os, Siegel et son équipe ont montré que l'association ATRA/IFN α était également capable d'inhiber de façon synergique la croissance de deux lignées myélomateuses humaines (SKMM1 et RPMI 8226) et d'induire l'expression de RAR α (Siegel *et al*, 1992). D'autre part des études ont également montré l'effet synergique de cette association sur l'induction de la TGt (Méreau-Richard *et al*, 1993).

Ces résultats suggèrent que l'utilisation de cette combinaison d'agents, les rétinoïdes et l'IFN α , mènerait à une augmentation de leurs effets anti-tumoraux.

Chapitre III : LE MYELOME MULTIPLE

A. DEFINITION

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne très grave, pour laquelle la médiane de survie sous chimiothérapie conventionnelle est d'environ 3 ans, 15 à 20% seulement des patients ayant une survie supérieure à 5 ans.. Il se caractérise par l'émergence d'un clone de cellules plasmocytaires malignes (qui sont des cellules terminales de la différenciation lymphocytaire B produisant des immunoglobulines) au voisinage de l'environnement osseux. L'hyperremodelage osseux constitue d'ailleurs un marqueur très précoce de malignité d'un clone plasmocytaire. La nature de la cellule souche tumorale n'est toujours pas clairement élucidée, mais un certain nombre d'arguments sont en faveur d'une cellule pré-plasmocytaire capable d'auto-renouvellement. Parallèlement à l'émergence du clone tumoral, on observe une réduction de la lymphopoïèse B polyclonale et une anémie. Enfin, très souvent dans cette maladie, on trouve une augmentation de certaines protéines de la phase aiguë de l'inflammation produites par les hépatocytes (en réponse à une augmentation d'IL-6) et une hypoalbuminémie (Klein *et al*, 1991).

La physiopathologie du myélome multiple est mal connue. Le rôle des cytokines, notamment l'IL-6 apparaît très important. Les cellules myélomateuses et leurs précurseurs produisent de nombreuses cytokines (autocrinie) capables d'auto-stimulation (IL-1, IL-5, IL-6) ou responsables de certaines manifestations cliniques du myélome (IL-1, TNF α). Elles expriment des récepteurs à des cytokines, des hormones ou des vitamines, cibles potentielles utilisables en thérapeutique (IFN α , IL-6, oestrogène, vitamine D3).

L'IL-6 est le facteur de croissance et de prolifération tumorale majeur de la maladie *in vitro* et *in vivo* (Klein *et al*, 1991). Il existe une hyperproduction de cette cytokine par le micro-environnement tumoral (paracrinie), en relation avec l'agressivité de la maladie. La production d'IL-6 et la sensibilité des cellules myélomateuses à cette molécule sont sous le contrôle d'autres cytokines qui peuvent jouer un rôle activateur ou inhibiteur. De tels effets, potentiellement néfastes, doivent être soigneusement pris en compte dans l'utilisation thérapeutique de ces molécules.

Les cytokines pouvant influencer la croissance du myélome, mais toujours jusqu'à présent par le biais de l'IL-6, sont diverses : l'IFN α et l'IFN γ , par exemple, inhibent la prolifération des cellules myélomateuses en réponse à l'IL-6. L'IFN α recombinant constitue d'ailleurs un

traitement d'entretien du myélome multiple qui semble prolonger la phase de stabilisation de la maladie. Cependant, qu'elles utilisent des lignées myélomateuses ou des cellules myélomateuses fraîches, les études *in vitro* concernant l'effet de l'IFN α dans le myélome multiple restent encore peu nombreuses.

L'altération de la protéine p53 constituant un des facteurs le plus fréquemment associés à l'apparition de cancer, des études ont été menées afin d'identifier d'éventuelles potentielles mutations dans le gène p53. Mazars et son équipe, en travaillant sur différentes lignées de cellules myélomateuses humaines, ont montré que 8 des 10 lignées étudiées portent un gène p53 muté, et 5 parmi ces 8 produisent une variante de la protéine, indiquant la perte de la séquence du gène de p53 sauvage (RPMI 8226 et U266 entrent dans ce cas de figure) (Mazars *et al*, 1992). Par contre, ce même type d'étude mené sur des cellules directement issues de patients, a montré qu'un seul cas sur les 37 analysés révèle une mutation du gène. Ce qui suggère que les mutations p53 sont très rares dans le myélome multiple, et que cette maladie rentre dans la catégorie des rares néoplasies où les anomalies de p53 ont un rôle limité, voire nul (Preudhomme *et al*, 1992). Ceci est intéressant dans la mesure où p53 ont un rôle essentiel dans le contrôle de l'apoptose.

B. PROBLEME THERAPEUTIQUE

Les résultats thérapeutiques, reposant encore souvent sur l'association corticothérapie-antimitotique sont décevants et ont peu progressé ces dernières années (Barlogie *et al*, 1984 ; Alexanian *et al*, 1994, Facon, 1997). Ainsi, chez les patients âgés, l'association Melphalan-Prednisone reste le traitement de référence. Des essais thérapeutiques ayant comparé l'association Melphalan-Prednisone à des polychimiothérapies conventionnelles comportant plusieurs agents alkylants n'ont pas trouvé d'avantage à ces dernières (Gregory *et al*, 1992 et Samson *et al*, 1996).

Des nouveautés thérapeutiques ont tout de même été mises à jour comme le recours à l'IFN α recombinant (Mandelli *et al*, 1990) et à des traitements intensifs (hautes doses de Melphalan, autogreffe de moelle osseuse et/ou de cellules souches périphériques, allogreffe de moelle osseuse). De nouveaux traitements reposant sur l'association de différents agents antimitotiques et l'utilisation de cytokines ont également été proposés, comme par exemple l'association AR-IFN α . Des études *in vitro* des effets de ces molécules sur le MM ont fait leur apparition et les études cliniques n'ont pour l'instant concerné qu'un nombre limité de malades. Bien que les résultats du traitement par l'ATRA seul, en phase avancée de la maladie, soient décevants, il apparaît souhaitable, selon T. Facon (1997), de poursuivre les études *in vitro* et de répondre aux questions suivantes : l'ATRA a-t-il un effet synergique avec les alkylants, la dexaméthasone et

l'IFN α recombinant ? Présente-t-il un intérêt en traitement d'entretien du MM lorsqu'il est associé à d'autres médicaments, telle que la dexaméthasone ?

C. MYELOME MULTIPLE ET APOPTOSE

Le MM étant une tumeur à prolifération lente, il semblerait que la régulation négative de l'apoptose soit un mécanisme essentiel de l'expansion cellulaire tumorale. Des essais thérapeutiques avec des agents pharmacologiques permettent d'induire l'apoptose en réprimant les systèmes de protection et/ou en activant directement des voies de mort (fas). Les études dans les lignées cellulaires dérivées du MM ont documenté l'activité de quatre types principaux d'inducteurs de l'apoptose : des agents physiologiques et chimiques (dexaméthasone, ATRA), l'utilisation d'un antigène de fas, l'action d'un antagoniste de l'IL-6. Le rôle de bcl-2, exprimé de façon constitutive dans les plasmocytes normaux et tumoraux et celui de la tyrosine kinase SAP (stress activated protéine kinase) semblent être importants dans l'inhibition de l'apoptose des cellules du MM (Binet *et al*, 1996).

1) Le système d'induction de l'apoptose dans le MM le mieux connu est celui de l'apoptose induite par la Dex. Des travaux ont montré que la Dex inhibe la croissance à faible dose et à forte dose, induit l'apoptose des cellules myélomateuses humaines (RPMI 8226, HS Sultan, IM-9 et U266B1 (Lichtenstein *et al*, 1995) et que ce phénomène est associé à l'inhibition de l'expression du gène de l'IL-6, et à plus forte concentration, de l'expression du récepteur de l'IL-6 (Hardin *et al*, 1994). Ces effets de la Dex sont médiés par le GR. Plusieurs travaux ont montré que l'IL-6 bloque cette apoptose induite par la Dex, suggérant que le blocage de la voie de signalisation de l'IL-6 est important pour les effets de la Dex.

Cependant, il faut noter que certaines cellules sont résistantes aux effets de la Dex. Des travaux ont suggéré qu'elle pouvait correspondre à une production aberrante d'un GR suite à des événements d'épissage alternatif (Moalli *et al*, 1993). Par contre, Gomi *et al* (1990) ont étudié les effets des GC dans les lignées de cellules myélomateuses en culture (OPM-1, OPM-2 et RPMI 8226) et les a corrélés avec l'inhibition de la croissance et l'induction de messagers du GR. Ils ont montré que la résistance complète (OPM-1) ou relative (RPMI 8226) de cellules myélomateuses humaines à l'inhibition par les GC de la croissance cellulaire s'effectuait par un mécanisme indépendant du récepteur. En effet, ce mécanisme est indépendant de la quantité et de l'affinité du GR produit.

2) L'interleukine-6 est connue pour son effet protecteur de l'induction de l'apoptose par la Dex (Hardin *et al*, 1994 et Lichtenstein *et al*, 1995) et un antagoniste du récepteur de l'IL-6

(IL-6R) est capable d'inhiber la croissance d'une lignée de MM (XG-1) dépendante de l'IL-6 et induit la mort cellulaire dans le myélome multiple (Demartis *et al*, 1996).

3) Concernant l'apoptose induite par le système Fas, des études montrent que de nombreuses lignées cellulaires et cellules directement issues de patients malades expriment Fas (Hata *et al*, 1995, Westendorf *et al*, 1995) mais que certaines seulement sont sensibles à l'anticorps anti-fas entraînant l'apoptose (Shima *et al*, 1995)

4) L'intérêt de l'utilisation de l'ATRA dans le traitement du MM a d'abord été suscité par la découverte de son effet d'inhibition de la croissance d'une lignée de cellules myélomateuses humaines, AF-10, via la régulation négative de récepteurs de l'IL-6 (Sidell *et al*, 1991), puis, dans les cellules fraîchement isolées de patients (Ogata *et al*, 1994). Mais les études des effets de l'ATRA sur l'induction de l'apoptose dans le MM sont peu nombreuses et méritent d'être poursuivies.

RESULTATS

L'acide rétinoïque, comme on l'a vu, suscite actuellement un intérêt considérable dans le traitement anticancéreux (Smith *et al*, 1992). Après le succès spectaculaire obtenu dans le traitement de la leucémie à promyélocytes, un nombre croissant de tumeurs et d'hémopathies bénéficie d'essais cliniques. De nombreuses études ont montré qu'il était capable d'inhiber la prolifération, notamment dans des lignées de myélome humain (Sidell *et al*, 1991) et induire la différenciation cellulaire, par exemple dans les cellules de leucémie humaine HL-60 dont il est capable de provoquer la mort par apoptose (Martin *et al*, 1991). Ce sont d'ailleurs ces deux propriétés qui sont mises à profit dans la chimioprévention et le traitement de certains cancers. Depuis quelques années, l'attention s'est également portée sur son effet d'inducteur de l'apoptose et sur son intérêt éventuel dans les traitements anticancéreux.

Le myélome multiple, comme on l'a vu est une hémopathie maligne particulièrement grave, qui nécessite la découverte de traitements plus efficaces. Compte tenu des données déjà connues suggérant l'intérêt de l'ATRA dans le traitement du myélome (voir revue générale), nous nous sommes intéressés à l'étude des effets de l'ATRA et plus particulièrement à sa capacité à inhiber la prolifération et induire la mort cellulaire programmée sur un modèle expérimental d'origine humaine : les lignées de cellules myélomateuses humaines RPMI 8226 et U266 (chapitre I). Ensuite, dans le souci de caractériser les récepteurs impliqués dans ces effets d'inhibition de la prolifération et d'induction de l'apoptose, nous avons testé des rétinoïdes de synthèse, ligands spécifiques de l'une des classes de récepteurs RAR ou RXR ainsi que des rétinoïdes spécifiques de sous-classes (RAR γ en l'occurrence) sur ces réponses (chapitre II). Enfin, nous nous sommes intéressés aux effets de l'association de l'ATRA avec d'autres molécules de signalisation présentant un rôle ou intérêt important dans le traitement dans la maladie : l'IFN α dont l'association avec l'ATRA commence à être utilisée dans des essais thérapeutiques du MM et la dexaméthasone (Dex) qui fait partie du traitement de base de la maladie (chapitre III).

Chapitre I

Effets de l'acide rétinoïque et de l'acide 9-cis rétinoïque sur la prolifération et l'apoptose des cellules myélomateuses humaines RPMI 8226 et U266

Nous avons étudié les effets antiprolifératif et inducteur de l'apoptose de l'ATRA, pendant six jours après l'induction. Des quantités déterminées de cellules sont donc prélevées chaque jour et soumises à différents tests permettant une étude complète.

A l'occasion de cette première partie du travail, nous avons mis en place les outils les plus pratiques et les plus performants pour la mise en évidence et l'étude détaillée de l'apoptose, sujet d'étude tout à fait nouveau au laboratoire. Nous avons également mis au point les conditions de culture et d'expérimentation optimales pour les cellules étudiées (par exemple, l'utilisation d'un nombre raisonnable de cellules, permettant d'effectuer tous les contrôles nécessaires à la caractérisation des effets étudiés sur un même échantillonnage).

A. Effets des rétinoïdes sur la prolifération cellulaire

1) Inhibition de la croissance cellulaire

Nous mesurons les effets de l'ATRA et du 9-cis RA sur la croissance cellulaire grâce à un test de viabilité, effectué chaque jour de la période d'induction. Ceci permet l'évaluation du nombre de cellules en fonction du traitement administré et de sa durée (Figure 1). Les résultats sont obtenus sur plusieurs expériences, menées avec des échantillons contenant au départ 20 millions de cellules.

Le traitement par l'ATRA (1 μM) ou par le 9-cis RA (1 μM) entraîne une diminution significative de la croissance cellulaire, observée dès le 2^{ème} jour de traitement et mène progressivement à un arrêt de croissance qui est presque complet au 6^{ème} jour.

Nous avons d'abord travaillé avec un milieu défini (ne contenant donc pas de sérum). Après de nombreuses expérimentations, nous avons observé un pourcentage de nécrose toujours très important dans les cellules témoins non traitées. Par ailleurs, nous avons observé un taux d'apoptose, induit par 1 μM d'ATRA, plus important lorsqu'on ajoute 5% de sérum à ce milieu,

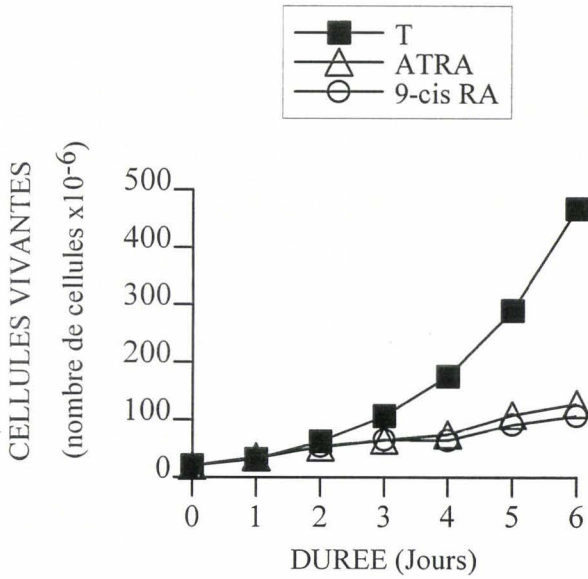


Figure 1 : Croissance d'une population de cellules RPMI 8226 cultivées en présence ou non d'ATRA (1 μ M) ou de 9-cis RA (1 μ M). Les cellules excluant le bleu trypan sont comptées chaque jour. La déviation standard (pour une valeur moyenne de n=5 points) n'excède pas 17%.

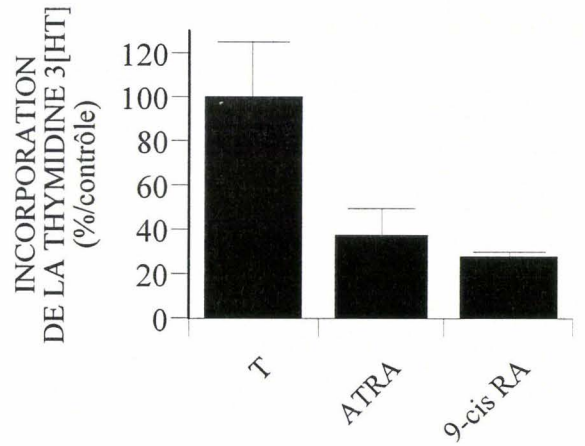


Figure 2 : Prolifération des cellules RPMI 8226 étudiée par incorporation de thymidine tritiée pendant 3h après 48h de traitement par l'ATRA (1 μ M) et le 9-cis RA (1 μ M).

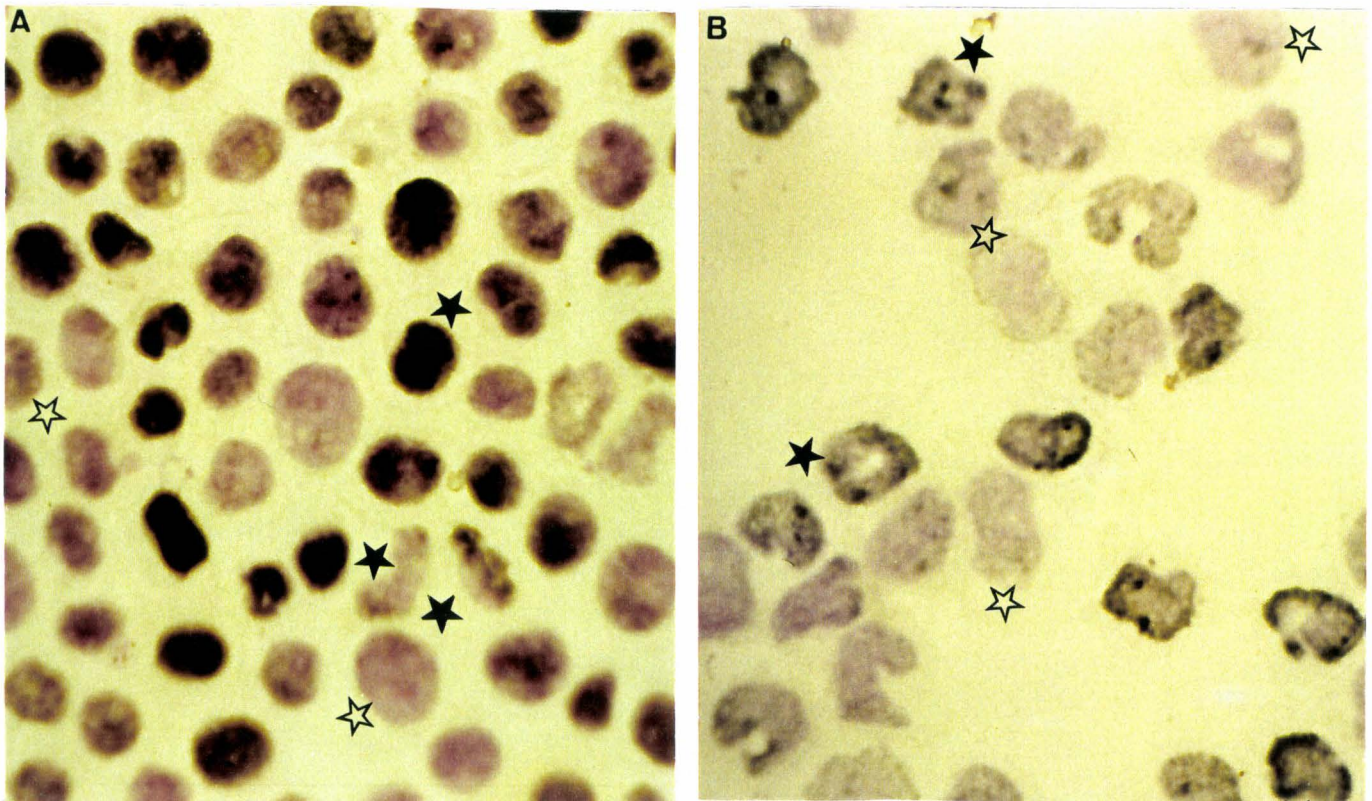


Figure 3 : Prolifération des cellules RPMI 8226 mesurée par immunocytochimie de l'antigène Ki-67 après 3 jours de traitement en présence (B) ou non (A) d'ATRA (1 μ M). Grossissement x 400
 ★ : cellule positive, ☆ : cellule négative

et dans ce cas, les cellules contrôles non induites présentent un taux minimum de nécrose. L'utilisation d'un milieu d'induction contenant 5% de sérum au départ et complété à 10% au 2^{ème} jour de traitement, s'est donc révélée plus avantageuse pour nos analyses.

2) Effet antiprolifératif

a) Tests d'incorporation de la thymidine tritiée (³H)

Afin de démontrer l'effet antiprolifératif de l'ATRA, nous avons mesuré le taux de synthèse d'ADN sur les cellules viables pendant 3h, 48h après l'induction. Comme le montre la figure 2, l'effet inhibiteur de l'ATRA s'observe clairement par le test d'incorporation de la thymidine ³H. Dans les cellules RPMI 8226, dès le 2^{ème} jour, l'ATRA réduit d'environ 75% l'incorporation de thymidine ³H par rapport aux cellules non traitées. A ce stade de l'induction, il n'existe pas encore de différence significative entre le nombre de cellules induites et celui des cellules témoins (une différence considérable étant observée au 6^{ème} jour de traitement). Cette méthode présente donc l'avantage de pouvoir détecter de façon précise et précoce l'inhibition de la prolifération exercée par l'ATRA.

Les cellules traitées par le 9-cis RA présentent également une inhibition d'incorporation de la thymidine ³H qui est équivalente à celle provoquée par l'ATRA.

b) Marquage des cellules en prolifération par l'anticorps monoclonal anti-Ki-67

Les résultats précédents ont été confirmés par évaluation du pourcentage de cellules en prolifération dans la population cellulaire par l'utilisation d'un anticorps anti Ki-67 (Figures 3 et 6, p). Ki-67 est une protéine nucléaire exprimée dans tous les stades du cycle cellulaire à l'exception du stade G0 (cellules quiescentes) et n'est pas décelée dans les cellules en apoptose (Tinnemans *et al*, 1995).

Dans les cellules témoins (voir Figure 3A), le pourcentage de cellules Ki-67 positives, évalué après 3 jours de traitement, est de 80% ($\pm 7,6$) et n'est pas modifié durant les jours suivants (cinétique non montrée). Cependant il diminue ($66,7 \pm 4\%$) au 2^{ème} jour du traitement, ce qui correspond sans doute au manque de sérum dans le milieu. C'est à ce moment de l'expérimentation que ce dernier est ajusté à la quantité normale de sérum dans un milieu d'entretien classique soit 10% final.

Dans les cellules traitées par l'ATRA, le pourcentage de cellules positives est de 36% ($\pm 7,6$) au 3^{ème} jour de traitement et il diminue pour arriver à 17% ($\pm 2,1$) après 4 jours. Au 6^{ème} jour, une proportion de cellules recommence à proliférer comme le témoigne la réapparition de cellules Ki-67 positives (Figure 6).

Ainsi, l'arrêt de synthèse d'ADN est un événement observé de façon plus précoce que la diminution du nombre de cellules Ki-67 positives. En effet, la suppression d'incorporation de thymidine ^3H est visible après 48h de traitement, tandis que la diminution équivalente du nombre de cellules Ki-67 positives n'est observée qu'après 3 jours. Cependant, il a été démontré que l'expression de l'antigène Ki-67 peut persister 24h après blocage du cycle cellulaire (Seigneurin et Guillaud, 1991) ce qui expliquerait ce décalage.

B. Etude des effets inducteurs de l'apoptose

L'apoptose, manifestation morphologique de la mort cellulaire programmée, constitue un phénomène complexe, mettant en jeu un programme d'événements divers dont la caractérisation fine réclame un abord par plusieurs techniques complémentaires. Nous avons mis au point des techniques d'étude morphologique telle que la coloration au Hoechst 33258 (permettant la visualisation de la chromatine) et des techniques d'étude biochimique permettant d'observer l'activation des nucléases. Ces dernières comportent la mise en évidence, *in situ*, de l'ADN fragmenté (technique TUNEL) l'analyse qualitative (technique d'obtention « d'échelles d'ADN » typiques) et quantitative (dosage par la méthode de Burton) de l'ADN fragmenté.

1) Analyse morphologique de l'apoptose

Les cellules sont observées en microscopie photonique après coloration MGG (May-Grünwald Giemsa), au Hoechst 33258 (en fluorescence) ainsi qu'en microscopie électronique.

a) Observation des cellules colorées par le MGG

Les cellules intactes (Figure 4A, photo 1) présentent un noyau clair et volumineux et avec une membrane généralement régulière. Les cellules traitées pendant 6 jours par l'ATRA (ou le 9-cis RA) (photo 2 et 2') montrent des caractéristiques morphologiques classiques de l'apoptose : elles présentent d'abord (photo 2) une diminution de la taille, une condensation ainsi qu'une fragmentation nucléaires. Le cytoplasme commence à se condenser, mais il n'y a pas encore de corps apoptotiques. A un stade ultérieur (photo 2') le cytoplasme se fragmente et forme les corps apoptotiques. Globalement, la quantité de corps apoptotiques reste faible. Dans cette lignée, il existe vraisemblablement un phénomène d'autophagie par les cellules voisines. En effet, on observe souvent des cellules en apoptose, entourées de plusieurs autres cellules et même la phagocytose de corps apoptotiques par les cellules voisines. Notons qu'il est difficile de distinguer par cette technique une cellule en début d'apoptose d'une cellule en mitose, abîmée par la centrifugation ou le processus de coloration (non montré).

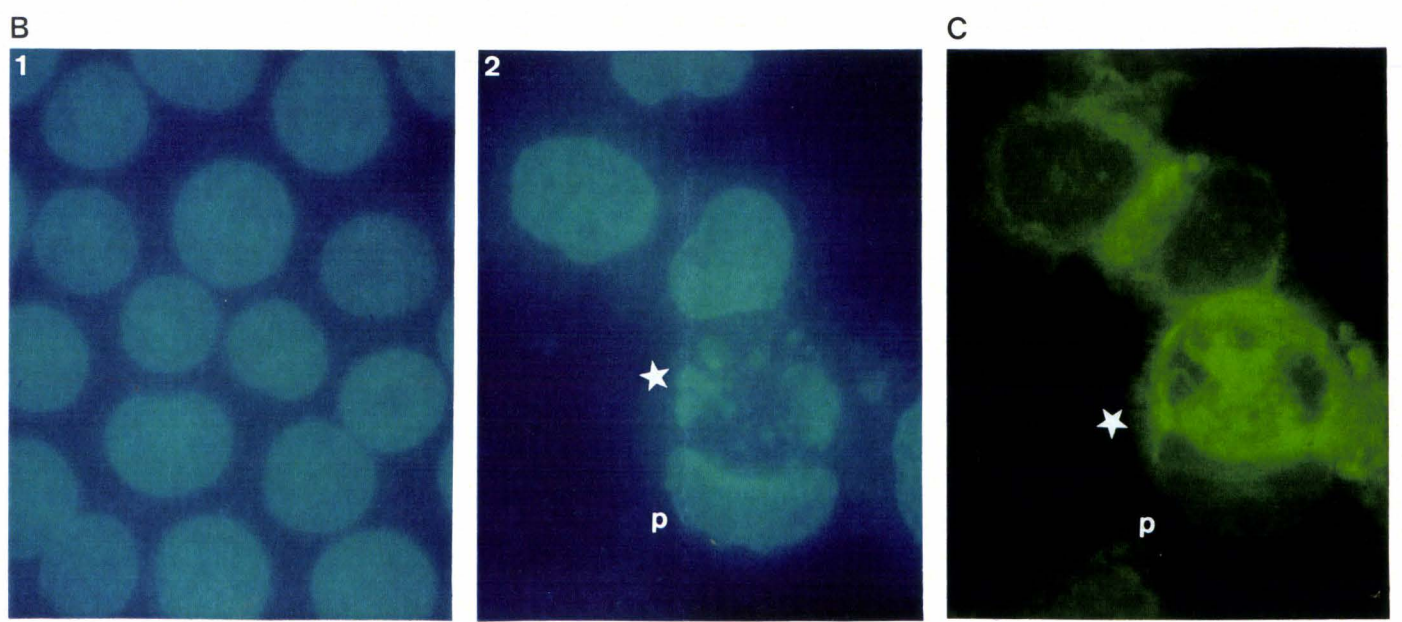
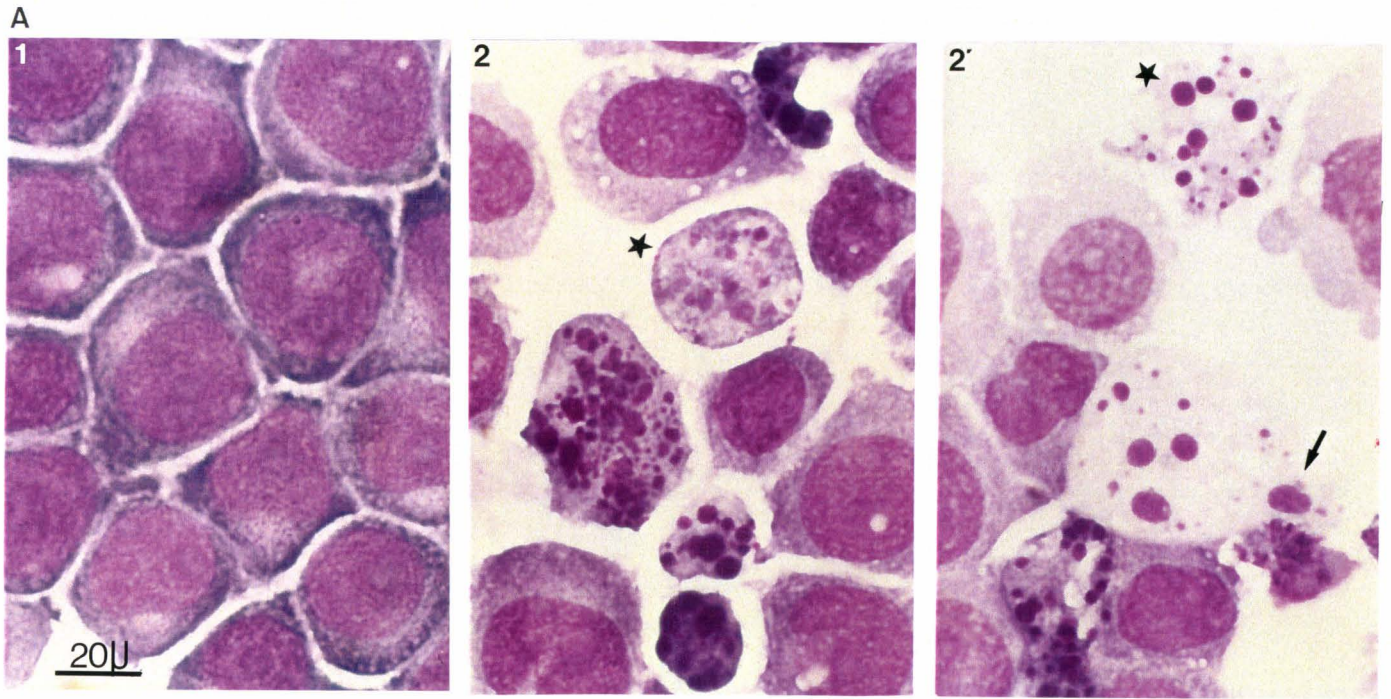


Figure 4 : Morphologie des cellules RPMI 8226 en coloration May-Grünwald Giemsa (MGG, A), ou par le Hoechst (B), ou par l'annexine V (C). Grossissement x 1000
 1 : cellules témoins, 2 : cellules traitées par l'ATRA (1 μM)

★ : cellules apoptotiques, → : corps apoptotiques, p : cellule qui phagocyte

b) Observation des cellules colorées par le Hoechst 33258

La coloration par le Hoechst 33258 permet la visualisation de la chromatine (voir appendice technique et la Figure 4B) et la distinction nette entre les cellules apoptotiques, les cellules intactes et les cellules nécrosées. La figure de mitose est également bien distincte de la figure d'apoptose (non montrée). Cette méthode est utilisée conjointement à d'autres méthodes (coloration MGG, détection de la TGt par IFI ou observation des membranes marquées par l'annexine V) sur un même échantillon de cellules. En effet, pour ces études, plusieurs lames peuvent être préparées simultanément et stockées à -20°C.

Pour mettre au point la technique, nous avons comparé les 3 techniques de Dive *et al*, 1993 (1), Galli *et al*, 1993 (2) et Oberhammer *et al*, 1993 (3), dont nous récapitulons ci-dessous les grandes étapes :

(1) cyto centrifugation cellulaire > fixation par du méthanol/acide acétique (v/v : 3 :1) > coloration au Hoechst 33258 à 0,1 µg/ml dans du PBS ou bien :

(2) fixation par le paraformaldéhyde (PAF) 1% dans du PBS > cyto centrifugation cellulaire > coloration au Hoechst 33258 à 0,1 µg/ml dans du PBS

(3) coloration au Hoechst 33258 à 0,8 µg/ml dans du PBS > fixation par le PAF 3% dans du PBS et lavages > cyto centrifugation cellulaire.

Au niveau de l'efficacité de la coloration, du maintien de l'intégrité des cellules et des noyaux, les trois techniques sont équivalentes mais les techniques (2) et (3) présentent des inconvénients. On observe en particulier une perte des cellules dans les étapes de fixation et lors des nombreux lavages. C'est pourquoi la technique (1) a été retenue. Elle permet la quantification précise des cellules en apoptose tardive. La fixation par le PAF 1% a été retenue pour les doubles marquages, l'observation du noyau et l'immunofluorescence par exemple.

Les cellules non traitées (photo B.1) montrent un noyau généralement rond, coloré de façon homogène.

Les cellules apoptotiques induites par l'ATRA (photo B.2) présentent comme décrit plus haut une condensation et une fragmentation chromatiniennes (mieux observées). On ne voit pas de phénomènes de marginalisation. Les corps apoptotiques sont souvent bien visibles mais peu nombreux.

Une double coloration par le Hoechst (photo B.2) et l'annexine V marquée à la FITC (photo C.2) met en évidence, en parallèle, l'importance des phosphatidyl-sérines relocalisées à la surface externe de la membrane plasmique et la visualisation de la chromatine (ceci est surtout intéressant pour les cellules apoptotiques dont la chromatine condensée et fragmentée est visible

par la coloration de Hoechst). On remarque aussi la phagocytose d'une cellule marquée par l'annexine V par une cellule non marquée (cellule p dans B.2 et C.2) et dont le noyau est intact.

c) Observation des cellules au microscope électronique

La microscopie électronique a permis de caractériser plus en détail la morphologie apoptotique (Figure 5).

Tout d'abord, la photo A.I montre une cellule en interphase : hétérochromatine et eu-chromatine apparaissent dispersées dans le noyau bien rond. Sur d'autres clichés, un aspect circonvolé du noyau, signe de malignité majeure, est également observé. Différents organites sont visibles comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique granuleux en profil. La surface membranaire est souvent irrégulière comme on le voit sur la photo. L'aspect de la cellule en mitose (photo A.II) est bien sûr ici complètement différent de celui de la cellule apoptotique. L'enveloppe nucléaire est absente, et seule la chromatine condensée en chromosome et les mitochondries restent identifiables dans la cellule.

La morphologie des cellules apoptotiques, traitées pendant 6 jours par l'ATRA (B.I), est bien distincte de celle des cellules non traitées : elles présentent des fragments nucléaires, toujours entourés d'enveloppe nucléaire, dont les feuillettes interne et externe sont tous deux bien visibles. Des masses d'hétérochromatine homogène et condensée (très foncées) sont présentes en marge de ces fragments nucléaires. Les mitochondries apparaissent intactes. De nombreuses vacuoles sont présentes dans le cytoplasme, témoignant sans doute d'une souffrance cellulaire, due à l'effet du traitement. A un stade plus avancé (photo B.II), le cytoplasme se condense et déforme la cellule. Il s'agit sans doute de l'étape précédant la formation des corps apoptotiques.

La microscopie électronique est un précieux outil pour notre étude fine des événements apoptotiques et confirme les observations obtenues par les autres méthodes morphologiques déjà décrites.

2) Cinétique d'apparition de l'apoptose

Le pourcentage de cellules apoptotiques, caractérisées par la coloration MGG, par le Hoechst et par la méthode TUNEL a été mesuré chaque jour de la période d'induction et mis en corrélation avec des critères de prolifération des cellules (nombre de cellules vivantes et pourcentage de cellules Ki-67 positives évalués parallèlement). La figure 6 montre les résultats d'une expérience typique.

Le traitement par l'ATRA (1 μ M) sur les cellules RPMI 8226 entraîne l'apparition d'apoptose, observée aussi bien par coloration MGG, que par la coloration de Hoechst ou

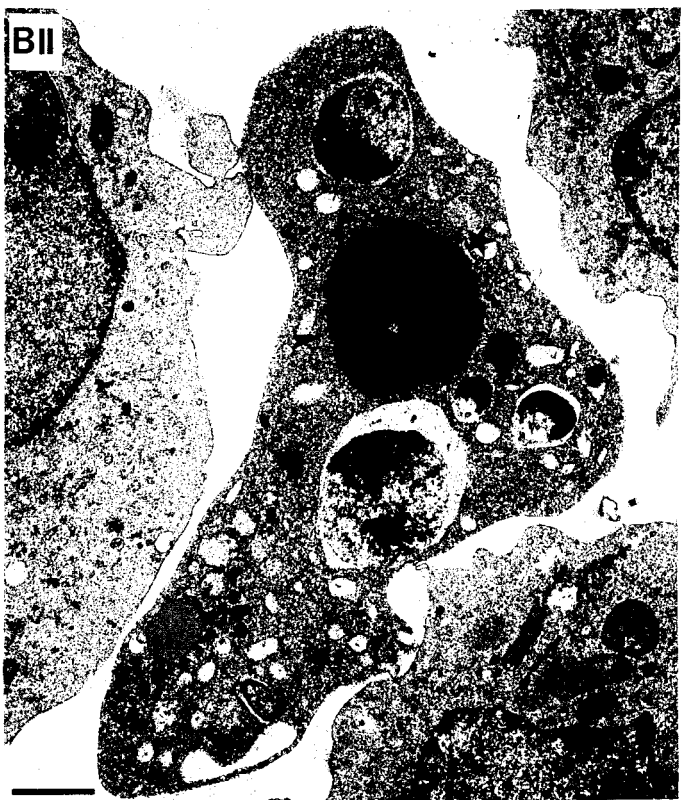
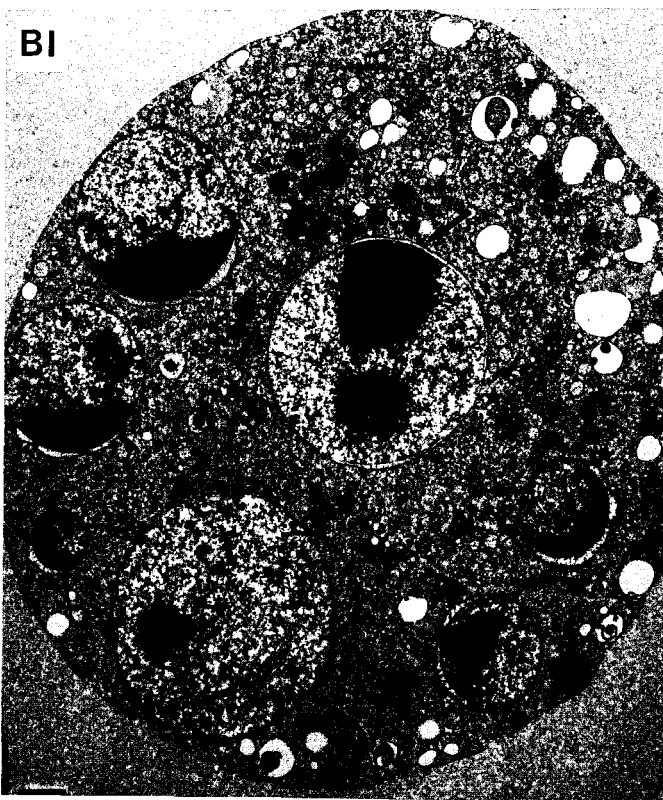
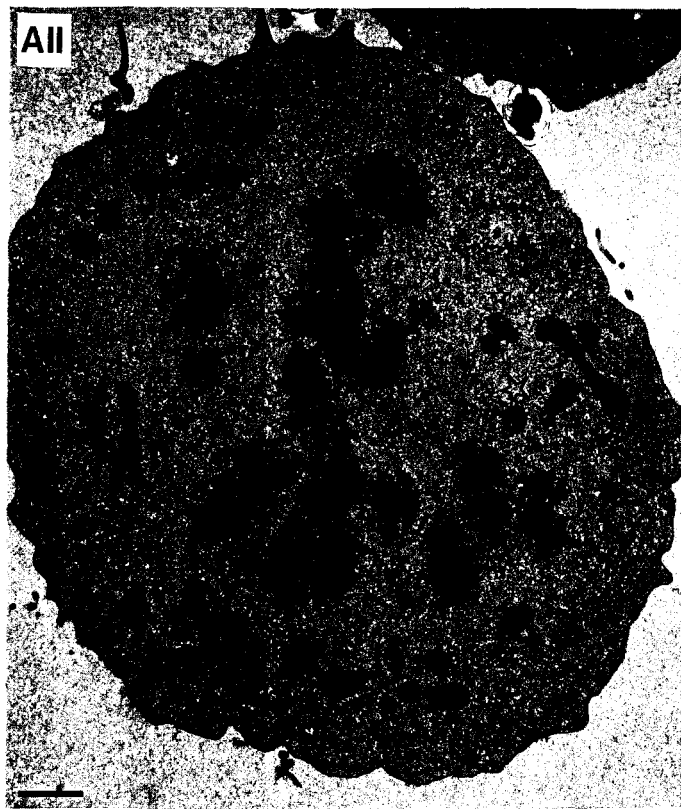
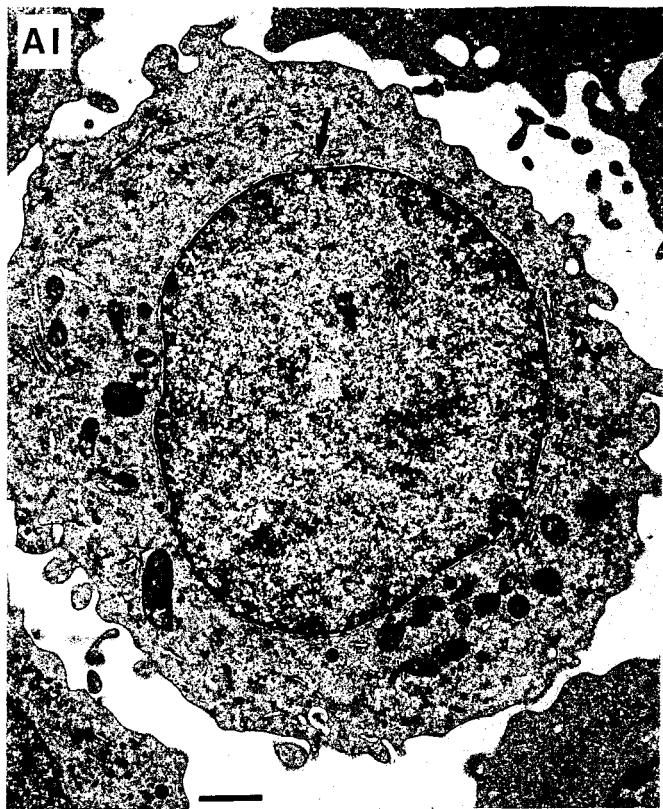


Figure 5: Morphologie des cellules RPMI 8226 après six jours de traitement en présence d'ATRA (1 μ M) ou non, observée en microscopie électronique (la barre = 1 μ m).

→ : enveloppe nucléaire, > : hétérochromatine, ★: fragments nucléaire, ☆ mitochondrie.

	A : contrôle	B : ATRA
I	cellule interphasique	apoptose précoce
II	cellule en mitose	apoptose tardive

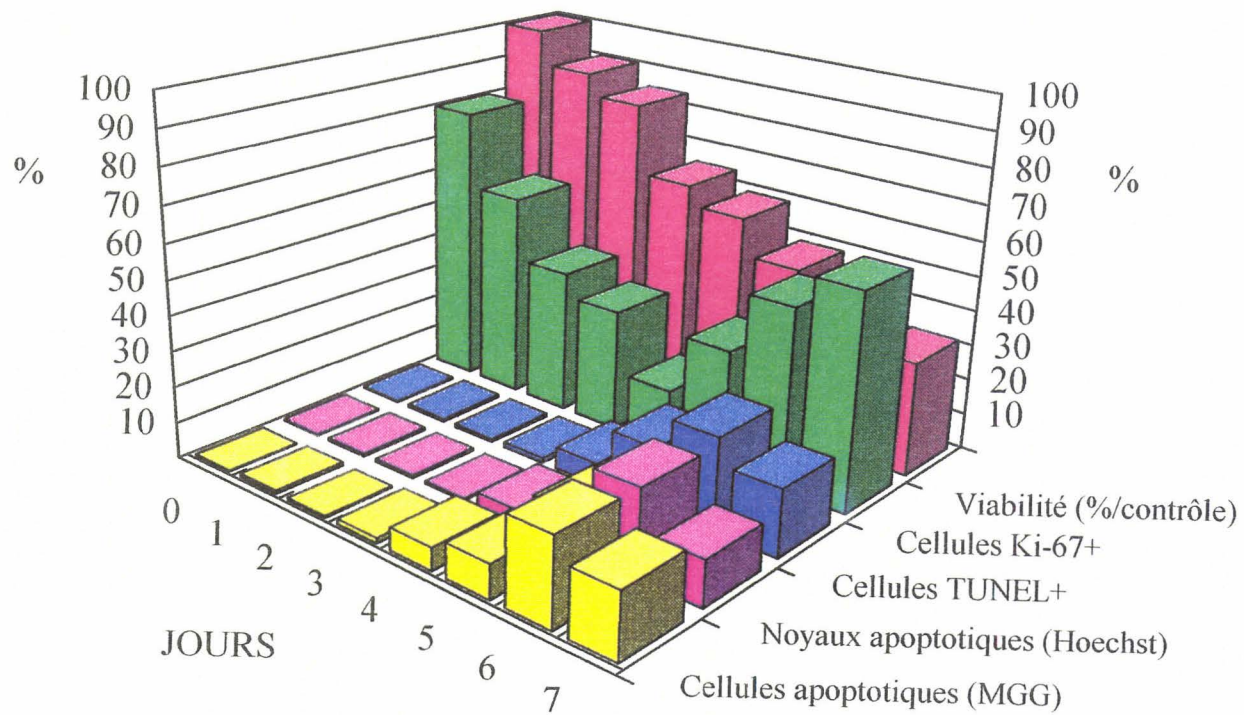


Figure 6 : Cinétique d'apparition de l'apoptose induite par l'ATRA.

Le pourcentage de cellules vivantes (%/contrôle), de cellules Ki-67+(%/cellules totales) et de cellules apoptotiques (%/cellules totales) a été mesuré après 6 jours de traitement.

l'utilisation de la technique TUNEL dès le 5^{ème} jour (16,9 % observées par la méthode TUNEL). C'est au 6^{ème} jour que le pourcentage de cellules apoptotiques est le plus important (26 %). Au 7^{ème} jour, il diminue (18,7 %). Parallèlement, des cellules recommencent à proliférer car le nombre de cellules Ki-67 positive, très faible jusqu'au cinquième jour (17 % de cellules viables), augmente et atteint 58,5 % au 6^{ème} jour.

Ces données suggèrent que les cellules apoptotiques disparaissent à partir du 5^{ème} jour de traitement, sans doute phagocytées par les cellules voisines. Par contre, des cellules survivantes (Ki-67 positives) recommencent à proliférer parallèlement à la disparition de l'effet inducteur de l'ATRA. On observe donc une réversibilité des effets de l'ATRA pour les cellules non apoptotiques.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette réversibilité ainsi que la faible valeur du pourcentage d'apoptose induit par l'ATRA (n'excédant pas plus de 20% dans le meilleur des cas). Notons que l'ATRA est administré à 1 μ M au jour 0 et n'est pas rajouté ensuite. Pendant cette période, une certaine proportion de cellules pourrait être résistante à ce signal.

1) La limite des effets peut tout d'abord s'expliquer par la vitesse de dégradation de l'ATRA. Cependant, l'utilisation de rétinoïdes de synthèse, connus comme étant plus stables que l'ATRA et mimant ces effets, ne permet pas l'obtention d'un pourcentage plus important (voir chapitre II). On ne peut donc pas mettre en cause le métabolisme de l'ATRA.

2) Ensuite, il est peut être nécessaire qu'une cellule soit à une étape précise du cycle cellulaire pour qu'elle puisse être induite en apoptose après contact avec l'ATRA. Cette hypothèse ne semble pouvoir expliquer nos résultats dans la mesure où, bien qu'instable, on estime que l'ATRA est capable d'exercer ces effets pendant 24h. Par ailleurs, on sait que la durée d'un cycle entier d'une cellule de cette lignée est, elle aussi, de 24h. La cellule entre donc en contact avec l'ATRA à toutes les phases du cycle cellulaire, et celui-ci ne peut donc pas être associé à la résistance des cellules vis à vis de l'induction de l'apoptose.

3) Enfin, notre lignée cellulaire est peut-être particulièrement instable et des mutations, provoquant une résistance à l'apoptose sont peut-être engendrées comme c'est le cas dans d'autres modèles comme des lignées de cancer de l'ovaire induites en apoptose par d'autres agents (Poulain L., 1997, communication personnelle).

3) Analyse biochimique

Dans notre étude, nous avons caractérisé les marqueurs apoptotiques classiques de l'apoptose à savoir l'activation des nucléases qui entraîne la fragmentation de l'ADN

(caractérisée par la méthode TUNEL et l'analyse qualitative et quantitative de l'ADN extrait des cellules apoptotiques) ainsi que l'induction de la transglutaminase tissulaire. Puis nous avons considéré des événements concernant des protéines qui seraient des cibles directes (PKC δ , lamines) ou indirectes (phosphatidyl-sérine) de l'action de caspases pendant l'apoptose.

a) Fragmentation de l'ADN

i) Analyse qualitative : l'obtention d'échelle

Comme nous l'avons vu dans la revue générale, la dégradation de l'ADN a été longtemps considérée comme un marqueur important de la mort cellulaire programmée.

Nous avons observé ce phénomène dans nos cellules (Figure 7A). Le couloir 1 montre le profil électrophorétique sur gel d'agarose de l'ADN extrait de cellules contrôles. Les cellules traitées pendant 3h par la camptothécine donnent une échelle d'ADN servant de témoin positif (couloir 2). Ce modèle nous a aidé à mettre au point la technique d'extraction. Les cellules induites par l'ATRA (1 μ M) donnent une échelle d'ADN typique bien que discrète (couloir 3) et ce dès le 5^{ème} jour de traitement.

L'obtention d'échelle d'ADN s'est révélée délicate à obtenir car nous avons un pourcentage faible d'apoptose et donc une surcharge en ADN intact par rapport à l'ADN fragmenté et sans doute un plus grand risque de perdre les petits fragments d'ADN au cours de l'extraction. De plus, nous n'avons pas eu recours à des techniques utilisant la radioactivité pour la mise en évidence de l'ADN car celle-ci augmente les cassures de l'ADN (Deboise et Sen, 1992). L'expérience s'est révélée également difficilement reproductible sur le plan quantitatif (nous avons constaté que deux dépôts d'un même échantillon peuvent présenter des quantités différentes d'ADN dégradé).

En accord avec nos résultats, certains auteurs (Collins et al, 1992) ont montré le caractère variable, tant pour l'intensité, que pour la précocité de la fragmentation de l'ADN, suivant les cellules et même parfois son inconstance et son absence de spécificité. Afin de compléter ces résultats, nous avons donc déterminé le pourcentage d'ADN fragmenté obtenu dans chaque série.

ii) Analyse quantitative : dosage de l'ADN fragmenté

La quantification d'ADN intact et fragmenté ainsi que l'estimation d'un pourcentage d'ADN fragmenté par rapport à l'ADN intact ont été évalués par dosage quantitatif utilisant la méthode de Burton (1956). 10,1 \pm 2 % d'ADN fragmenté sont détectés dans les cellules traitées par l'ATRA et seulement 0,5 % dans les cellules non traitées.

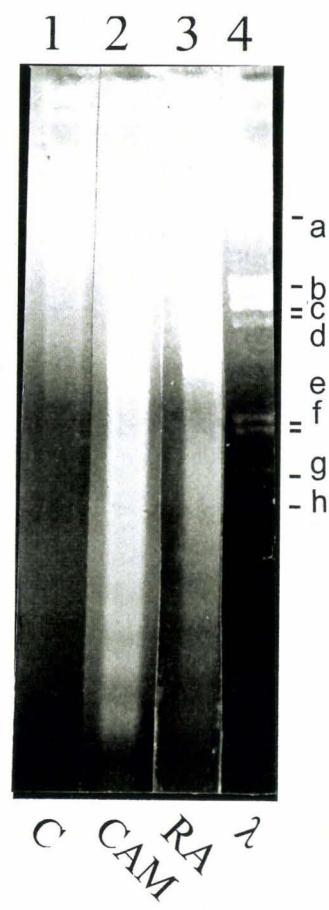
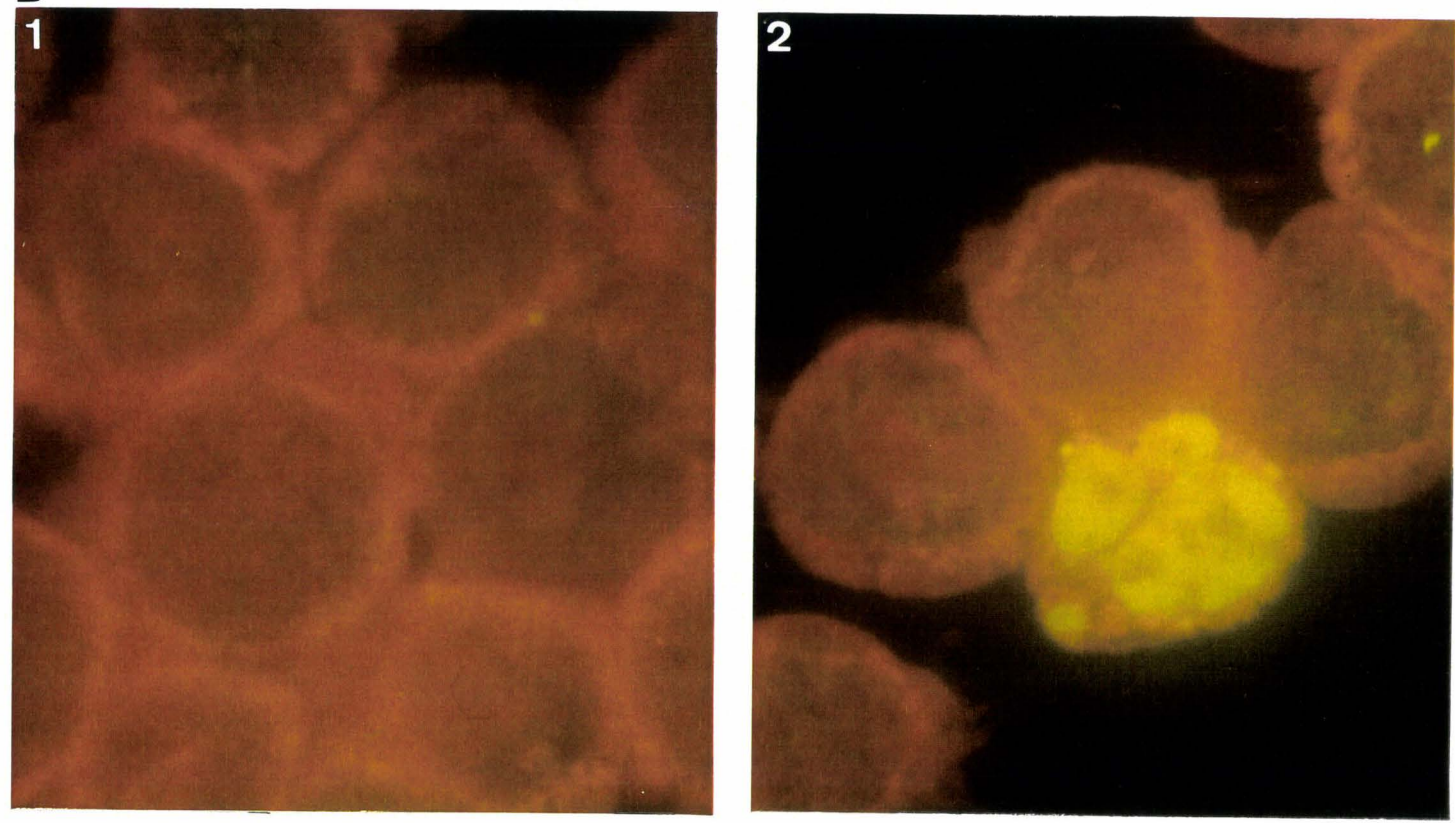
A**B**

Figure 7 : Effet de l'ATRA sur la fragmentation de l'ADN

- A) Analyse de l'ADN par gel d'électrophorèse : couloir 1 : cellules témoins, couloir 2 : cellules traitées par la camptothécine pendant 3h, couloir 3 : cellules traitées par l'ATRA pendant 5 jours, couloir 4 : marqueur de tailles l DNA/EcoRI/Hind III (a : 21226 , b : 5100 , c : 4277 , d : 3530 , e : 2027 , f : 1904 , g : 1594 et h : 1330 bp respectivement).
- B) Morphologie des cellules observée par la méthode TUNEL après 6 jours de traitement en présence (2) ou non (1) d'ATRA (1µM). (grossissement x 1000)

La méthode exige de travailler sur une quantité importante de cellules (40 millions) pour pouvoir détecter l'ADN fragmenté. Par contre, les solutions d'ADN intact doivent être diluées (au 1/2, 1/5, 1/10) avant le dosage afin de pouvoir utiliser la gamme étalon comme référence qui fournit une échelle de mesure relativement étroite (0 à 100 µg).

iii) Détection in situ de la fragmentation de l'ADN (TUNEL)

La technique TUNEL permet de détecter *in situ* les cassures de l'ADN et a donc l'avantage d'associer la détection de lésions moléculaires à l'observation morphologique des cellules. Les cellules témoins sont TUNEL négatives (Figure 7B, photo 1). Les cellules apoptotiques traitées par l'ATRA présentent un niveau élevé de fragmentation de l'ADN dans la chromatine condensée et fragmentée (photo 2).

Notons que pour les cellules traitées par l'ATRA, on observe des cassures diffuses à des temps précoces alors que la condensation de la chromatine n'est pas encore décelable. Ainsi, on peut distinguer par cette technique, des cellules en phase précoce de l'apoptose, dont l'ADN présente des coupures mais dont la chromatine est peu condensée et le noyau n'est pas encore fragmenté. Une contre-coloration au bleu Evans (non montrée) permet de voir que la fragmentation en corps apoptotiques a lieu plus tardivement et ce, en même temps que la fragmentation nucléaire et une forte condensation de la chromatine. Une double coloration annexineV-TUNEL permet de voir l'apparition des modifications membranaires conjointement à l'apparition des cassures au niveau de l'ADN en phase précoce ou tardive.

b) Induction de la transglutaminase tissulaire

La TGt a été impliquée dans la formation des corps apoptotiques (Fesus *et al*, 1987) et des travaux réalisés au sein du laboratoire sur les cellules HL-60, HEL et SK-N-SH ont montré une augmentation de l'activité enzymatique de la TGt après traitement des cellules par l'ATRA (Manechez, 1991). L'induction de l'activité enzymatique et l'expression de la protéine ont été étudiés dans les cellules traitées par l'ATRA et le 9-cis RA.

i) Dosage de son activité enzymatique

Comme le montre la figure 8, le niveau basal d'activité de la TGt dans les cellules non traitées est à la limite de la détectabilité. Le traitement par l'ATRA ou le 9-cis RA pendant 48h entraîne une augmentation importante de cette activité.

Comme le montre la figure 9, le taux de TGt continue de monter jusqu'au 4^{ème} jour et atteint un plateau qui se maintient jusqu'au 7^{ème} jour.

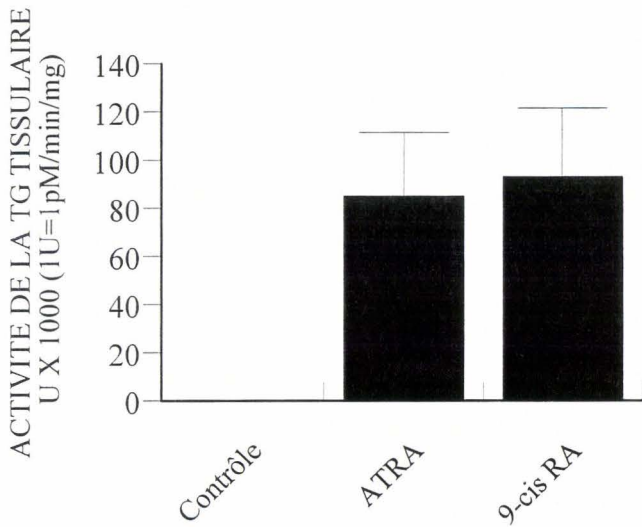


Figure 8 : Mesure de l'activité enzymatique de la TGt après 48h de traitement par l'ATRA (1 μ M) ou du 9-cis RA (1 μ M).

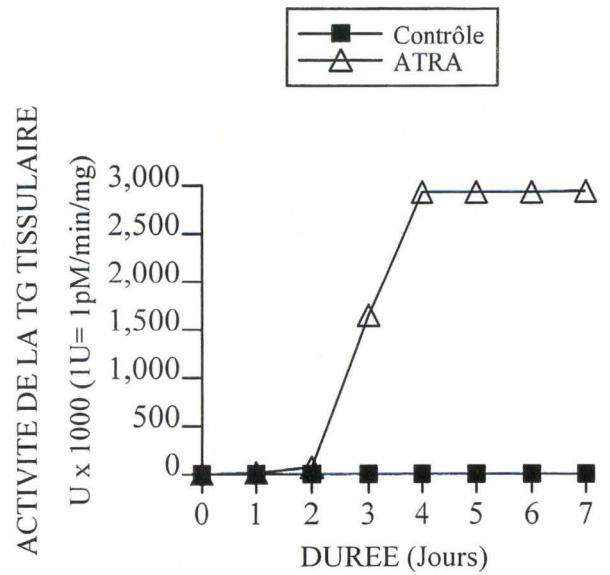


Figure 9 : Evolution de l'activité enzymatique de la TGt dans les cellules RPMI 8226 après traitement ou non par l'ATRA (1 μ M) pendant 6 jours.

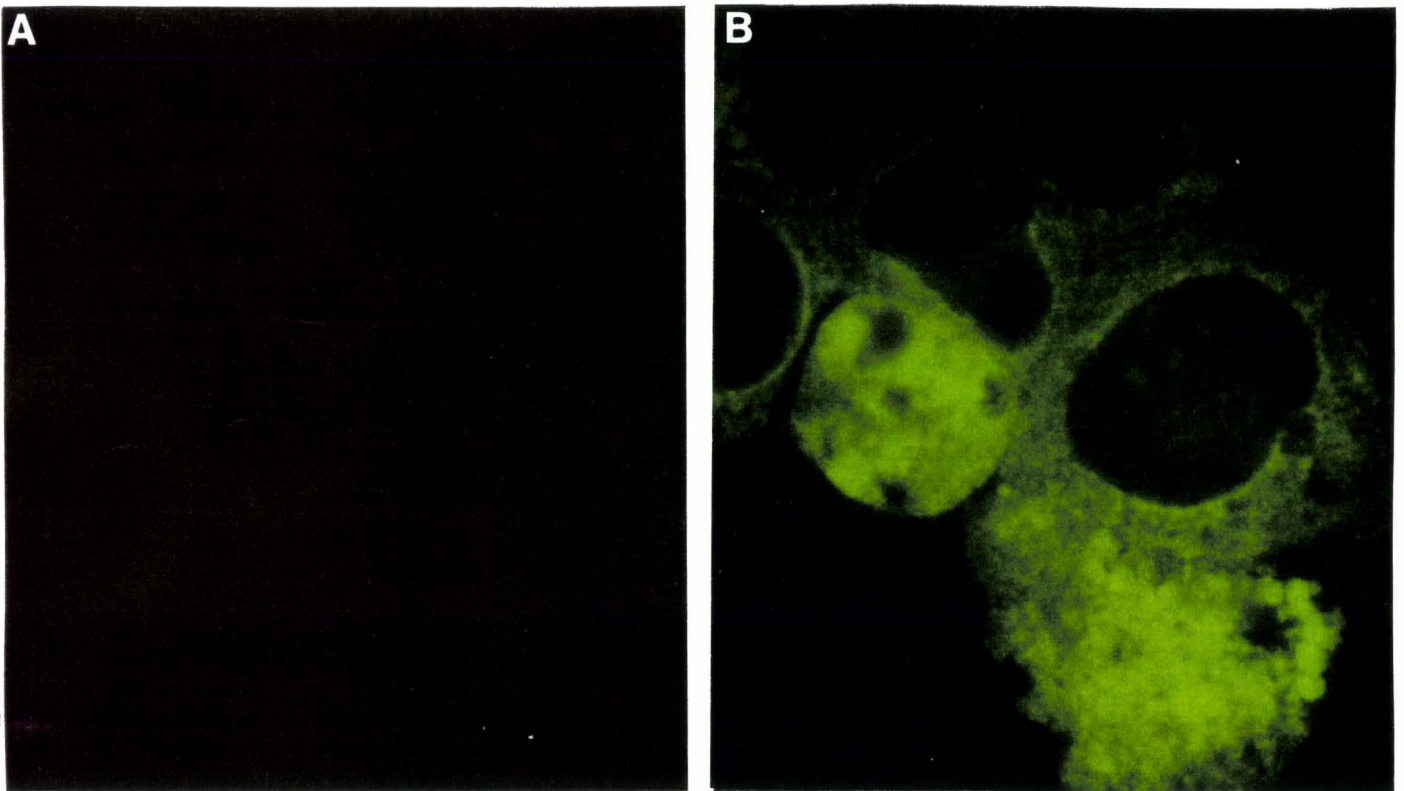


Figure 10 : Expression de la TGt détectée par IFI après 6 jours de traitement en présence (B) ou non (A) d'ATRA (1 μ M) (x 1000).

ii) Détection par immunofluorescence indirecte

La détection de la TGt par IFI, après 6 jours d'induction des cellules RPMI 8226, a permis d'observer une augmentation de l'intensité de marquage des cellules traitées par l'ATRA et ainsi de confirmer les résultats précédemment obtenus.

Les cellules témoins (Figure 10, photo A) ne sont pas marquées. Les cellules traitées par l'ATRA pendant 6 jours (photo B) présentent une fluorescence intense au niveau des cellules apoptotiques. Aux premiers stades de l'apoptose, on observe un anneau périnucléaire de TGt fluorescente puis un phénomène de diffusion à travers tout le cytoplasme pour les stades ultérieurs. La limite entre le noyau et le cytoplasme des cellules apoptotiques disparaît, des granulations de plus en plus intenses apparaissent. Ainsi, les cellules apoptotiques de taille diverse sont extrêmement chargées en TGt.

c) Modification des membranes mise en évidence par l'annexine V

La détection de modifications de la membrane plasmique (l'apparition de phosphatidyl-sérine (PS) sur le feuillet externe de la membrane qui constitue un marqueur apoptotique) se fait par l'annexine V couplée à la fluorescéine. Les cellules témoins ne sont pas marquées. Les cellules traitées par l'ATRA, sont marquées dès le 4^{ème} jour par l'annexine V (Figure 4.C.2, page 87).

Cette modification membranaire est utilisable pour le fractionnement des cellules apoptotiques. Des billes magnétiques marquées à l'annexine V permettent en effet de réaliser une sélection positive et d'obtenir des échantillons considérablement enrichis en cellules apoptotiques.

Dans notre modèle, le pourcentage de cellules apoptotiques obtenu après traitement par l'ATRA est faible et une étape d'enrichissement est indispensable pour l'étude de certaines caractéristiques biochimiques spécifiques des cellules apoptotiques (sans interférence avec d'autres cellules). Nous y avons eu recours pour la caractérisation d'événements difficiles à mettre en évidence (par exemple la détection de produits de dégradation obtenus dans l'apoptose comme celui des lamines). La sélection des cellules A+ (annexine positive) permet une concentration de l'échantillon ($\times 4,7 \pm 0,4$). Le rendement, correspondant au nombre de cellules apoptotiques récupérées par rapport au nombre total mesuré dans l'échantillon initial, est satisfaisant ($94,3 \% \pm 4$). Mais cette sélection entraîne des cellules A- (annexine négative) ($5,7\% \pm 4\%$) qui pourraient phagocyter les cellules en apoptose.

d) Etude de modifications de protéines

i) Translocation de la PKC δ

Dans les cellules témoins (Figure 11.A, photo 1), la détection de la PKC δ par IFI (voir appendice technique), montre une localisation cytoplasmique. Après 24h de traitement par l'ATRA (photo 2), on observe une translocation de la protéine du cytoplasme au noyau. Cet effet est maximum au 2^{ème} jour (photo 3). Nous voyons également une diminution de l'intensité de la PKC δ dans le cytoplasme. Cette translocation au noyau serait une étape consécutive au clivage par une caspase (Kaufmann *et al*, 1996).

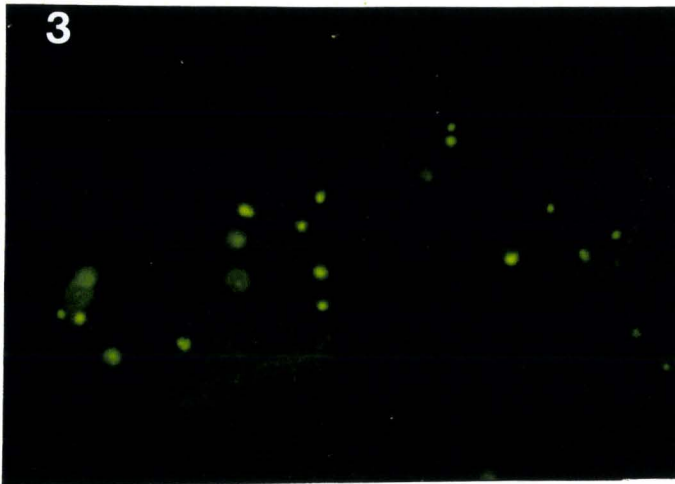
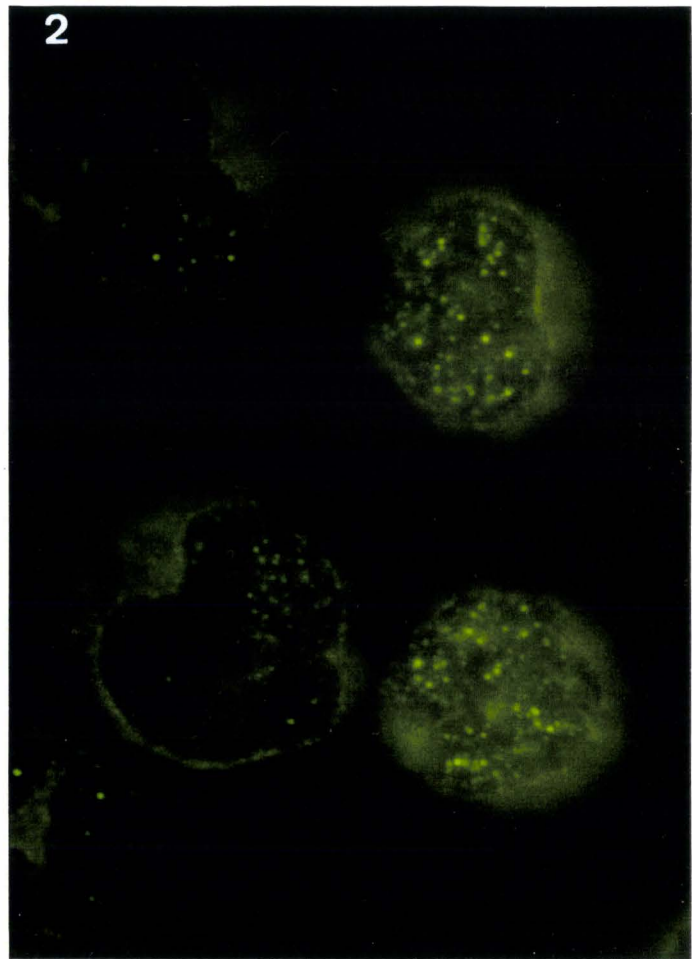
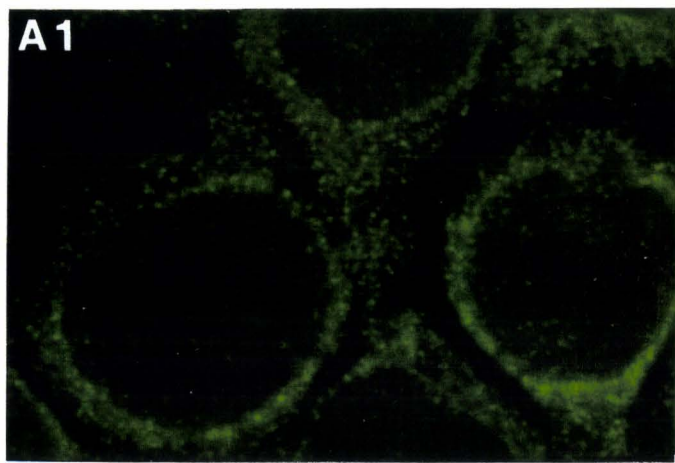
L'étude préliminaire par western blot puis révélation par un anticorps monoclonal anti-PKC δ (voir appendice technique, Figure 11.B) montre que dans les cellules traitées par l'ATRA, la PKC δ (de masse moléculaire 78 KD, bande majoritaire obtenue dans l'échantillon des cellules témoins) est clivée en une forme de 40 KD. Des études utilisant des inhibiteurs de caspases sont à effectuer pour confirmer qu'il s'agit bien d'une protéolyse induite par les caspases apoptotiques.

ii) Remaniement de la lamine B

Nous nous sommes intéressés à la lamine B qui est un élément important de la structure du noyau.

La détection de la lamine B par IFI montre que les cellules témoins ont un noyau entouré d'un réseau dense et uniforme de lamine (Figure 12 A, photo 1).

Après 6 jours de traitement par l'ATRA, les cellules, observées au microscope à fluorescence (Figure 12 A, photo 2 et 3) et au microscope confocal (Figure 12 B) présentent un remaniement structural du noyau qui s'accompagne d'un remaniement de la localisation des lamines. Dans un premier temps (photo 2), le noyau se fragmente en conservant l'organisation du réseau de lamine, grossièrement similaire aux cellules de départ. La coloration au bleu Evans ne montre pas de corps apoptotique à ce stade. Plus tard (Figure 12.A, photo 3 et Figure 12.B), quand les corps apoptotiques deviennent visibles, la chromatine condensée et fragmentée se trouve entourée de lamine. Ce résultat est cohérent avec celui observé en microscopie électronique où on peut voir la reformation de l'enveloppe nucléaire autour de la chromatine condensée et fragmentée (Figure 5, photo B.I et B.II). Enfin, le marquage apparaît dispersé et fragmentaire dans toute la cellule (photo 3). Si le remaniement et la diminution du réseau de filaments, observés par IFI, sont incontestables, qu'en est-il du niveau de protéolyse de la protéine ?



B

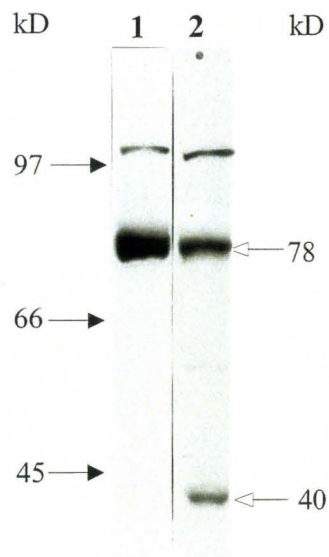


Figure 11 : Effet de l'ATRA (1 μ M) sur la PKC δ :

A) Relocalisation détectée par IFI après 1 et 2 jours de traitement : cellules témoins (1), cellules traitées par l'ATRA pendant 1 (2) et 2 (3) jours. (grossissement x 1000)

B) Dégradation détectée par Western blot après 4 jours de traitement. 1 : témoin, 2 : traitement par l'ATRA (1 μ M).

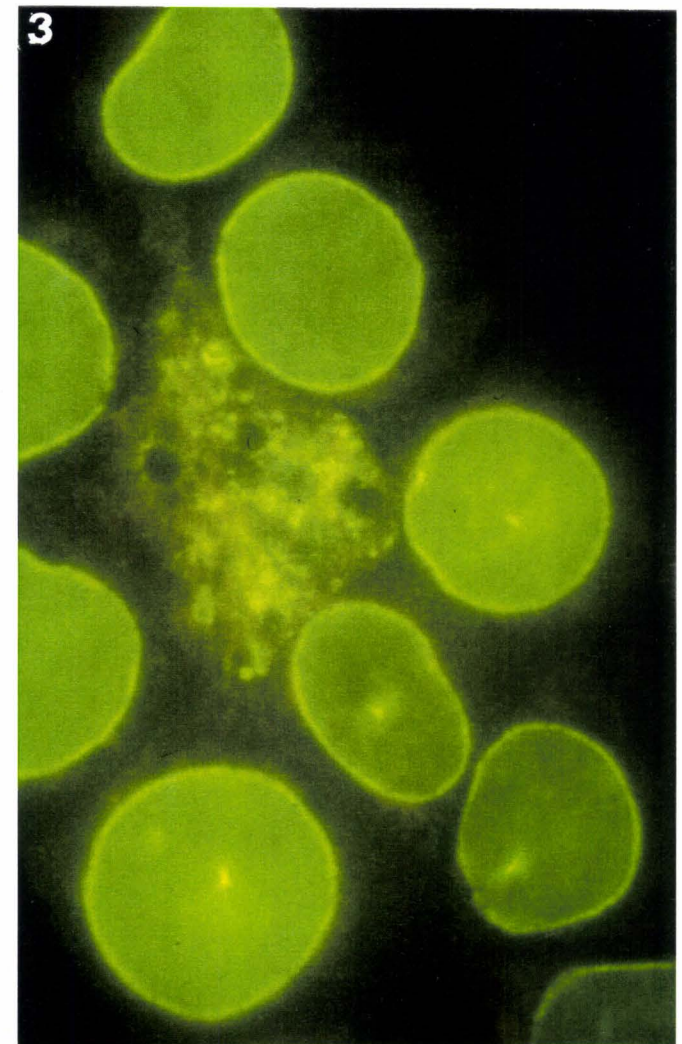
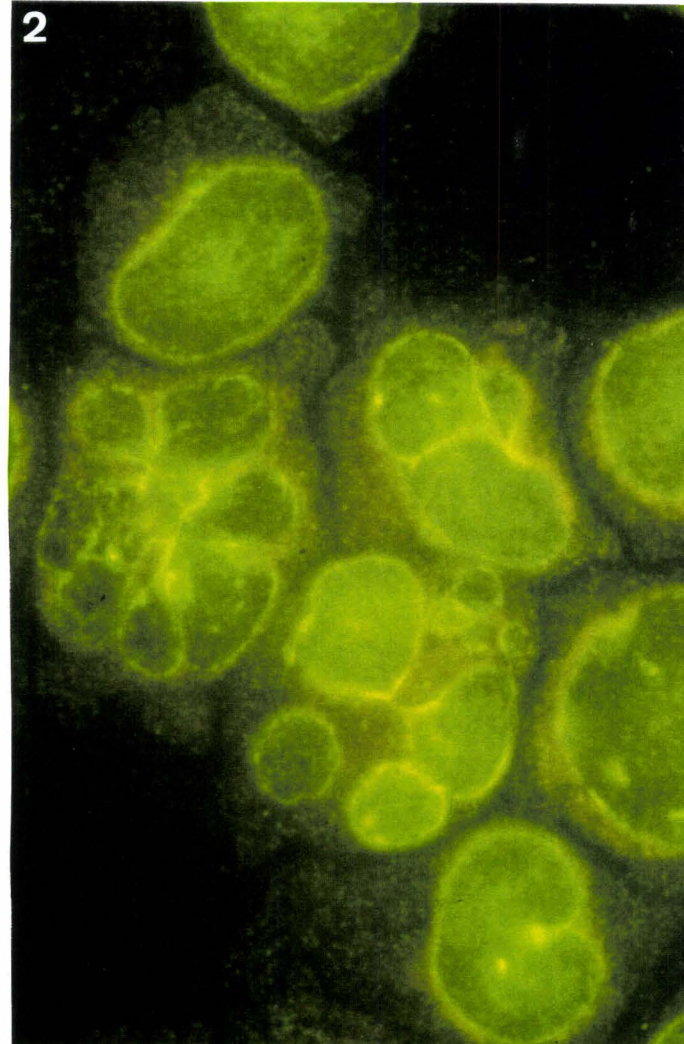
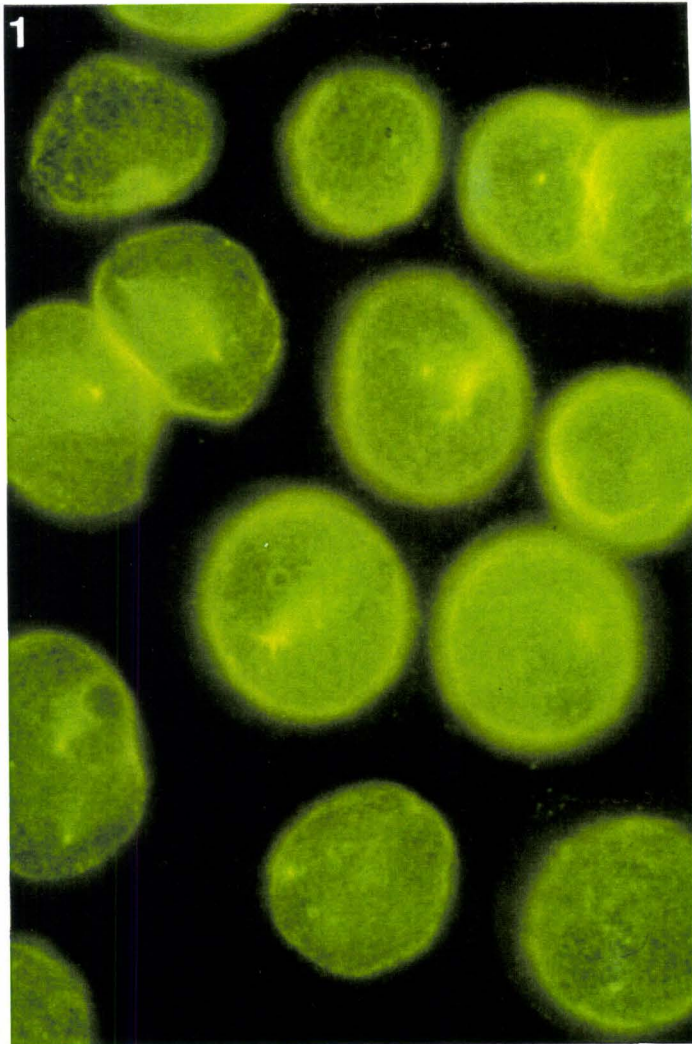


Figure 12A : Détection de la lamine B par IFI. 1 : cellules témoins, 2 et 3 : cellules traitées par l'ATRA pendant 6 jours (1 μ M).

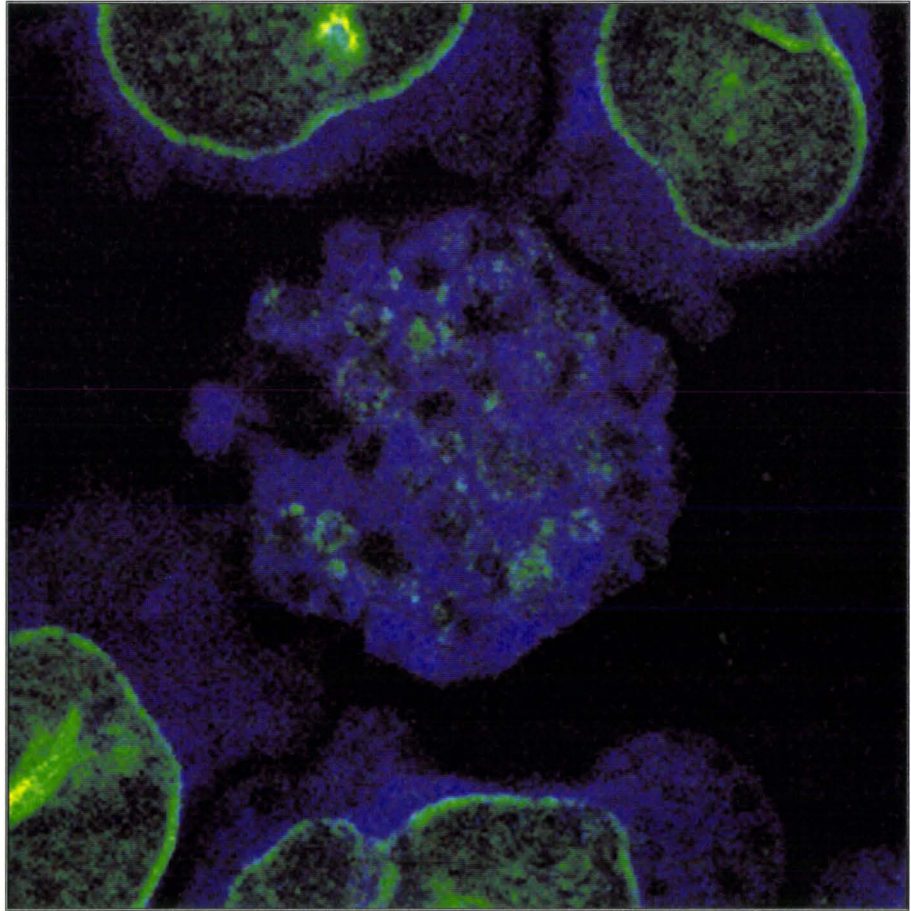


Figure 12B : Détection de la lamine B par IFI après 6 jours de traitement par l'ATRA ($1 \mu\text{M}$). Les cellules colorées par le bleu Evans sont observées en microscopie confocale.

L'état de la protéine a alors été étudié par western blot (Figure 13). Dans les cellules témoins, on observe un doublet majoritaire à 67-72 KD correspondant à la masse moléculaire généralement décrite de la lamine B intacte (forme non phosphorylée et phosphorylée). Dans les cellules traitées pendant 6 jours par l'ATRA, on observe une diminution modérée de ces bandes et semble-t-il, l'apparition discrète d'une bande à 40 KD. Dans d'autres modèles expérimentaux (Oberhammer *et al*, 1994), des fragments de 40-46 KD sont les fragments majeurs de la protéolyse des lamines mais cela n'exclue semble-t-il pas une dégradation en fragments plus petits. Dans notre modèle, nous serions en présence d'un cas d'apoptose où la lamine B est très peu dégradée en début d'apoptose. De plus, notre anticorps polyclonal ne peut pas repérer les fragments C-terminaux potentiels plus petits car il ne reconnaît que la partie centrale de la molécule (Chaudhary et Courvalin, 1993). Enfin, la population de cellules en phase finale d'apoptose est relativement peu élevée dans les échantillons étudiés (peut-être en raison de leur phagocytose par les cellules voisines).

4) Diminution du facteur anti-apoptotique Bcl-2

La détection de bcl-2 par IFI, après 48h d'induction, avec un anticorps monoclonal (voir appendice technique) marqué à la rhodamine montre une diminution de l'intensité de marquage des cellules traitées par l'ATRA (Figure 14, photo B) par rapport aux cellules contrôle non traitées (photo A). Ce résultat a été confirmé par l'analyse en cytométrie de flux.

C. Effets de l'ATRA dans la lignée U266

Les U266 sont des cellules myélomateuses humaines dont la croissance dépend de l'IL-6 qu'elles produisent de manière autocrine. Les effets de l'ATRA et du 9-cis RA sont identiques à ceux obtenus dans les cellules RPMI 8226 (Figures 15, 16, 17, 18). La croissance des cellules est ralentie. Cet effet s'explique par une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose. Deux marqueurs apoptotiques sont mis en évidence : l'activation des nucléases (présence de cassures de l'ADN révélées par la méthode TUNEL) et l'activation de la TGt.

D. Conclusion

Nous avons mis en évidence l'effet antiprolifératif et inducteur apoptotique de l'ATRA dans les cellules myélomateuses humaines RPMI 8226 et U266.

Le ralentissement de la croissance est dû non seulement à une inhibition de la prolifération des cellules mais aussi à une induction de l'apoptose.

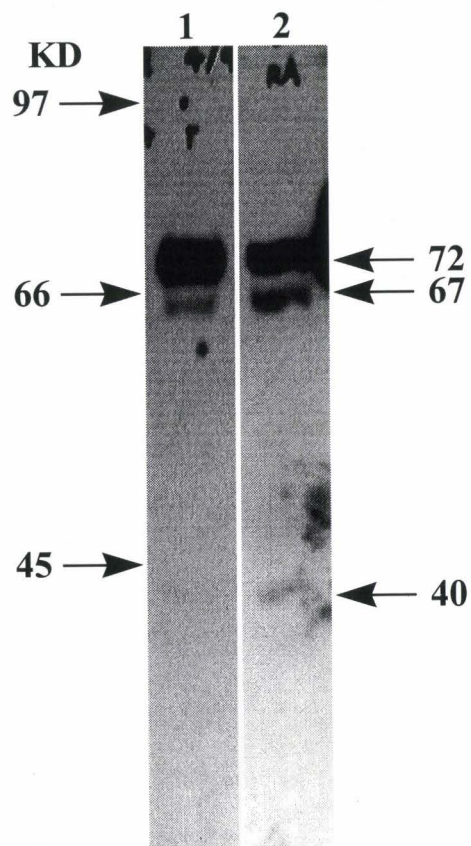


Figure 13 : Effet de l'ATRA (1 μ M) sur la dégradation de la lamine B détectée par Western blot dans les cellules RPMI 8226, après 6 jours de traitement .
 1 : contrôle, 2 : traitement par l'ATRA (1 μ M)

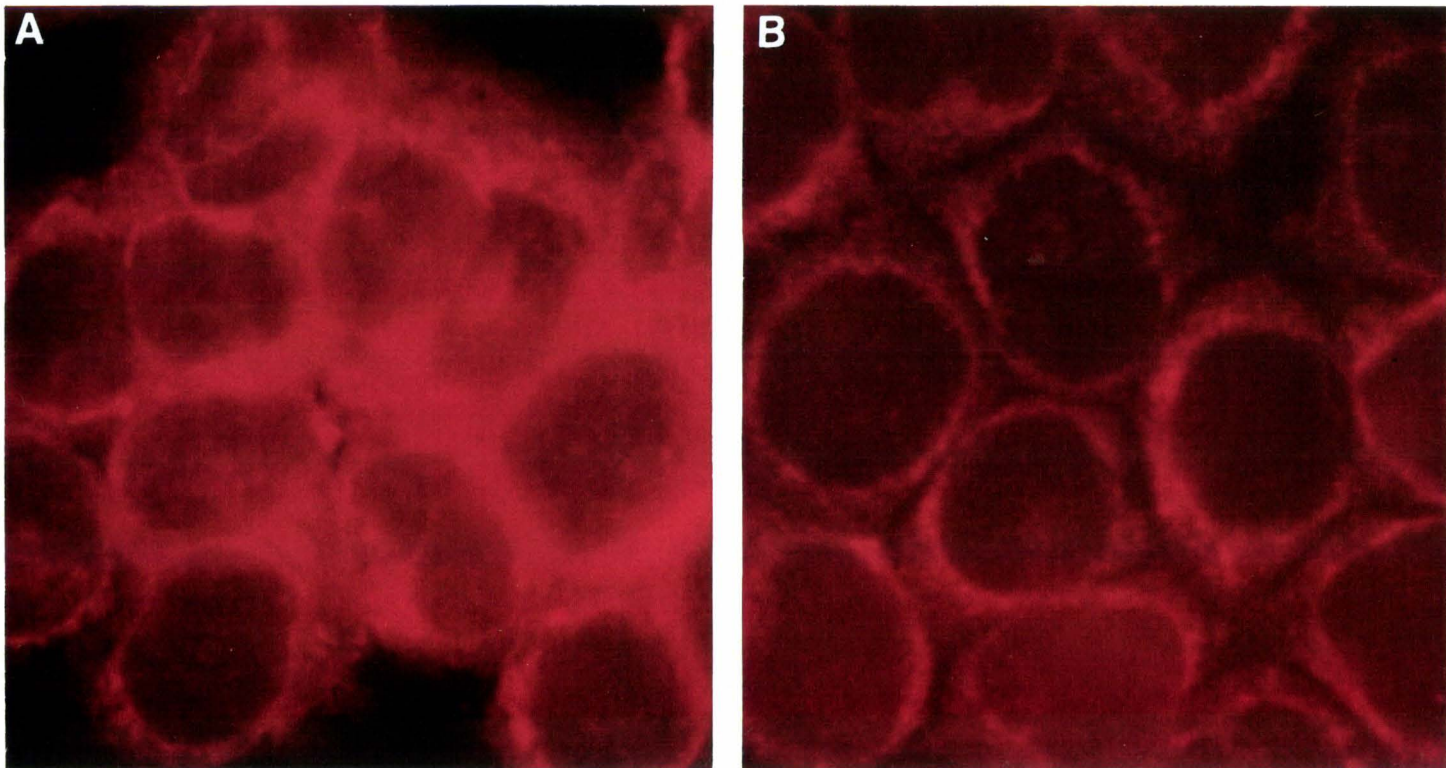


Figure 14 : Effet de l'ATRA (1 μ M) sur l'expression de Bcl-2 détectée par IFI après 2 jours de traitement (grossissement x 1000).
 A : cellules contrôles, B : cellules traitées par l'ATRA (1 μ M)

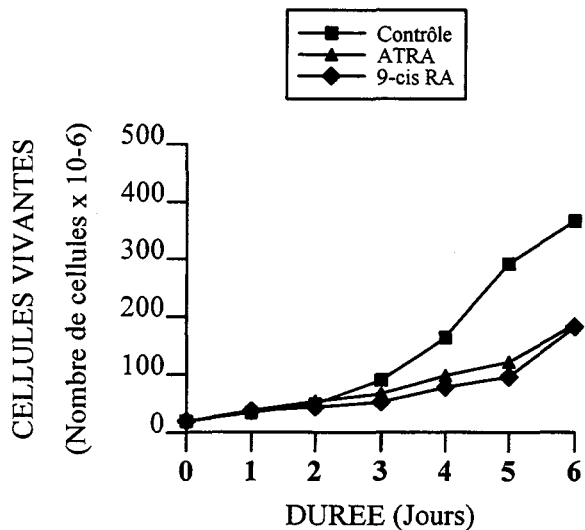


Figure 15 : Croissance d'une population de cellules U266 cultivées en présence ou non d'ATRA (1 μ M) ou du 9-cis RA (1 μ M). Les cellules excluant le bleu trypan sont comptées chaque jour. La déviation standard n'excède pas 17%.

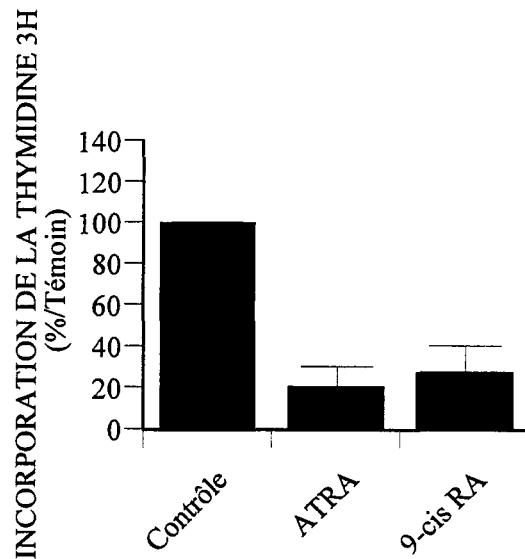


Figure 16 : Prolifération des cellules U266 étudiée par incorporation de thymidine tritiée pendant 3h, après 48h de traitement par les agents indiqués.

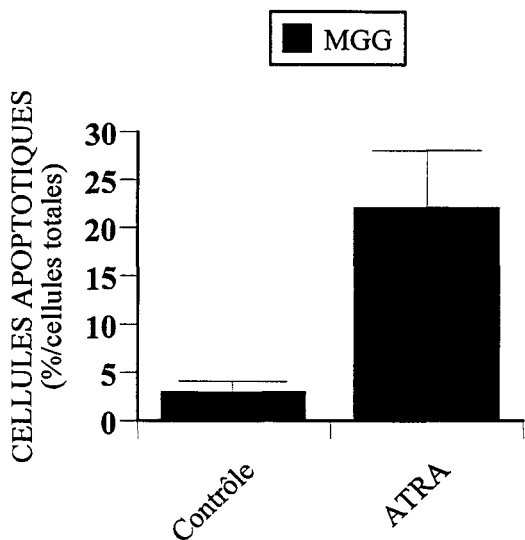


Figure 17 : Quantification des effets de l'ATRA sur l'apoptose des cellules U266 appréciée par coloration au MGG, Hoechst et TUNEL, après 6 jours de traitement .

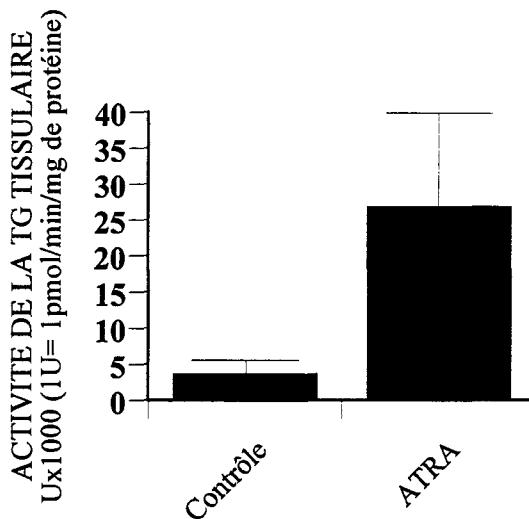


Figure 18 : Mesure de l'activité enzymatique de la TGt dans les cellules U266 après 48h de traitement par les agents indiqués.

1) L'inhibition de la prolifération est mise en évidence, après 48h, de traitement par le test d'incorporation de la thymidine tritiée et, après 3 jours, par l'augmentation des cellules Ki-67 négatives.

Des données conflictuelles ont été rapportées sur l'effet de l'ATRA dans la croissance cellulaire. Certains auteurs observent une inhibition de la prolifération (Koskela *et al*, 1995 ; Taetle *et al*, 1995, Levy *et al*, 1996) tandis que d'autres ne trouvent aucun effet (Chen *et al*, 1996). Nous n'avons pas d'explication claire pour ces différences qui sont probablement dues à l'utilisation de différents sous-clones de RPMI 8226. Le mécanisme par lesquels l'ATRA inhibe la croissance cellulaire du myélome n'est pas clairement établi. Dans les lignées cellulaires myélomateuses dépendantes de l'IL-6, et dans les cellules myélomateuses fraîchement isolées de patients, l'expression du récepteur de l'IL-6 est régulée négativement par l'ATRA qui a été identifié comme un modulateur négatif de la croissance autocrine/paracrine médiée par l'IL-6 (Sidell *et al*, 1991 ; Ogata *et al*, 1994 ; Levy *et al*, 1996 ; Chen *et al*, 1996). Cependant il a également été démontré que l'ATRA inhibe la croissance de lignées cellulaires indépendantes de l'IL-6 (Siegel *et al*, 1992). En fait, les mécanismes par lesquels les rétinoïdes régulent de façon négative la croissance cellulaire tumorale sont encore largement inconnus. Une meilleure compréhension de ces mécanismes exige la caractérisation des sous-types de récepteurs impliqués, RAR et/ou RXR (Leid *et al*, 1992), et l'identification des gènes cibles concernés. Nous verrons dans le chapitre suivant que l'activation des RARs et RXRs est nécessaire pour l'obtention d'une réponse complète sur la prolifération cellulaire et l'apoptose (chapitre II).

2) Nos résultats montrent clairement que l'ATRA est capable d'induire l'apoptose dans les cellules RPMI 8226. Des caractéristiques morphologiques et biochimiques typiques (Arends et Wyllie, 1991) sont observées. Comparée à l'inhibition de la prolifération cellulaire, la cinétique d'induction de l'apoptose apparaît ralentie. Des cellules apoptotiques typiques sont détectées par les colorations MGG et de Hoechst après 4 jours de traitement par l'ATRA. L'apoptose a été étudiée par différentes méthodes. Elles ont permis une caractérisation morphologique fine des événements cellulaires qui se produisent au cours de ce phénomène complexe. Ces méthodes, pour la plupart mises au point au cours de cette partie de l'étude, ont permis de mettre en place une cinétique d'apparition précise de ces événements (Figure 19) et de caractériser le plus précisément possible l'apoptose induite par l'ATRA avant que ne soit abordée une modulation de cet effet par d'autres molécules. La condensation et la fragmentation de la chromatine sont observées à la fois par la coloration MGG et par le Hoechst (J4), cette méthode étant spécifiquement adaptée pour l'observation de la fragmentation et de la perte de la chromatine. L'apparition de la condensation et de la fragmentation de la chromatine ainsi que la formation des

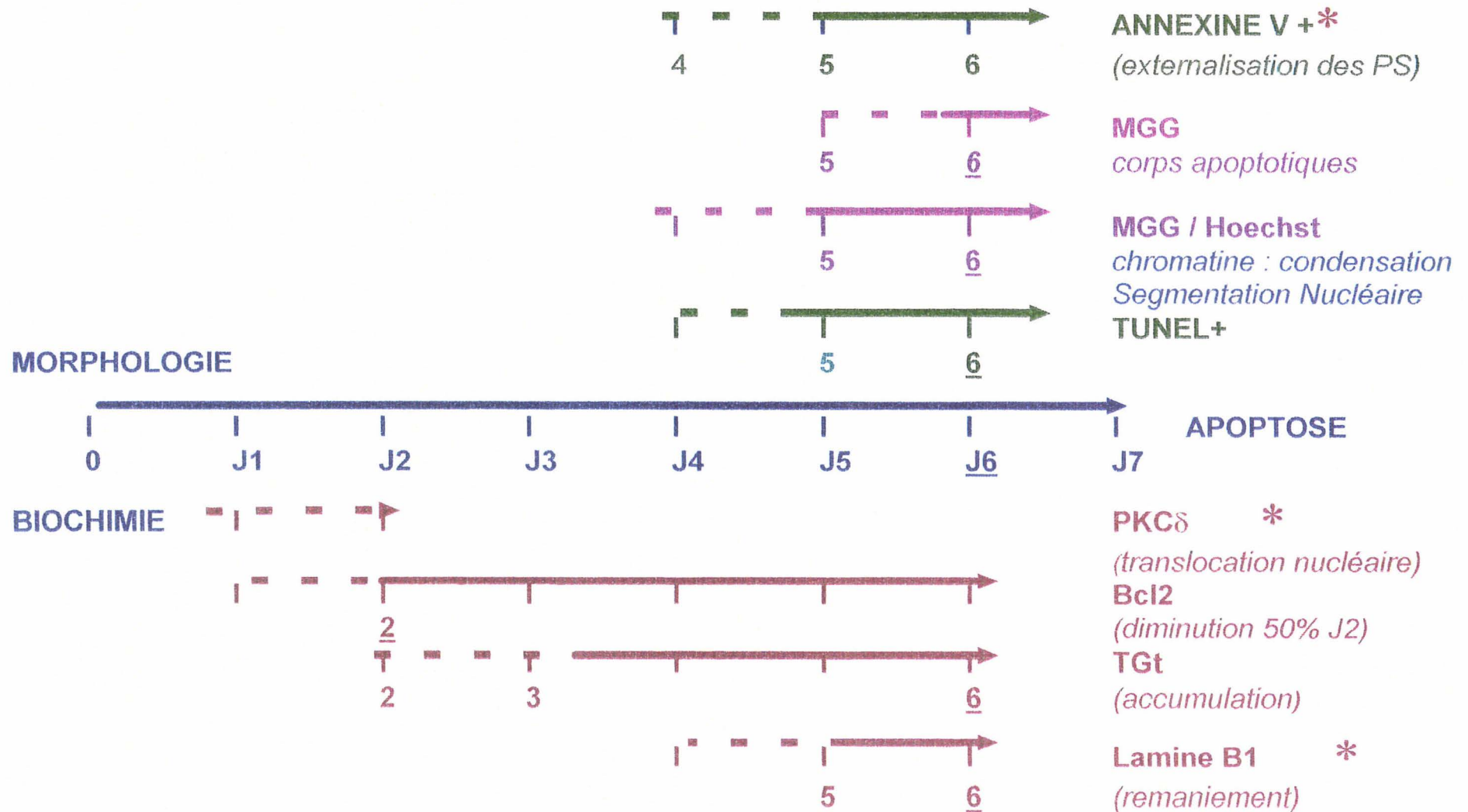


Figure 19 : Schéma récapitulatif des différents événements étudiés au cours de l'apoptose des cellules RPMI 8226 induites par l'ATRA.

* Activation par les caspases, ——— > 50 % de l'effet maximum, - - - < 50% de l'effet maximum

corps apoptotiques sont observées par le MGG (J6). La technique TUNEL détectant les cassures de l'ADN, présente l'avantage d'être une technique à la fois morphologique et moléculaire. Elle permet la détection précoce de l'apoptose dès le 4^{ème} jour. Les cassures apparaissent d'abord diffuses puis condensées, témoignant de la dégradation de la chromatine condensée et de la fragmentation nucléaire. Ceci est confirmé par une morphologie identique observée par la coloration de Hoechst et bien visible au 6^{ème} jour. Des travaux ont déjà démontré que le clivage de l'ADN se produit avant la condensation de la chromatine et la segmentation nucléaire dans d'autres modèles (Falcieri *et al*, 1994).

L'apparition de ces différents événements morphologiques a pu être mise en corrélation avec des modifications biochimiques :

a) Les phénomènes les plus précoces sont l'induction puis l'activation de la TGt (J2) la diminution d'expression de Bcl-2 (J2) et la translocation de la PKC δ au 3^{ème} jour

Dans les cellules myélomateuses humaines RPMI 8226, le niveau basal de l'expression de la TGt est négligeable et le traitement par l'ATRA induit une expression détectable au niveau de l'ARNm, après quelques heures, et au niveau de la protéine et de l'activité enzymatique après deux jours. Le contrôle de l'expression de l'ARNm par l'ATRA est bien documenté dans d'autres modèles humains et animaux (Aeschliemann et Paulsson, 1994), où il est transcriptionnel (Chiocca *et al*, 1988). Des données conflictuelles ont été rapportées à propos du type de récepteurs de l'ATRA impliqué dans ce contrôle (Zhang *et al*, 1995 ; Boehm *et al*, 1995). Tandis que l'élément de réponse aux rétinoïdes a été identifié à l'intérieur du promoteur du gène de la TGt de souris (Nagy *et al*, 1996), un tel élément de réponse n'a pas encore été identifié dans la séquence du promoteur humain (Lu *et al*, 1995). L'observation de l'accumulation de cet enzyme dans les corps apoptotiques est en accord avec les résultats de travaux suggérant que cet enzyme participe à leur formation (Fesus *et al*, 1987). La surexpression de la TGt dans les cellules de neuroblastome humain rend ces cellules fortement susceptibles à l'apoptose suggérant un effet direct de la TGt dans le processus de maturation menant à l'apoptose (Melino *et al*, 1994).

Bcl-2, associée à la suppression de l'apoptose, est surexprimée dans la lignée RPMI 8226. Une diminution de son expression apparaît précocément (au 2^{ème} jour) dans les cellules induites par l'ATRA. Des auteurs ont déjà montré qu'une suppression de Bcl-2 s'observait conjointement à l'induction de l'apoptose induite par l'ATRA dans d'autres modèles, par exemple dans les cellules HL-60 (Nagy *et al*, 1995). Aucune étude n'a montré pour l'instant une relation directe entre ces deux événements.

La relocalisation maximale de la PKC δ du cytoplasme au noyau s'observe progressivement et est maximum au 3^{ème} jour. Cette translocation se produirait après le clivage de l'enzyme

par une caspase (Kaufmann *et al*, 1996). Une translocation d'une PKC atypique a déjà été observée dans les cellules épithéliales traitées par l'ATRA (Knox *et al*, 1993) en rapport avec la diminution de l'expression de Bcl-2. De plus, une étude récente montre que la surexpression du fragment catalytique de 40kD (analogue à celui produit dans l'apoptose induite par TNF α) dans les cellules HeLa entraîne la fragmentation nucléaire et la fragmentation de la chromatine ainsi qu'un blocage en sub-G1 (Ghayur *et al*, 1997). b) Tous les autres critères apoptotiques s'observent à partir du 4^{ème} jour et sont maximums au 6^{ème} jour : l'apparition de cassures de l'ADN témoignant de l'activation d'une endonucléase (TUNEL), la translocation des PS du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique (mis en évidence par le marquage avec l'annexine V) est détectée de façon précoce également (à J4 et enfin, le remaniement des lamines qui est une étape nécessaire des modifications nucléaires (Rao *et al*, 1996).

Chapitre II

CARACTERISATION DES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS LES EFFETS DE L'AR

Les mécanismes par lesquels l'AR régule la prolifération cellulaire tumorale et l'induction de l'apoptose sont largement méconnus. Au delà de l'étude phénoménologique, il nous paraissait donc important de savoir par quels récepteurs passent ces réponses.

A. Caractérisation de l'équipement en récepteurs de l'AR dans les cellules RPMI 8226

En effet, l'AR présente une étonnante diversité de récepteurs. Cette diversité tient non seulement à l'existence des RAR α , β , γ et de leurs isoformes mais aussi à celle d'autres récepteurs appelés RXR comportant également des sous-types α , β et γ et leurs isoformes. Nous avons donc documenté l'expression des récepteurs de l'AR dans les cellules RPMI 8226 à l'aide de sondes cDNA spécifiques.

Des expériences de Northern Blot obtenus au laboratoire montrent que tous les récepteurs (RAR α , RAR β et RAR γ , RXR α et RXR β et RXR γ) y sont exprimés, à des taux plus ou moins variables (figure 20).

B. Caractérisation des récepteurs impliqués dans les réponses d'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose dans les cellules RPMI 8226

Pour mettre en évidence le rôle respectif des RARs et RXRs, nous avons eu recours à l'utilisation de rétinoïdes de synthèse fournis par le CIRD-Galderma : d'une part des rétinoïdes spécifiques d'une classe de récepteurs, comme le CD367 pour les RARs et le CD2425 pour les RXRs ou spécifiques d'un sous-type de récepteurs, entre autres, le CD437 pour le RAR γ (Figure 11 de la revue générale, p. 63).

RAR α



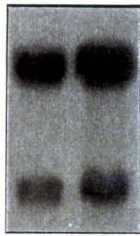
3.6 kb

RXR α



5.4 kb

RAR β



3.5 kb

RXR β



3.3 kb

RAR γ



3.1 kb

RXR γ



4.5 kb

actin 2.2 kb

C RA

C RA

Figure 20 : Mise en évidence par Northern blot des transcrits RAR α,β et γ et RXR α,β et γ dans les cellules RPMI 8226.

1) Inhibition de la prolifération

Dans un premier temps, l'effet sur la prolifération cellulaire des deux rétinoïdes de synthèse, CD367 et CD2425, a été étudié. La Figure 21 montre les courbes d'évolution du nombre de cellules en fonction de la durée de différents traitements. Le CD367 et le CD2425, utilisés seuls, n'inhibent pas la prolifération. Par contre, l'association CD367+CD2425 (utilisés à 1 et 0,1 μM respectivement) provoque un ralentissement de la croissance cellulaire, comparable à celui obtenu avec l'ATRA (1 μM) utilisé seul.

Ces résultats sont confirmés par la mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée (Figure 22). Les cellules traitées par les rétinoïdes de synthèse utilisés seuls se comportent comme les cellules témoins. Par contre, on observe une diminution de cette incorporation sous l'effet de leur association, comparable à celle obtenue avec l'ATRA.

Nous avons vérifié l'absence de toxicité du CD367 à 10^{-7}M . Par contre à 10^{-6}M , un léger effet toxique commence à se manifester (taux de nécrose x 4 au 5^{ème}-6^{ème} jour).

2) Induction de l'apoptose

Le CD367 et le CD2425, seuls, n'induisent pas l'apoptose et les cellules présentent la même morphologie que les cellules contrôles. Leur association équimoléculaire entraîne l'apparition de cellules au phénotype apoptotique classique, démontrée aussi bien par la coloration MGG, Hoechst 33258 et la méthode TUNEL et observées par cette dernière (Figure 25) : les cellules traitées par cette association présentent bien une condensation et une fragmentation nucléaire (photo E).

Sur le plan quantitatif, le pourcentage de cellules apoptotiques, obtenues par cette même association et caractérisé par les trois techniques morphologiques classiques (MGG, Hoechst, TUNEL) est comparable à celui des cellules traitées par l'ATRA (Figure 23). Notons que ce pourcentage diminue lorsqu'on utilise un excès de l'un ou de l'autre de ces rétinoïdes synthétiques.

Outre l'aspect morphologique, d'autres critères de l'apoptose ont été caractérisés (Tableau I et Figure 24) et montrent que l'association des deux rétinoïdes, CD367 et CD2425, provoque une apoptose tout à fait similaire à celle obtenue par l'ATRA.

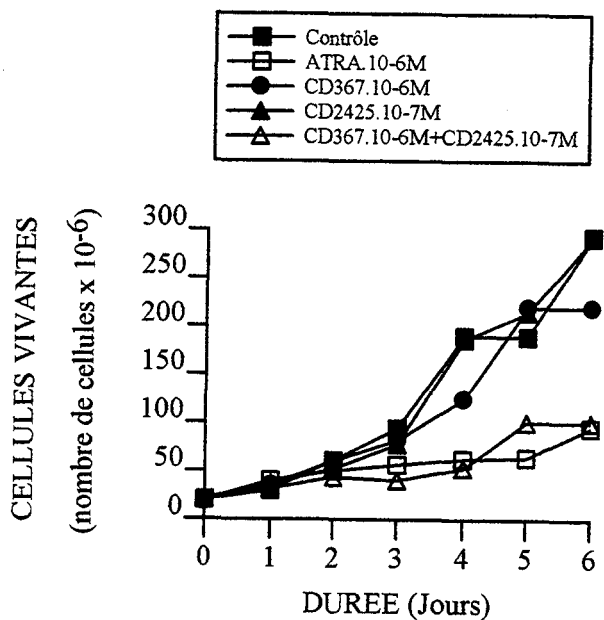


Figure 21 : Croissance d'une population de cellules RPMI 8226 cultivées en présence ou non d'ATRA, de CD367 (spécifique des RARs) et/ou de CD2425 (spécifique des RXRs). La déviation standard n'excède pas 15% des valeurs.

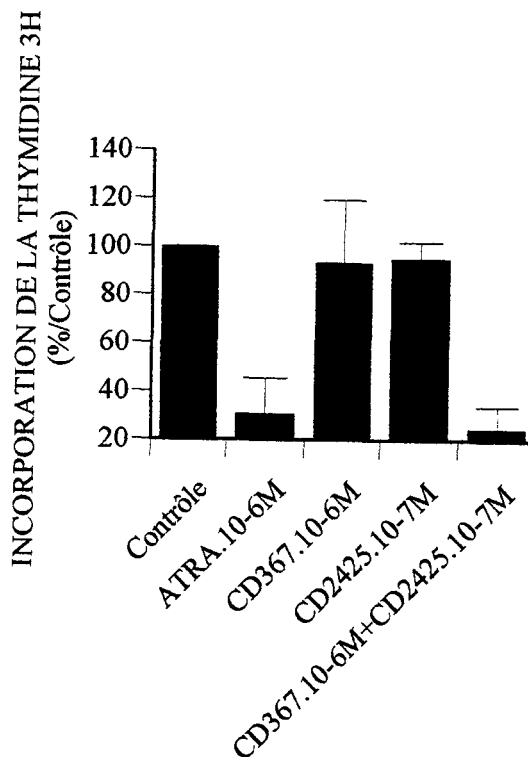


Figure 22 : Prolifération des cellules RPMI 8226 testée par incorporation de thymidine tritiée, pendant 3h, après 48h de traitement par les agents indiqués.

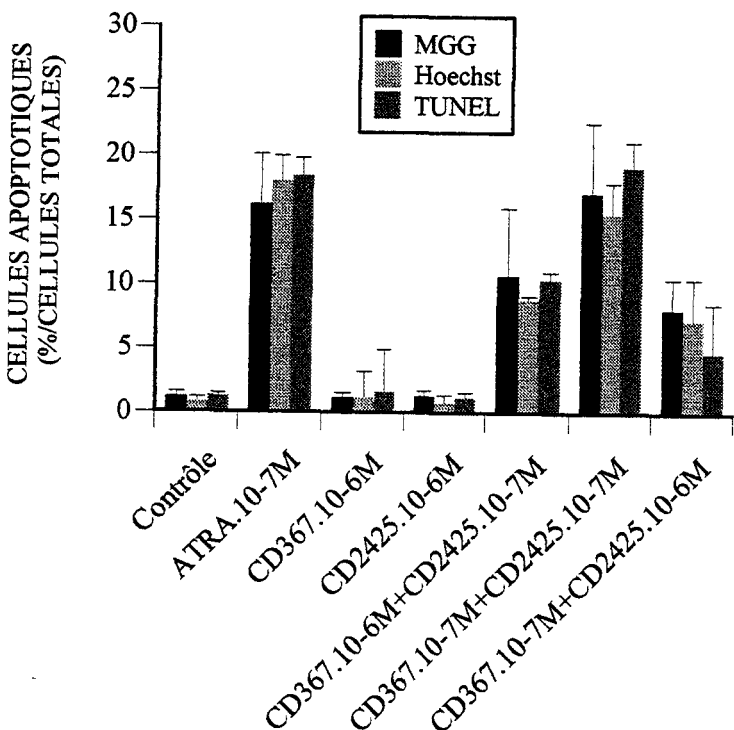


Figure 23 : Quantification des effets de l'ATRA, du CD367, du CD2425 sur l'apoptose des cellules RPMI 8226 appréciée par coloration au MGG, Hoechst et TUNEL, après 6 jours de traitement.

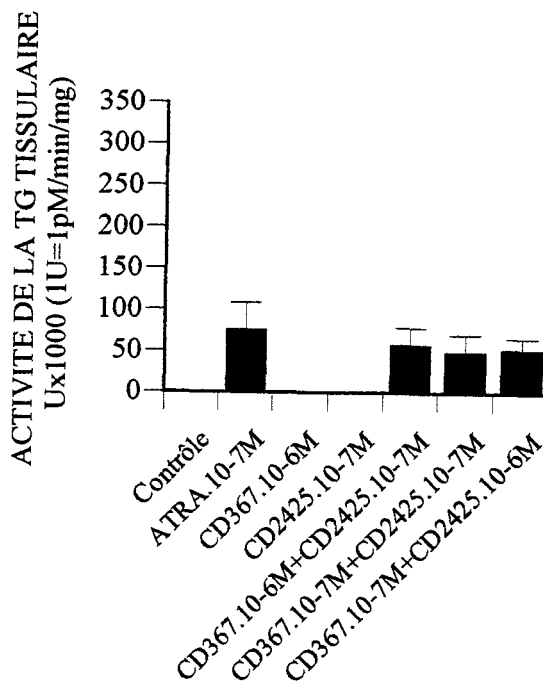


Figure 24 : Mesure de l'activité enzymatique de la TGt après 48h de traitement par les agents indiqués.

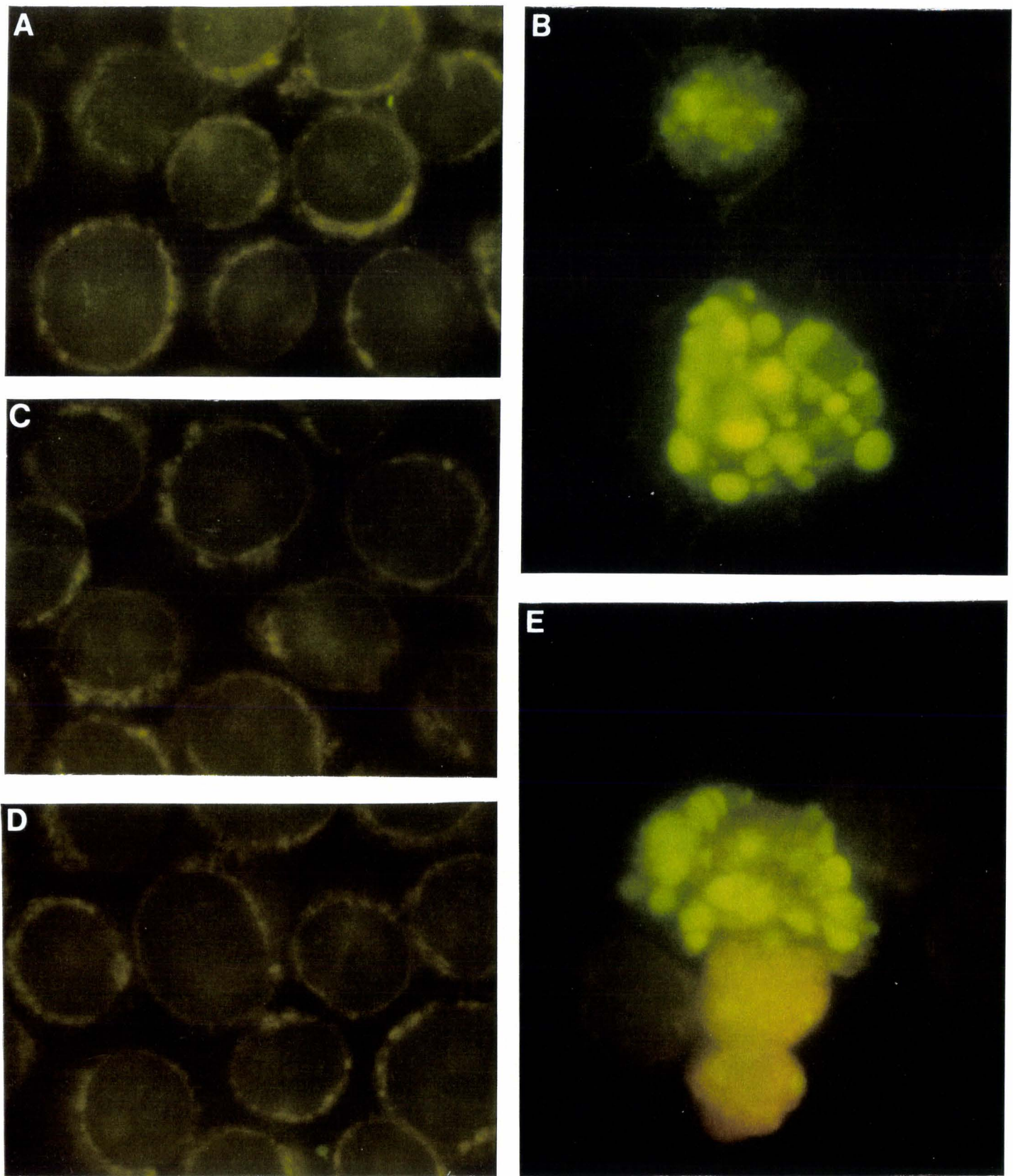


Figure 25 : Morphologie des cellules RPMI 8226, marquées par la méthode TUNEL, après 6 jours de traitement par l'ATRA ou le CD367 et/ou le CD2425 (grossissement x 1000).

	A	B	C	D	E
ATRA (1 μ M)	-	+	-	-	-
CD367 (1 μ M)	-	-	+	-	+
CD2425 (1 μ M)	-	-	-	+	+

Tableau I : Apoptose induite par l'ATRA et des rétinoïdes de synthèse RAR et RXR spécifiques (CD367 et CD2425). N : normal, R : remaniement.

	MORPHOTYPE			MARQUEURS			
	MGG	Hoechst	TUNEL	TGt	Lamine B (IFI)	Annexine V	Bcl-2
Contrôle	-	-	-	-	N	-	+
CD 367 (0,1 µM)	-	-	-	-	N	-	±
CD 2425 (0,1 µM)	-	-	-	-	N	-	±
ATRA (0,1µM)	apoptose typique			+	R	+	-
CD 367 + CD 2425 (tous deux à 0,1 µM)	apoptose typique			+	R	+	-

3) Conclusion

Ainsi, ces résultats montrent qu'aucun des rétinoïdes de synthèse sélectifs des RARs ou RXRs, utilisés seul, n'est capable de reproduire les effets de l'ATRA et que les deux voies RAR et RXR sont impliquées dans l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose. Cela est vrai pour tous les marqueurs testés (la TGt, l'aspect de la lamie B, l'annexine V et Bcl-2).

D'autres études, utilisant le même type d'approche, ont été menées dans des modèles différents. Par exemple, dans les cellules HL-60, l'apoptose semble être attribuée à l'activation des RXRs. Dans les cellules de neuroblastome, c'est l'activation de RAR β qui permet l'induction de l'apoptose, dans le carcinome embryonnaire, c'est RAR α (voir chapitre IIC4 revue générale p. 66). Ainsi, le (ou les) type(s) de récepteurs de l'AR impliqué(s) dans la médiation de la réponse apoptotique diffère(nt) d'un type cellulaire tumoral à l'autre.

C) Etude de la modulation des effets de l'AR par un excès de rétinoïdes spécifiques des RARs ou RXRs

L'ATRA permet l'activation des RARs, mais il peut aussi être métabolisé en 9-cis RA, capable d'activer à la fois les RARs et les RXRs. Après avoir démontré que ces deux classes de récepteurs RARs et RXRs étaient nécessaires pour les effets antiprolifératif et inducteur de l'apoptose de l'ATRA, nous avons voulu savoir s'il fallait respecter un certain équilibre dans l'activation de ces deux voies pour l'obtention de ces réponses. Pour cela, nous avons donc testé des associations utilisant l'ATRA + un excès de ligand RARs (CD367) et/ou un excès de ligand RXRs (CD2425).

1) Effets d'un excès de ligand RAR par étude des effets de l'association AR/CD367 (RAR spécifique)

a) Inhibition de la prolifération

Le CD367, rétinoïde sélectif des RARs, utilisé seul, n'inhibe pas la prolifération mais inhibe légèrement la réponse antiproliférative de l'ATRA (Figures 26, Figure 27). Au bout de 48h, l'incorporation de la thymidine tritiée des cellules traitées par l'association ATRA (0,1 μ M) / CD367 (1 μ M) est légèrement plus élevée que celles des cellules traitées par l'ATRA seul.

b) Induction de l'apoptose

Le CD367 seul n'induit pas l'apoptose mais il inhibe partiellement l'apoptose induite par l'ATRA (Figure 29A). De plus, de façon surprenante, il en modifie le programme (Figures 30 et 31) : la différence se situe au niveau cytoplasmique. La morphologie, observée par la coloration MGG et de Hoechst et la méthode TUNEL montre une condensation et une fragmentation ainsi qu'une perte de chromatine. Par contre, il n'y a ni fragmentation cytoplasmique, ni formation de corps apoptotiques.

L'aspect en microscopie électronique des cellules traitées par l'association ATRA+CD367 (Figure 32) montre qu'à un stade avancé de l'apoptose, les cellules présentent bien une condensation et une fragmentation de l'hétérochromatine. Mais contrairement aux cellules apoptotiques obtenues après traitement par l'ATRA seul, plusieurs fragments apparaissent fréquemment rassemblés dans une même structure entourée de l'enveloppe nucléaire.

L'absence de formation de corps apoptotiques est peut-être en relation avec l'induction plus faible de la TGt par l'association ATRA-CD367. Cette induction réduite par rapport aux cellules traitées avec l'ATRA seul est observée tant au niveau de l'activité de la TGt (Figure 28) au 2^{ème} jour qu'à celui de son expression détectée par IFI au 6^{ème} jour (Figure 31).

Par ailleurs, la majorité des cellules apoptotiques obtenues après traitement par l'ATRA et le CD367 sont de grande taille. Ceci laisse penser qu'elles seraient peut-être bloquées en phase G2 du cycle cellulaire. Il ne s'agit là que d'une hypothèse qui demande à être vérifiée.

Le tableau II rassemble les différents critères apoptotiques caractérisés, la Figure 33 montre que les lamines subissent un remaniement similaire à celui observé dans l'apoptose typique induite par l'ATRA seul.

Ces formes d'apoptose particulière ont été également obtenues par l'excès de CD367 dans l'association CD367/CD2425 (1 μ M et 0,1 μ M respectivement). Elles représentent alors pratiquement 100% du total d'apoptose alors qu'il représente $6,4 \pm 1$ % de l'apoptose de cellules induites par l'ATRA. A ces concentrations, on obtient également une diminution de l'induction de la TGt.

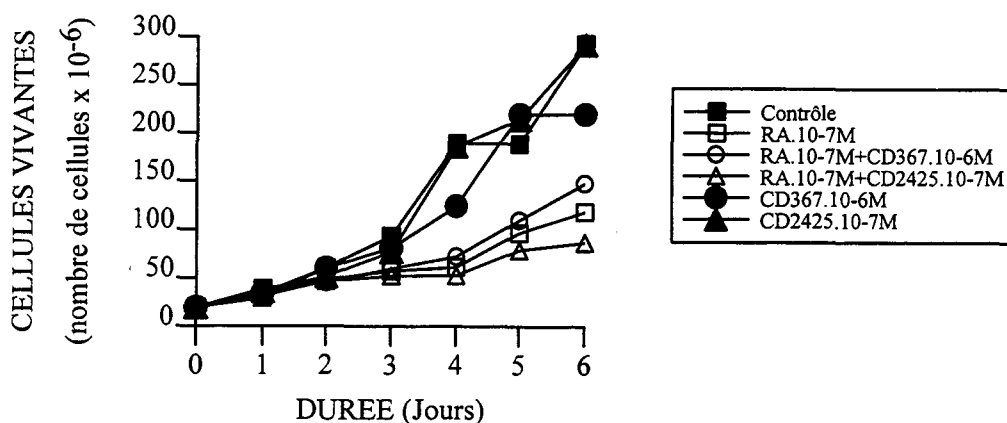


Figure 26 : Croissance d'une population de cellules RPMI 8226 cultivées en présence d'ATRA et/ou CD367 et/ou CD 2425. Les cellules excluant le bleu trypan sont comptées chaque jour. La déviation standart ne dépasse pas 17% de la valeur.

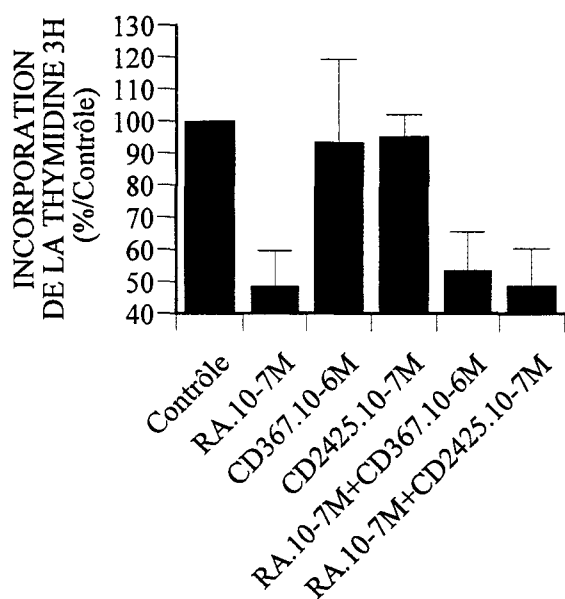


Figure 27 : Prolifération des cellules RPMI 8226 étudiée par incorporation de thymidine tritiée pendant 3h, après 48h de traitement par les agents indiqués.

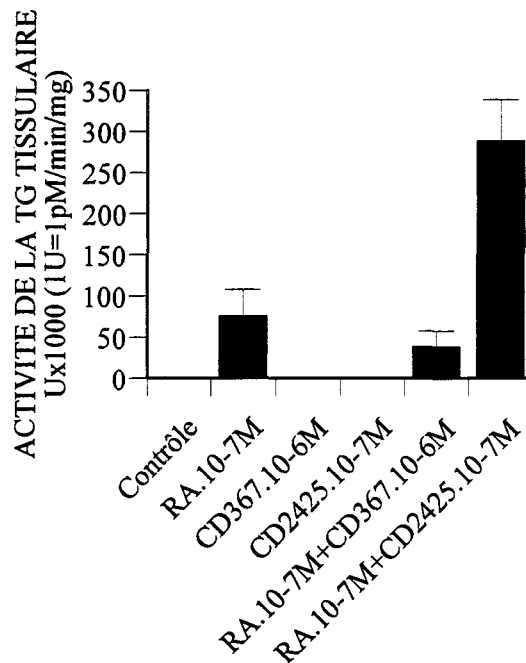


Figure 28 : Mesure de l'activité enzymatique de la TGt après 48h de traitement par les agents indiqués (utilisés seuls ou en association).

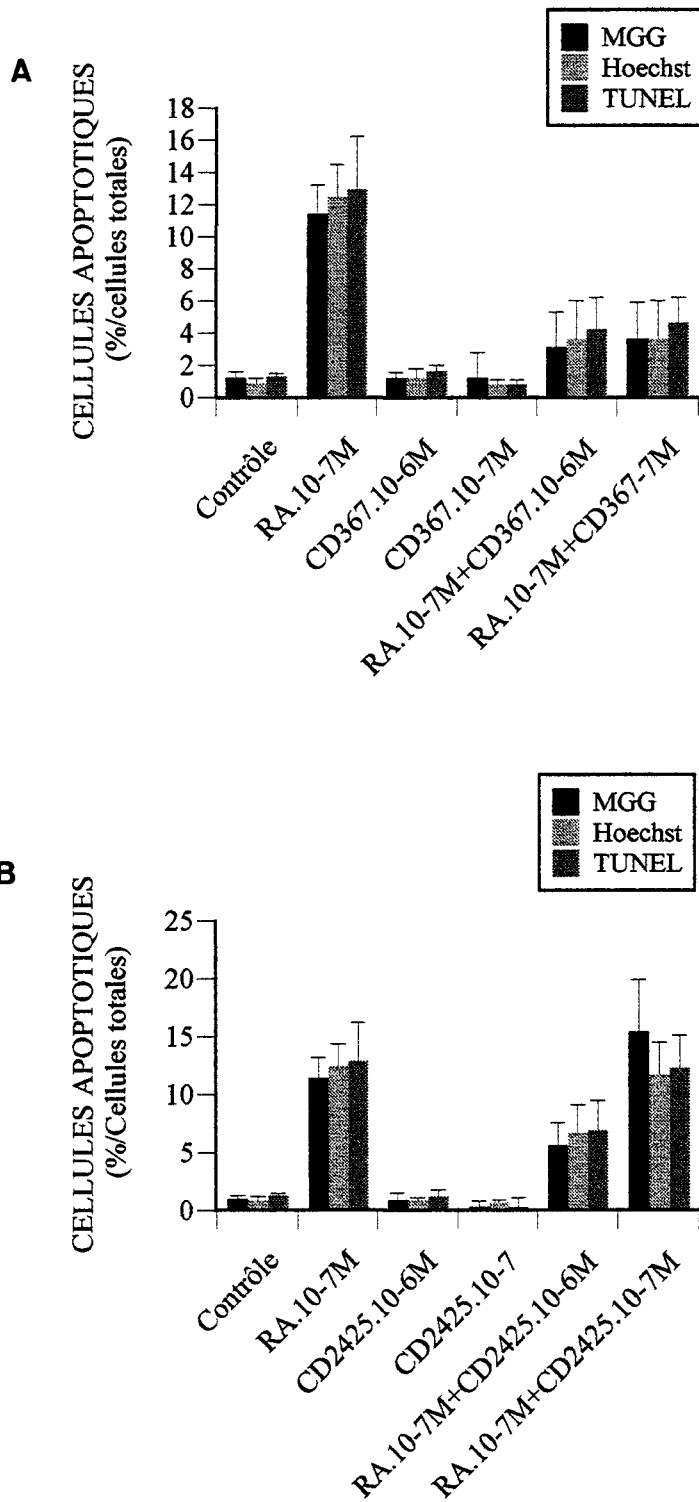


Figure 29 : Quantification des effets de l'ATRA et/ou de rétinoïdes de synthèse sur l'apoptose des cellules appréciée par coloration au MGG, Hoechst, TUNEL, après 6 jours de traitement.

A) ATRA et/ou CD367 (spécifique des RARs)

B) ATRA et/ou CD2425 (spécifique des RXRs)

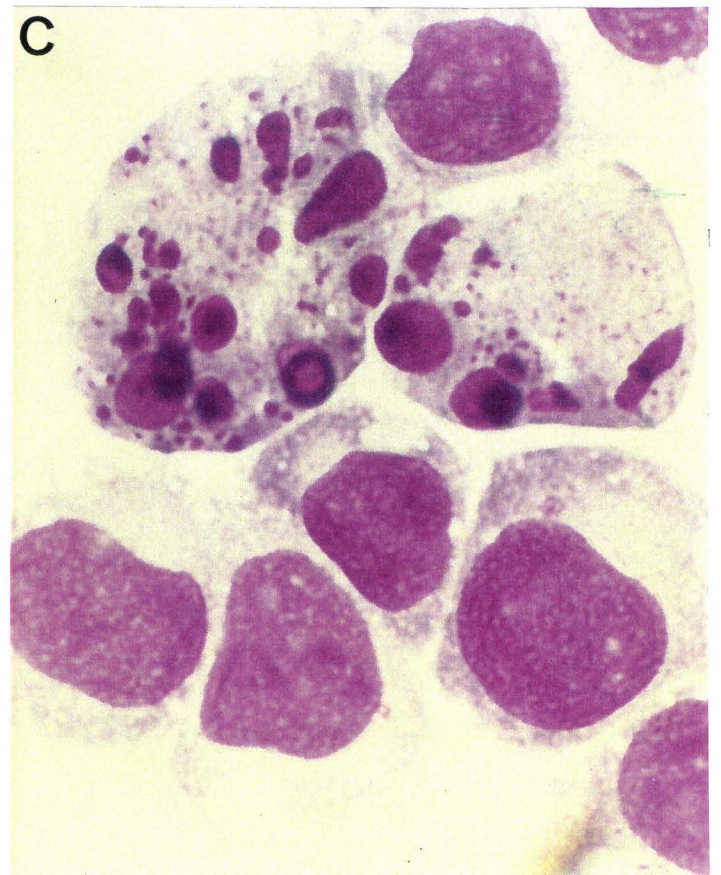
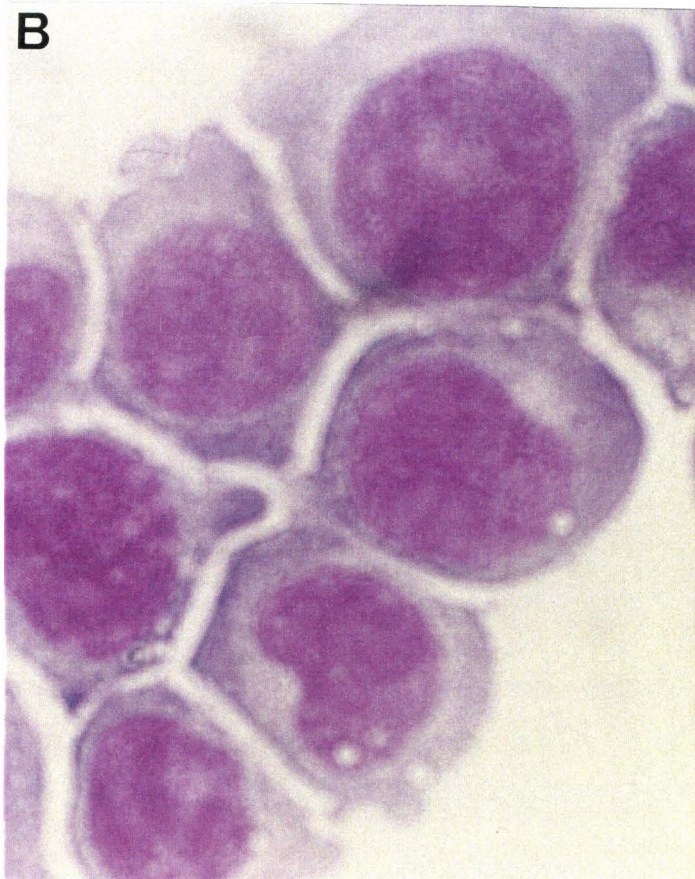
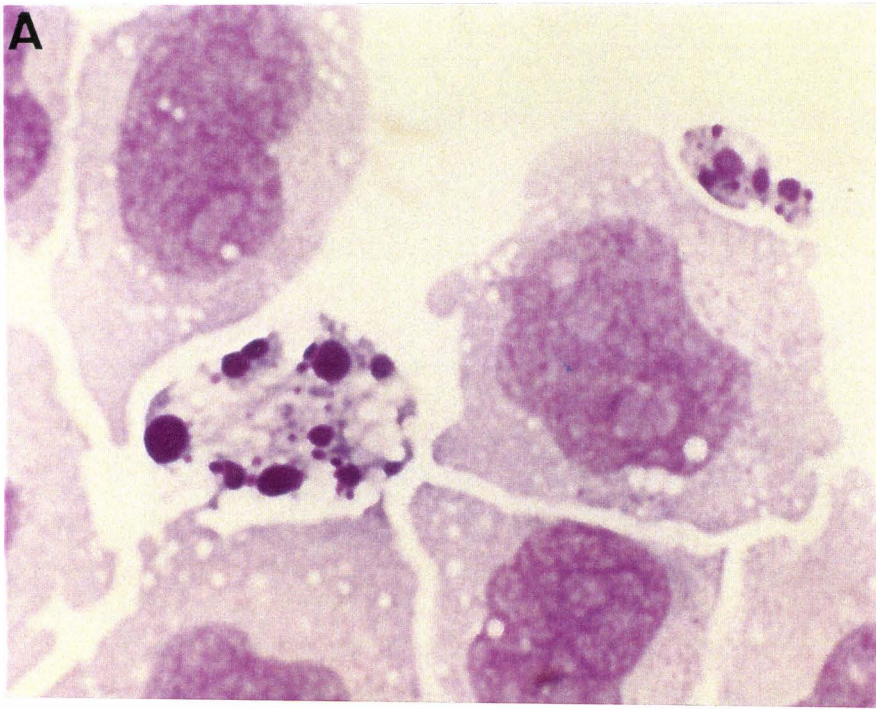


Figure 30 : Morphologie des cellules RPMI 8226 appréciée par la coloration MGG, après traitement par différents rétinoïdes utilisés seuls ou associés (grossissement X 1000).

	A	B	C
ATRA (0,1 μ M)	+	-	+
CD367 (1 μ M)	-	+	+

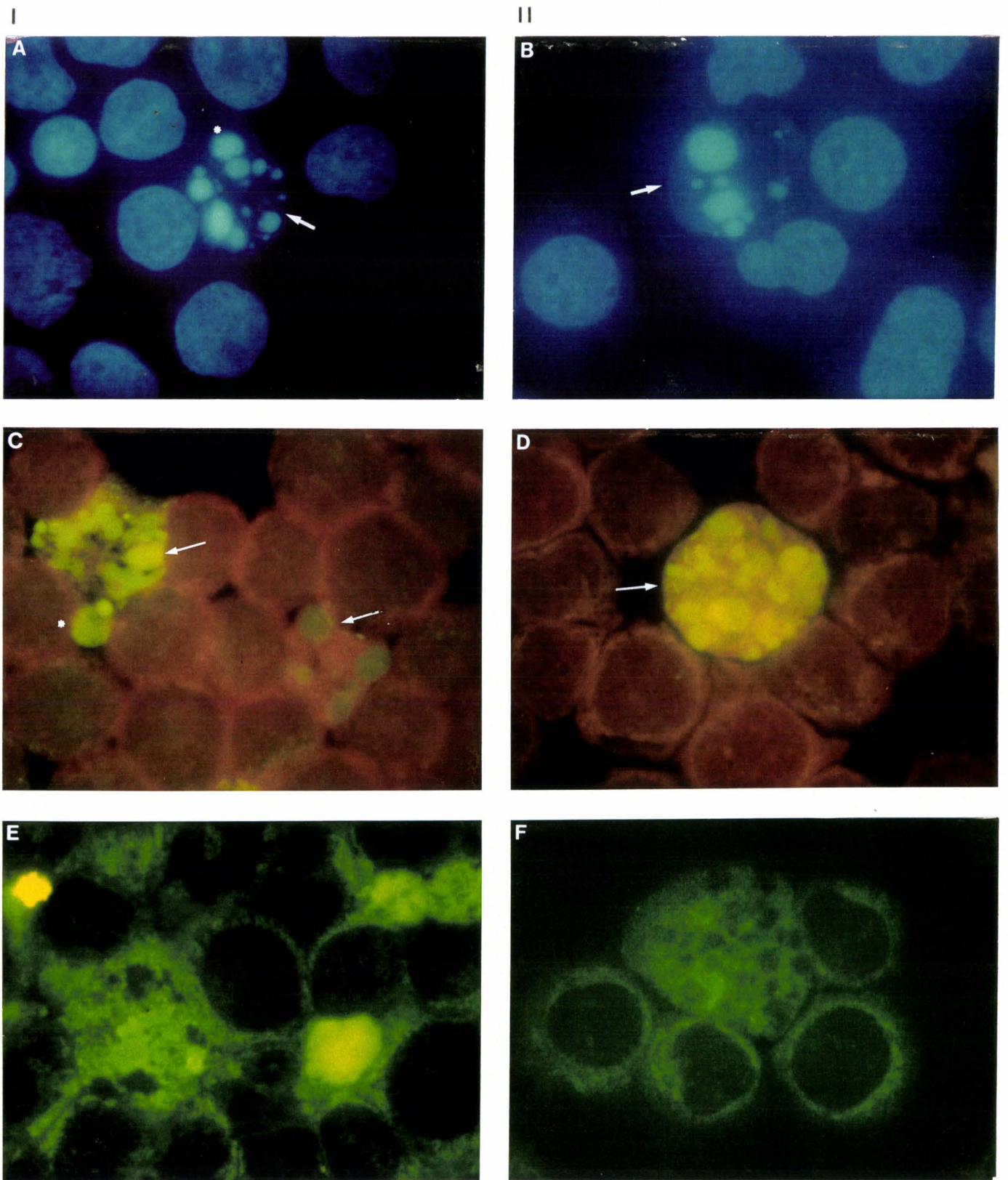


Figure 31 : Caractérisation de l'apoptose induite par l'ATRA (1 μ M, I) ou l'association (II) ATRA (0,1 μ M) + CD367 (1 μ M) dans les cellules RPMI 8226 après 6 jours de traitement.
(grossissement x 1000)

A et B : Coloration de Hoechst

C et D : Détection des cassures de l'ADN par la technique TUNEL

D et E : Détection de la TGt par IFI

→ : cellule apoptotique, * : corps apoptotique

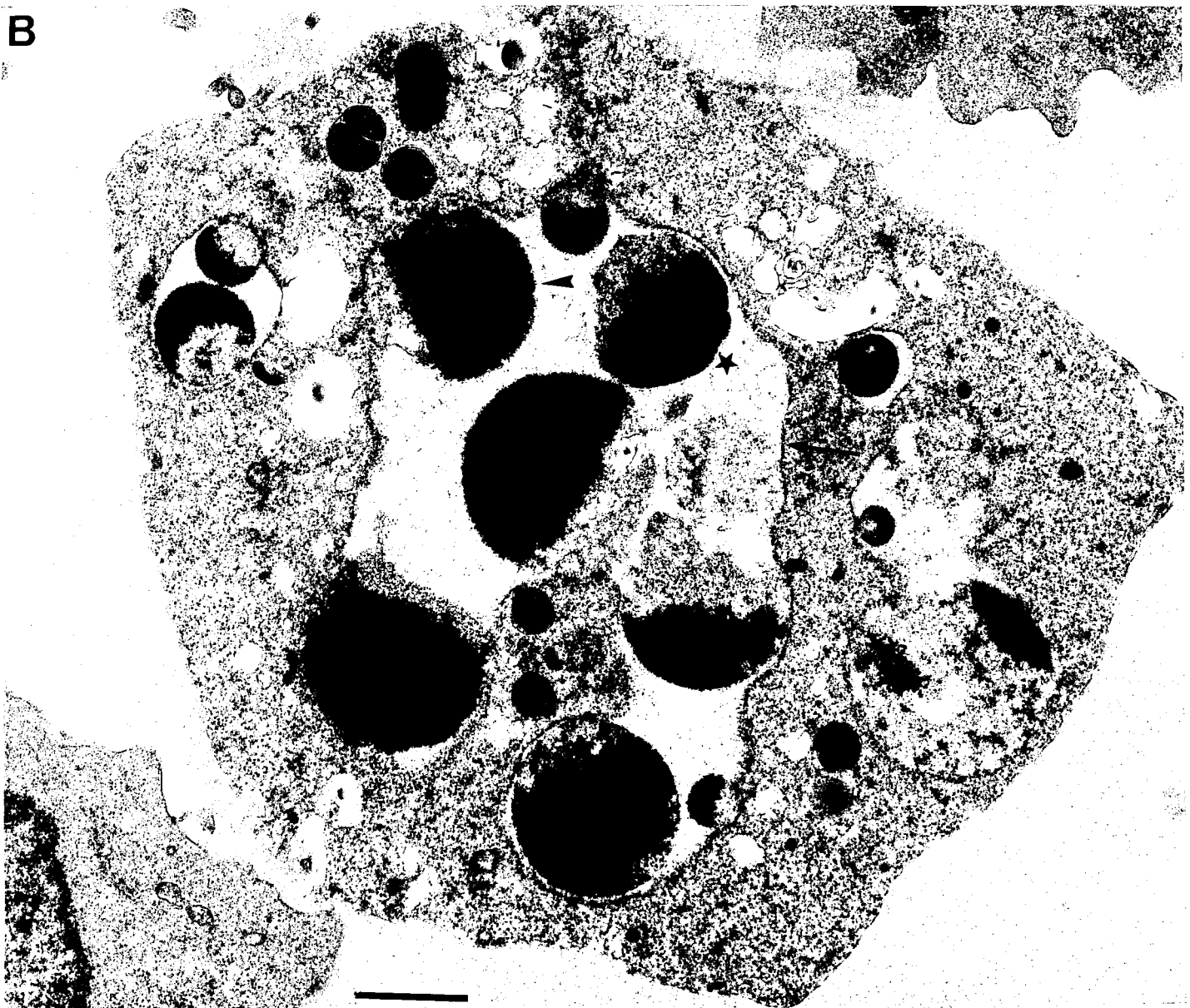
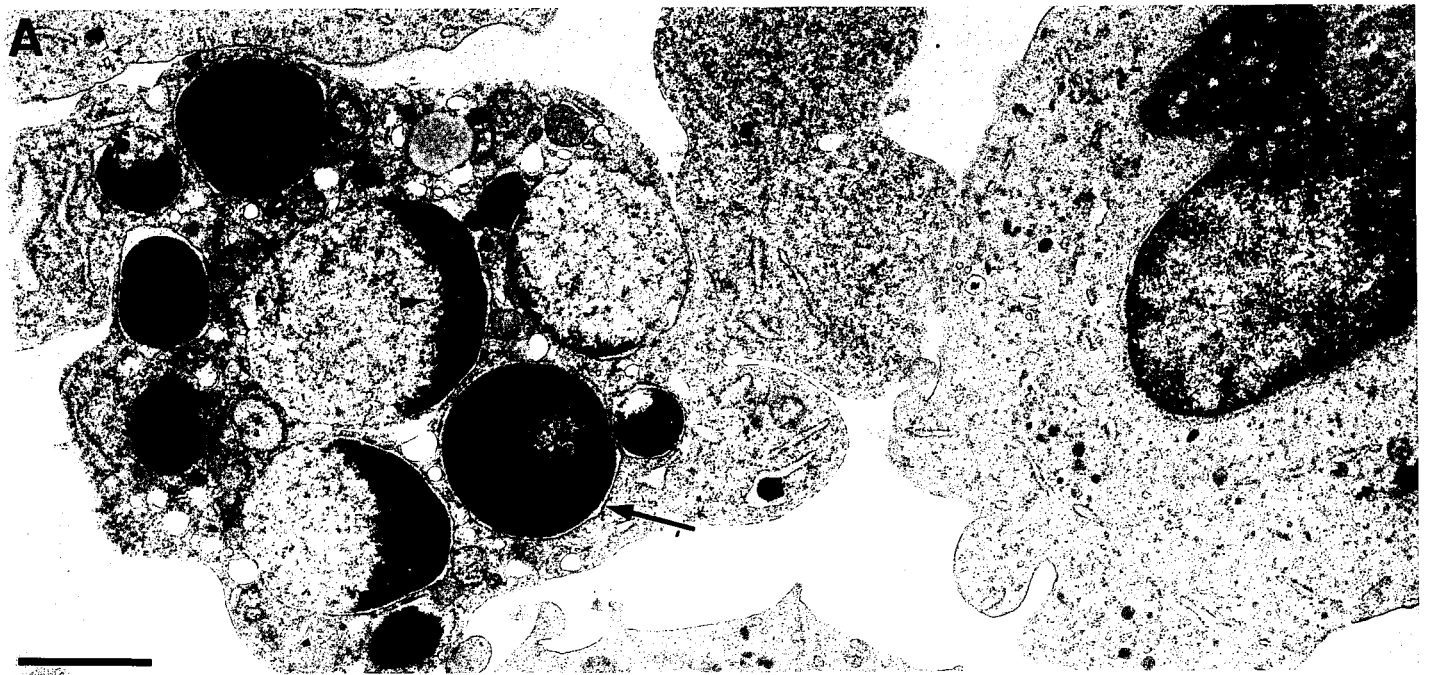


Figure 32: Morphologie des cellules RPMI 8226 après six jours de traitement par l'ATRA (A, 1 μ M) ou l'association (B) ATRA (1 μ M) + CD367 (1 μ M), observée en microscopie électronique (la barre = 1 μ m).

→ : enveloppe nucléaire, ► : hétérochromatine, ★ : fragment nucléaire.

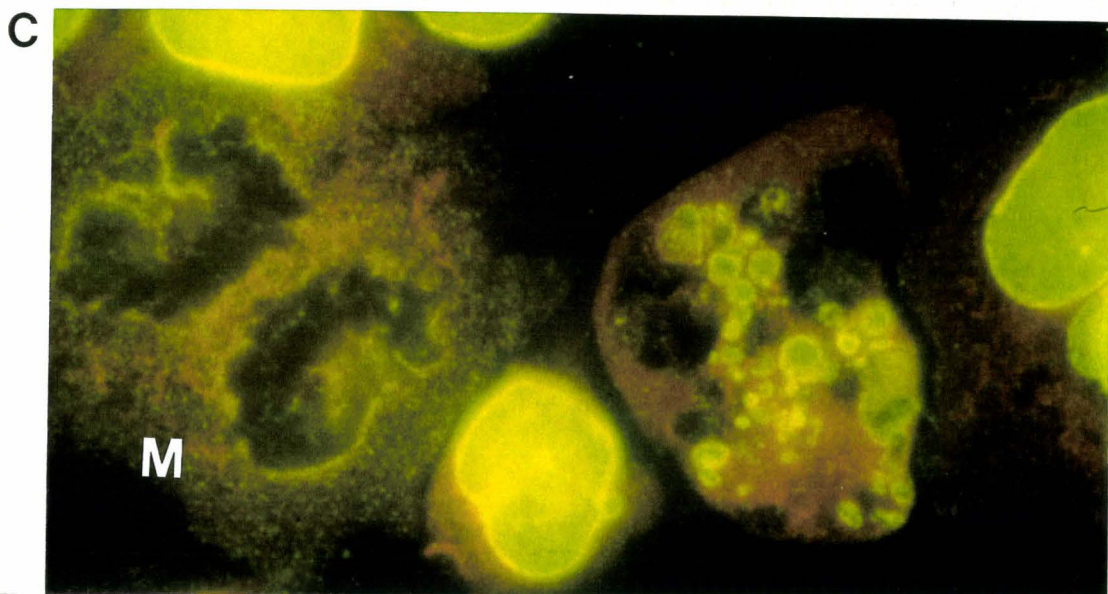
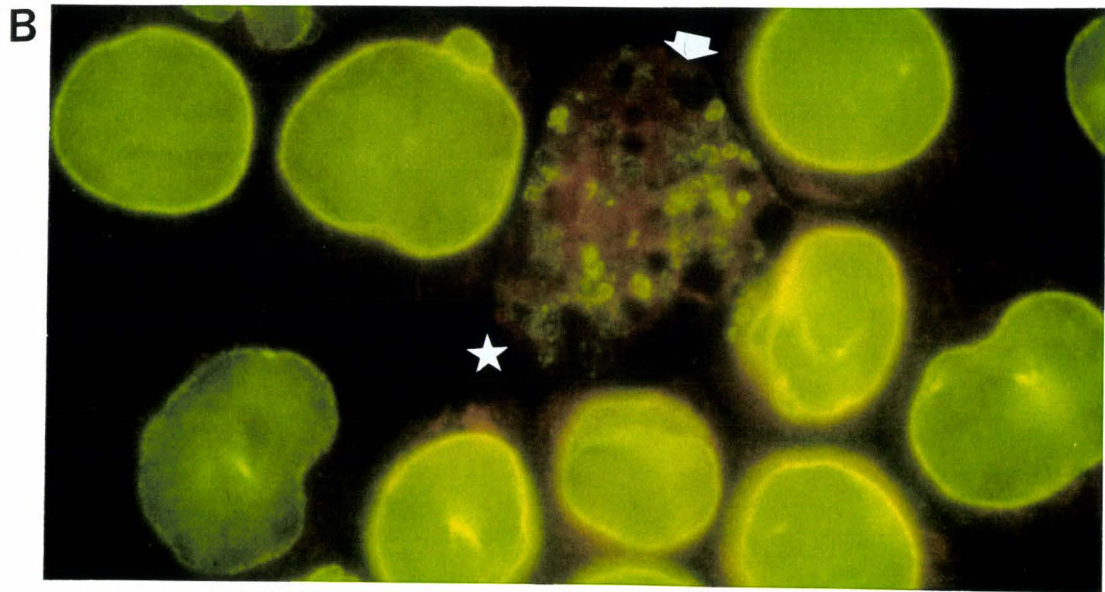
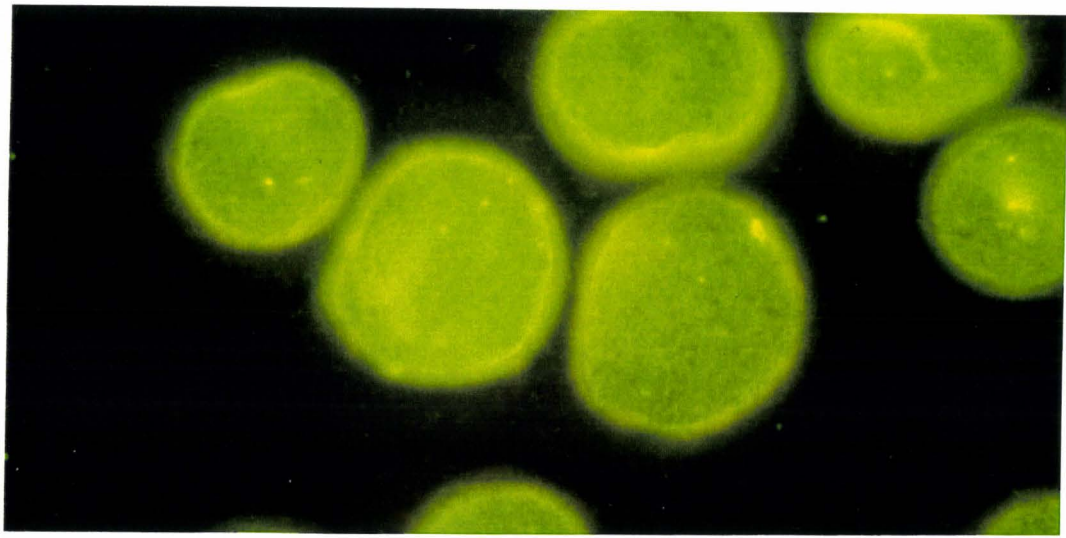


Figure 33 : Mise en évidence de la lamine B détectée par IFI, dans les cellules RPMI 8226, après 6 jours de traitement par les rétinoïdes, utilisés seuls ou en association. (grossissement x 1000)

	A	B	C
ATRA (0,1 μ M)	-	+	+
CD367 (1 μ M)	-	-	+

▲ cellule apoptotique, ★ corps apoptotique, **M** cellule mitotique.

Tableau II: Apoptose induite par l'ATRA et par des associations de rétinoïdes avec un excès de ligand RAR (CD367). N : normal, R : remaniement, C : cytoplasmique, T : translocation au noyau, ND : non déterminé.

	MORPHOTYPE			MARQUEURS				
	MGG	Hoechst	TUNEL	Lamine B (IFI)	TGt	Annexine V	PKCd	Bcl-2
Contrôle	-	-	-	N	-	-	C	+
ATRA	TYPIQUE			R	+	+	T	-
ATRA + CD367	GRANDES CELLULES avec apoptose uniquement NUCLEAIRE			R	-	+	ND	-
Excès de CD367 + CD2425	GRANDES CELLULES avec apoptose uniquement NUCLEAIRE			R	-	+	ND	-

c) Conclusion

Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment, l'apoptose fait intervenir les deux voies RAR/RXR. Si on déplace la balance vers la voie des RARs, par l'utilisation du CD367, on observe une inhibition quantitative de l'apoptose induite par l'ATRA. Au niveau qualitatif, le morphotype apoptotique est particulier : on observe une dissociation des programmes cytoplasmiques et nucléaires avec l'absence de fragmentation cellulaire et l'absence de formation de corps apoptotiques tandis que la condensation de la chromatine est maintenue. Cette forme particulière ressemble aux formes apoptotiques de la phase précoce, avant celle où l'on voit se former les corps apoptotiques. Ce serait peut-être une forme incomplète, sans formation de corps apoptotiques, même en phase tardive ou une forme avec ralentissement considérable de la cinétique de réalisation du programme apoptotique complet. L'absence d'induction de la TGt peut expliquer une partie de ce phénomène

2) Effets d'un excès de ligand RXR par étude des effets de l'association AR/CD2425 (sélectif des RXRs)

a) Inhibition de la prolifération

Le CD2425, rétinoïde sélectif des RXRs, n'a aucun effet lorsqu'il est utilisé seul. Associé à l'ATRA, il renforce légèrement l'effet antiprolifératif de l'ATRA (Figure 26 p.). Cet effet n'est bien net qu'après 5 jours de culture. L'incorporation de la thymidine tritiée des cellules traitées

pendant 48h par l'association ATRA (0,1 μ M) / CD2425 (0,1 μ M) est équivalente à celle des cellules traitées par l'ATRA seul (Figure 27).

b) Induction de l'apoptose

Tandis que le CD2425, utilisé seul ne présente aucun effet sur l'apoptose, l'association ATRA (0,1 μ M) / CD2425 (1 μ M) entraîne une diminution du pourcentage d'apoptose induite par l'ATRA (Figure 29B). Mais contrairement à l'association ATRA/CD367, la morphologie apoptotique est typique : on observe une condensation et une fragmentation nucléaire et cytoplasmique (Figure 34, photo A et B). Nous observons l'apparition de formes analogues par l'association d'un excès de CD2425 (1 μ M) + CD367 (0,1 μ M).

Par ailleurs, le traitement entraîne l'apparition d'une proportion non négligeable de cellules dont le noyau apparaît très morcelé. Il ne s'agit pas d'apoptose car elles ne sont marquées ni par le TUNEL ni par l'annexine V. Ces formes représentent 12% du total des cellules alors qu'elles représentent moins de 1 % dans les cellules contrôles ou traitées par l'ATRA. On peut séparer ces cellules (Figure 34, photo C) des cellules en phase apoptotique précoce, présentant un début de fragmentation nucléaire (TUNEL +/-) mais qui sont annexine V + (photo D). Ces cellules récupérées dans la fraction annexine V négative lors de l'isolement des cellules apoptotiques, ne présentent pas de protéolyse des lamines (Figure 35). Cependant, elles montrent un remaniement des lamines particulier, ne ressemblant ni à celui observé au cours de l'apoptose, ni à celui observé au cours de la mitose : le réseau des lamines tapisse l'enveloppe nucléaire qui est ainsi mise en évidence et qui apparaît très déformé (apparence très polylobée, photo B). Mais nous n'avons pas poursuivi l'étude ²biochimique en raison de l'impossibilité à séparer les cellules au noyau polylobé des cellules intactes. Seule une double coloration lamine / TUNEL observée au microscope confocal permettrait de caractériser ces cellules et de les distinguer des cellules en phase précoce de l'apoptose. Il est à noter qu'un phénotype analogue a été observé par Rao *et al* (1996) dans des cellules présentant une mutation dans le site de protéolyse des lamines par les caspases. Ces auteurs observent une fragmentation précoce du noyau en absence de protéolyse des lamines ce qui retarde considérablement la formation des corps apoptotiques. Dans notre cas, s'agit-il d'un découplage entre plusieurs processus induits par les rétinoïdes ? Ne peut-on envisager par exemple qu'un taux de TGt, activée dans la phase précoce de l'apoptose empêche le transport de caspases au noyau ? Ce qui entraînerait un défaut de protéolyse des lamines ?

Nous observons en effet que l'association ATRA (0,1 μ M) / CD2425 (0,1 μ M) induit de façon synergique l'activité de la TGt (Figure 28).

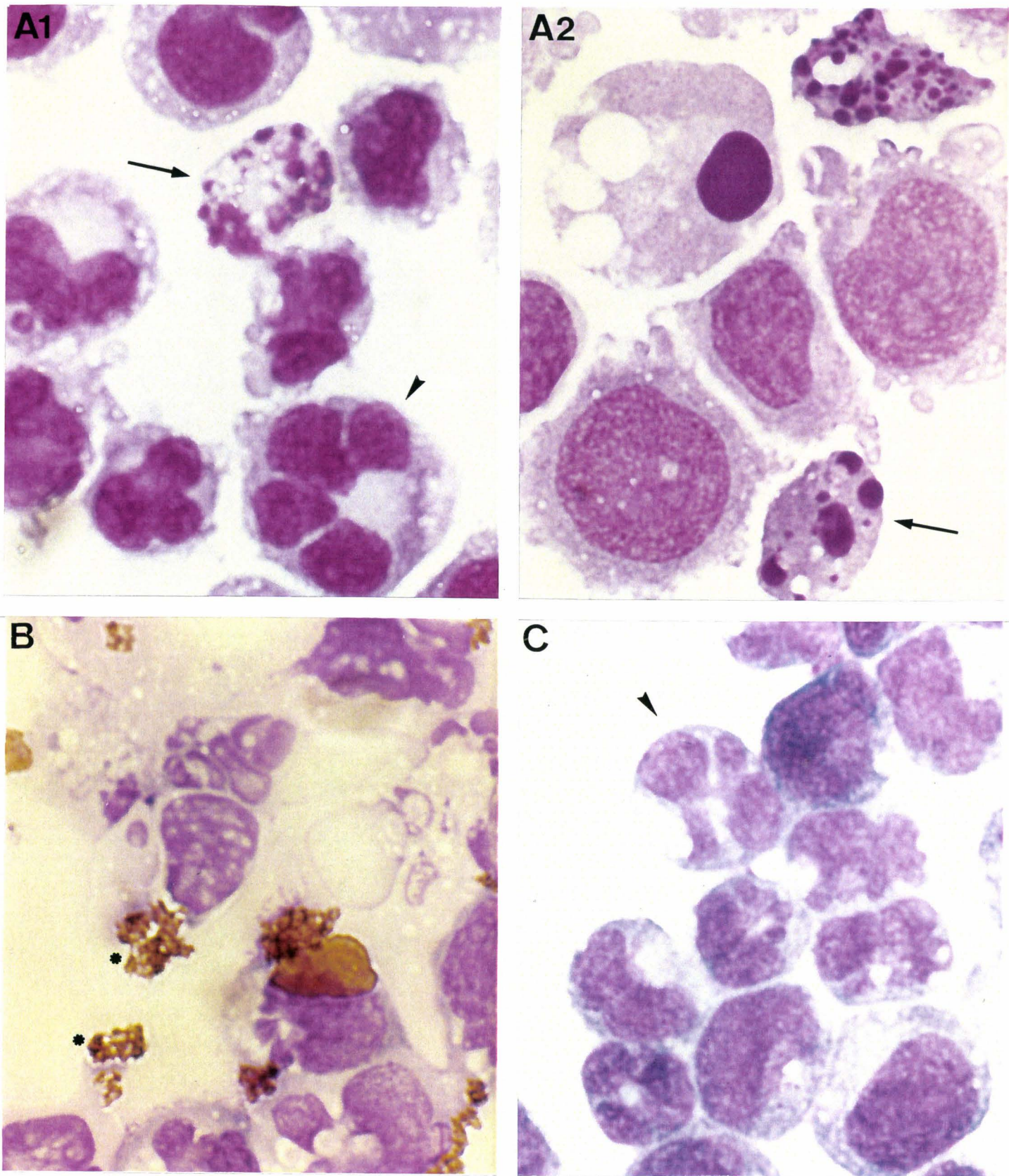


Figure 34 : Morphologie des cellules RPMI 8226, appréciée après coloration par le MGG, après 6 jours de traitement par l'association ATRA (0,1 μ M)+CD2425 (1 : 1 μ M, 2 : 0,1 μ M)

Les cellules sont sélectionnées par des billes magnétiques couplées à la streptavidine et marquage des cellules par l'annexine V biotinylée.

A) Cellules issues de la population totale avant sélection

B) Cellules annexine V+ après sélection

C) Cellules annexine V- après sélection

→ cellule apoptotique, ▶ cellule Annexine V- (noyau morcelé),

* bille magnétique

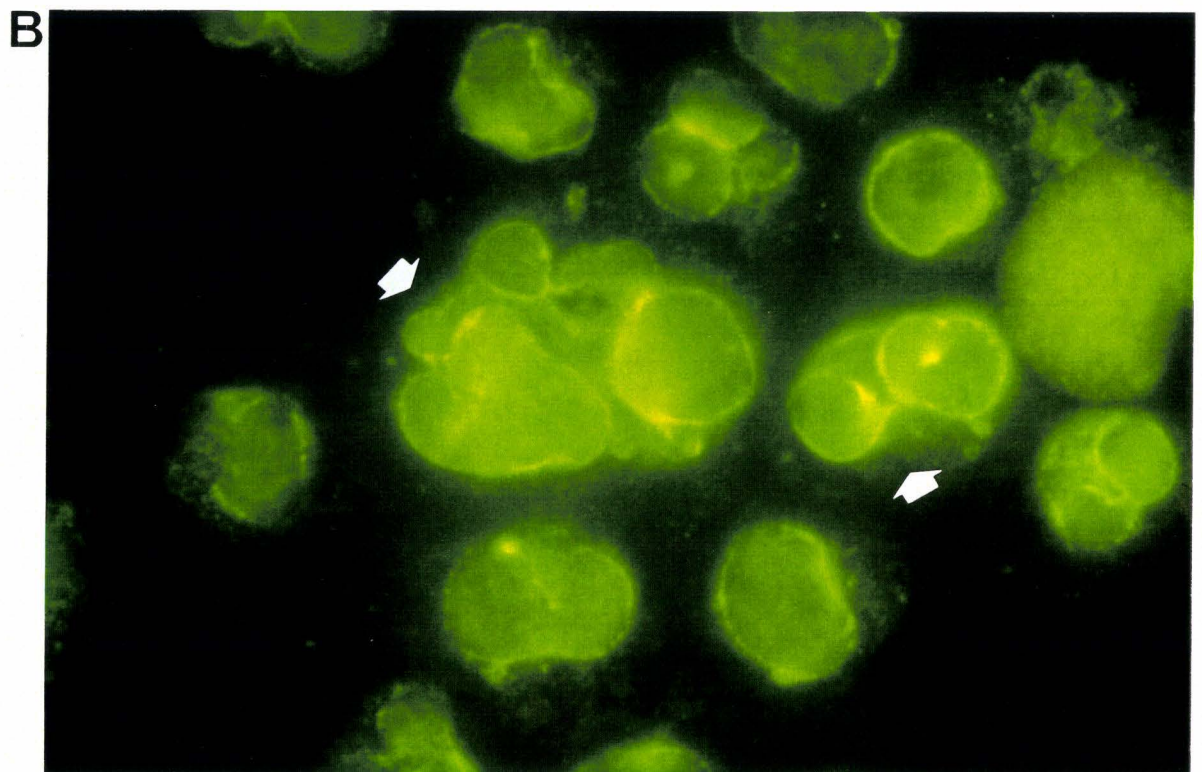
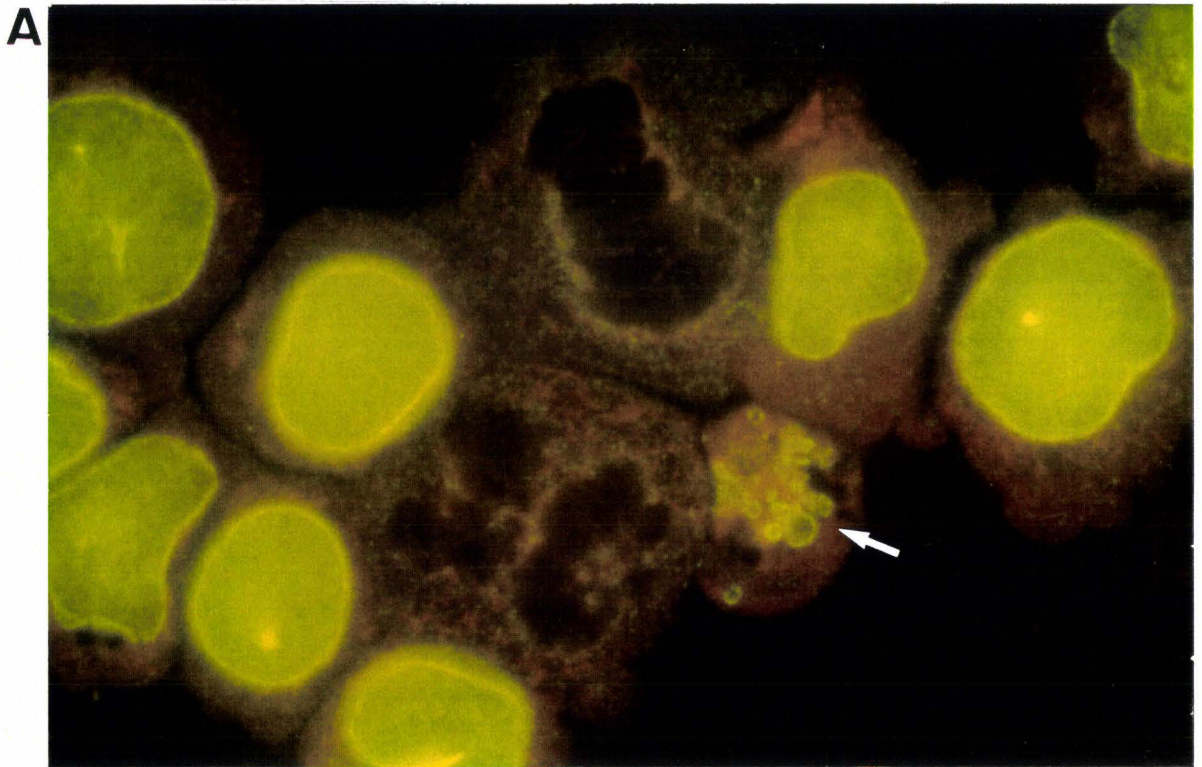


Figure 35 : Détection des lamines par IFI, dans les cellules RPMI 8226, traitées par l'ATRA (0,1 μ M)+CD2425 (1 μ M). (grossissement x 1000)

A : cellule apoptotique typique : \rightarrow

B : cellule atypique : \blacktriangleright

Tableau III : Apoptose induite par l'ATRA et par des associations de rétinoïdes avec un excès de ligand RXR (CD2425). N : normal, R : remaniement, F : remaniement sans dégradation, mais présence de fractionnement nucléaire.

	MORPHOTYPE			MARQUEURS		
	MGG	Hoechst	TUNEL	Lamine B	TGt	Annexine V
Contrôle	-	-	-	N	-	-
ATRA	TYPIQUE			R	+	+
ATRA + CD2425	TYPIQUE et ATYPIQUE TUNEL- (non apoptotique)			R F	+	+
Excès de CD2425 + CD367	TYPIQUE (TUNEL -) et ATYPIQUE (non apoptotique)			R F	+	+

Ainsi donc, nos résultats montrent que non seulement l'activation des RARs et RXRs est nécessaire pour l'obtention des effets inhibiteurs de la prolifération et inducteur de l'apoptose de l'ATRA, mais que cette activation doit apparemment respecter un certain équilibre dans la stimulation respective des deux classes de récepteurs.

D) Activité paradoxale d'un rétinoïde de synthèse spécifique de RAR γ : CD437

Nous avons vu qu'un ligand sélectif des sous-classes RAR (α , β , γ), le CD367, est à lui seul incapable d'inhiber la prolifération et d'induire l'apoptose. Dans ces conditions, on s'attendait logiquement à ce qu'un ligand sélectif des sous-types RAR α , β ou γ soit lui aussi incapable de produire ces effets sur les cellules RPMI 8226. Nous avons voulu vérifier cela avec des ligands sélectifs de RAR γ (CD666 et CD437) et un antagoniste $\beta\gamma$ (CD2665) (Tableau IV).

Avec CD666, tout se passe comme prévu : le CD666 n'entraîne ni l'effet inhibiteur de la prolifération, ni l'effet inducteur de l'apoptose, lorsqu'il est utilisé seul. Par contre, nous avons eu la surprise de voir que le CD437 (6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphtalene carboxylic acid ou AHPN), utilisé seul, provoque une inhibition de la prolifération et une apoptose, rapidement et de façon massive. Un antagoniste des RARs $\beta\gamma$ (le CD2665) a été utilisé pour voir si l'effet passe ou non par le récepteur. Nous avons ainsi testé différentes associations. Ce travail a été mené en collaboration avec un autre étudiant du laboratoire, Bertrand Joseph.

Affinité (Kd en nM) Transactivation Propriété
 RAR α RAR β RAR γ EC50 (en nM)
 RXR α

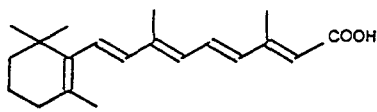
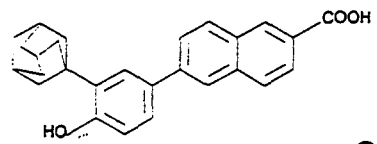
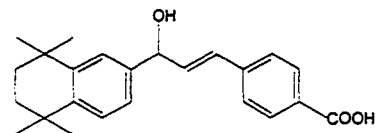
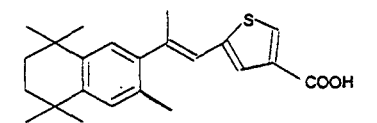
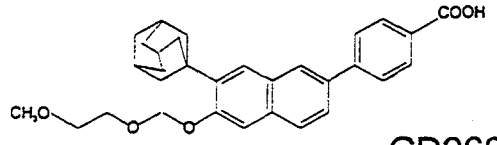
 Acide rétinoïque	16	7	3	>1000	agoniste RARs
 CD437	6500	2480	77	>1000	agoniste RAR γ
 CD666	2240	2300	66	>1000	agoniste RAR γ
 CD2425	>1000	1467	712	54	agoniste RXRs
 CD2665	>1000	306	110	>1000	antagoniste RAR β

Tableau IV : Rétinoïdes de synthèse utilisé dans cette étude. Les données de liaison et de transactivation ont été fournies par le CIRD-Galderma

1) Croissance cellulaire

Le CD437, utilisé à 10^{-9} M, entraîne une diminution du nombre de cellules dès la 6^{ème} heure de traitement, alors que cet effet ne s'obtient qu'à partir du 3^{ème} jour dans les cellules traitées par l'ATRA pour une concentration de 1 μ M. On observe que la croissance est inhibée de 90 % après 24h de traitement par le CD437 (10^{-9} M) (Figure 36).

L'addition du ligand sélectif du RXR (CD2425) et/ou d'un antagoniste (CD2665) ne modifie en rien cette réponse. Contrairement au CD437, le CD666, un autre ligand RAR γ sélectif, est incapable d'inhiber la croissance de la population cellulaire pendant les 48 premières heures.

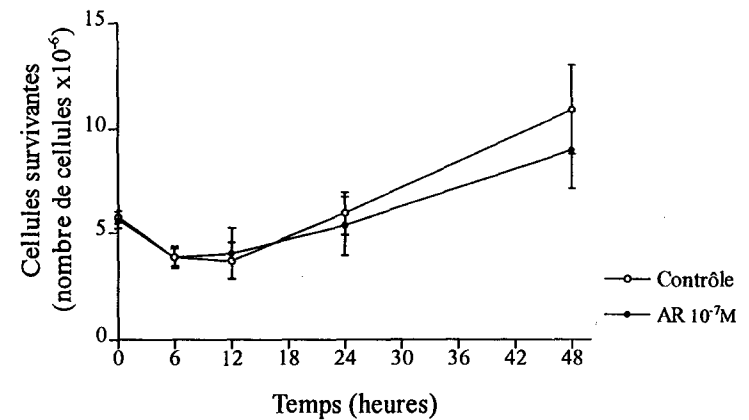
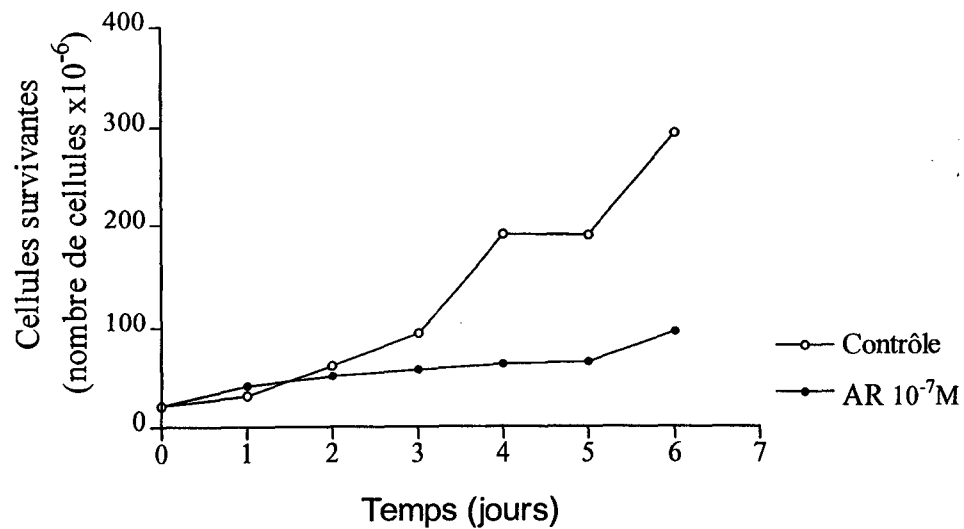
2) Induction de l'apoptose

Le CD437, utilisé à 10^{-9} M, induit l'apoptose des cellules RPMI 8226 de façon massive et précoce. Un taux d'apoptose, comparable à celui obtenu en présence d'ATRA au bout de 6 jours de traitement, est observé dès 7h d'induction en présence du CD437. Cette apoptose est suivie d'une nécrose secondaire abondante qui n'est pas retrouvée avec le traitement par l'ATRA (Figure 37, Tableau V).

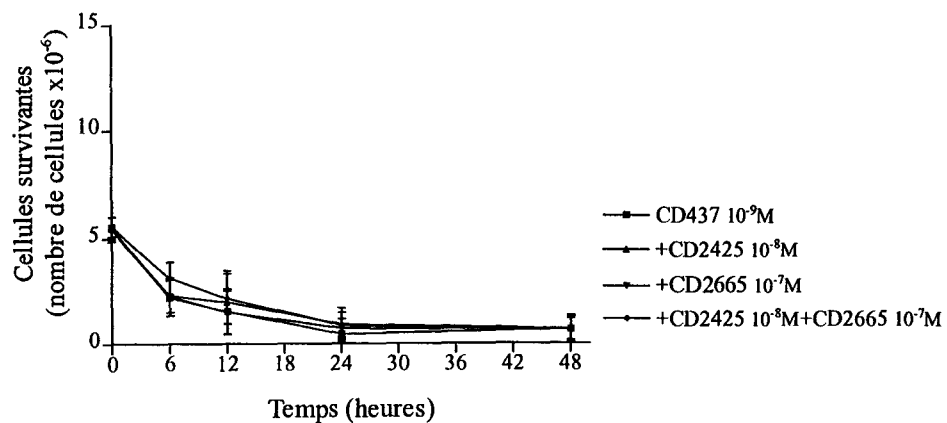
L'effet d'induction de l'apoptose a été caractérisé par les colorations MGG et la méthode TUNEL (Figure 38). Les cellules présentent une morphologie apoptotique nucléaire classique avec la condensation de la chromatine (MGG), et sa fragmentation (TUNEL). Cependant, les caractéristiques morphologiques cytoplasmiques de l'apoptose semblent réduites sous l'action du CD437. Contrairement à l'ATRA, la condensation et fragmentation cytoplasmique ainsi que la formation des corps apoptotiques sont réduites dans le morphotype apoptotique induit par CD437.

Comme la prolifération, cet effet d'induction de l'apoptose n'est pas modulé par l'association avec CD2425 (ligand sélectif du RXR) et/ou CD2665 (antagoniste RAR β γ). Le CD666 n'entraîne pas non plus cette réponse.

Des résultats similaires sont obtenus sur une autre lignée myélomateuse humaine : U266 qui exprime les 6 récepteurs de l'AR. Par contre, dans la lignée L363, qui n'exprime pas le récepteur RAR γ et qui est incapable de répondre à l'effet inducteur de l'apoptose de l'ATRA, le CD437 est quand même capable d'induire l'apoptose, ce qui laisse penser que son effet ne passe pas par le récepteur RAR γ .



A



C

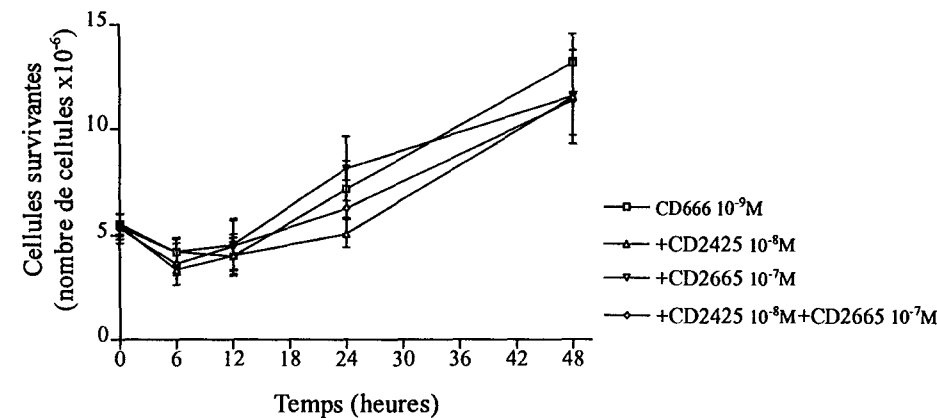


Figure 36 : Croissance d'une population de cellules RPMI 8226 cultivées en présence d'ATRA ($0,1 \mu M$, A), ou de rétinoïdes sélectifs des $RAR\gamma$: CD437 ($10^{-9}M$, B) et CD666 ($10^{-9}M$, C), utilisés seuls ou en association avec un rétinoïde sélectif des $RXR\alpha$ (CD2425, $10^{-8}M$) et/ou un antagoniste $RAR\beta$ (CD2665, $10^{-7}M$). Les cellules excluant le bleu trypan sont comptées aux temps indiqués, les courbes des graphes A, B et C ont été obtenues à partir d'une même expérience répétées 3 fois.

Incubation	Apoptose				Nécrose			
	6 heures	12 heures	24 heures	6 jours	6 heures	12 heures	24 heures	6 jours
Contrôle	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
AR 10 ⁻⁷ M	∅	∅	∅	++	∅	∅	∅	+
CD43710 ⁻⁹ M	++	+++	++	ND	+/-	+++	+++	ND

∅, pas de cellules avec une morphologie altérée.

+/-, cellules isolées.

+, quelques cellules.

++, nombre de cellules modéré.

+++ , cellules nombreuses.

ND, non déterminé.

Tableau V : Semi-quantification de l'apoptose versus la nécrose dans les cellules RPMI 8226.

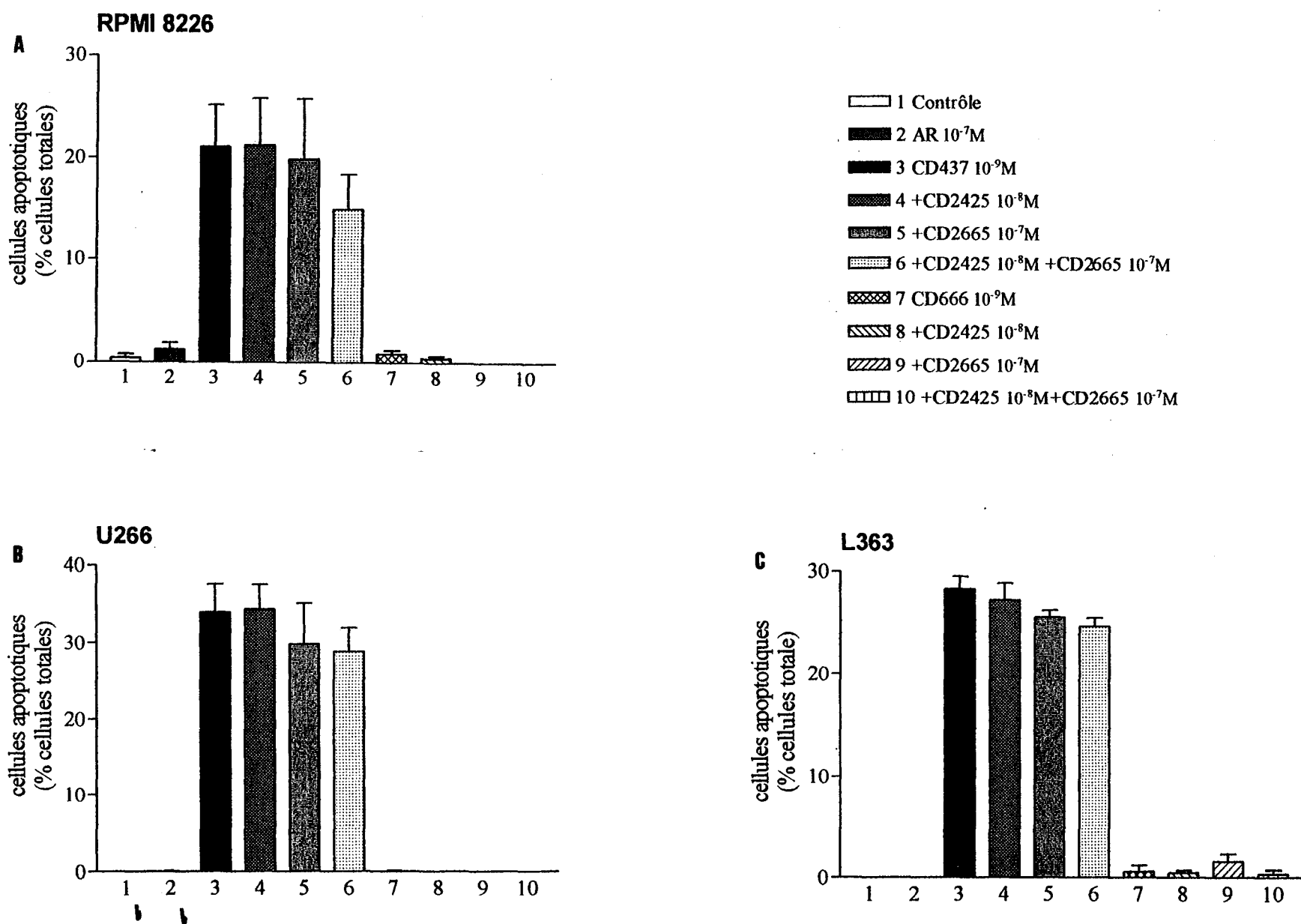


Figure 37 : Quantification des effets de l'ATRA, du CD437 et du CD666, utilisés seuls ou en associations à différents rétinoïdes (voir légende) sur l'apoptose dans les cellules RPMI 8226 (A), U266 (B) et L363 (C), appréciée par coloration MGG, Hoechst et TUNEL, après 7h de traitements.

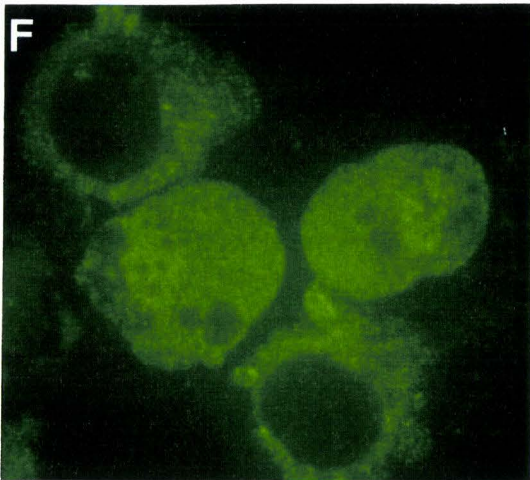
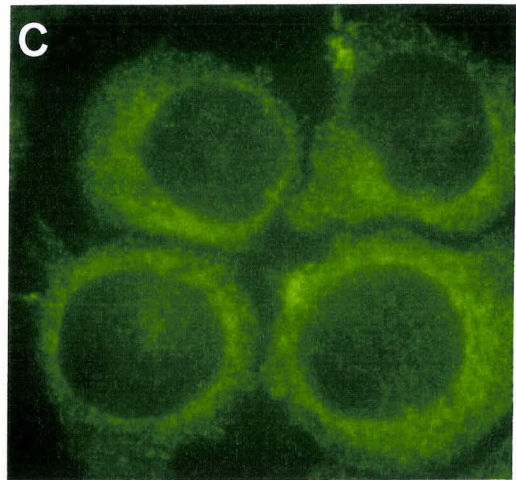
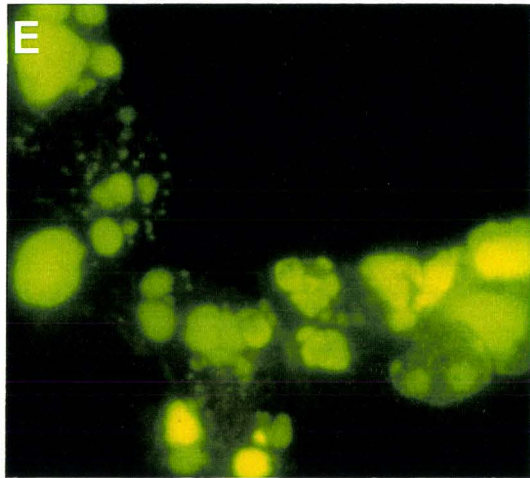
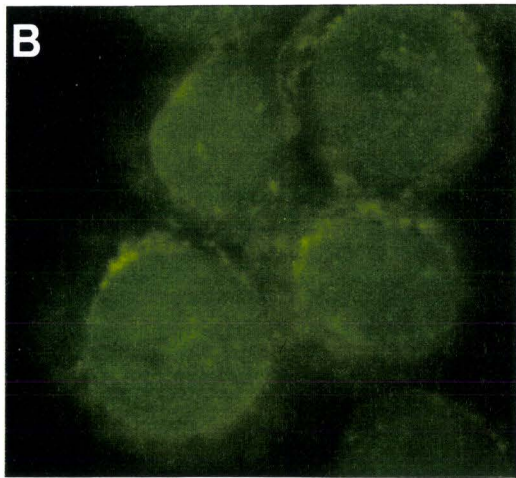
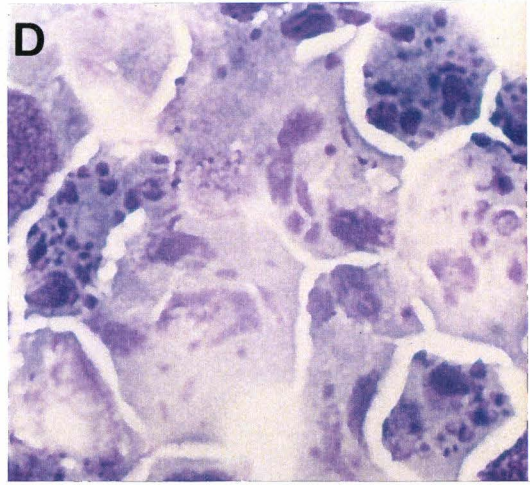
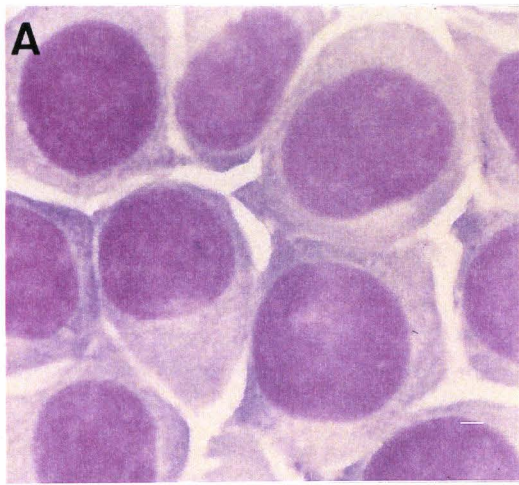


Figure 33 : Caractérisation de l'apoptose induite par le CD 437 ($10^{-9}M$) dans les cellules RPMI 8226 après 7h de traitement.

A, D : coloration MGG.

B, E : détection des cassures de l'ADN par la technique TUNEL.

C, F : détection de la TGt par IFI.

A,B,C : contrôle

D,E,F : CD437. $10^{-9}M$

3) Effets de la cycloheximide et de l'actinomycine D sur l'apoptose

La cycloheximide, inhibiteur de la traduction, n'empêche pas les effets du CD437, ni sur la prolifération ni sur la mort des cellules (Figure 39). De même, l'actinomycine D, inhibiteur de la transcription, est incapable de moduler les effets du CD437. Dans les conditions utilisées, la cycloheximide n'est pas immédiatement toxique et l'actinomycine D l'est faiblement (on observe une légère augmentation de la nécrose, Tableau VI). Ces expériences montrent que l'induction de l'apoptose par le CD437 ne dépend ni de l'induction *de novo* d'ARNm, ni de la traduction *de novo* de protéines.

4) Caractérisation de marqueurs de l'apoptose

Les lamines ont été étudiées par IFI (Figure 40A). Les lamines présentent un remaniement typique de l'apoptose. De plus, l'analyse biochimique par western blot met en évidence une dégradation rapide (dès 8h de traitement) et massive de la lamine B (Figure 40B).

Le CD437 n'induit pas l'expression de la TGt (Figure 41). Associé au ligand RXR (CD2425), il entraîne l'induction de l'activité enzymatique. Le CD666, autre rétinoïde RAR γ sélectif, se comporte comme le CD437. On observe que l'antagoniste RAR $\beta\gamma$ (CD2665) reverse partiellement l'induction obtenue par l'association CD437 ou +CD2425. Cette réversion partielle serait due à une activité agoniste RAR α du CD2665 (communication personnelle d'Uwe Reichert). Des travaux effectués au laboratoire ont montré que les RAR α , β et γ sont redondants fonctionnellement dans l'induction de la TGt (Joseph B *et al*, 1997).

Ainsi, l'induction de la mort cellulaire qui est dans ce cas indépendante du RAR γ , ne s'accompagne pas d'une induction de l'expression de la TGt, qui nécessite, elle, les deux voies RAR (α , β ou γ) et RXRs.

5) Conclusion

Dans cette étude, nous avons démontré l'effet inhibiteur de la prolifération et inducteur de l'apoptose du CD437 dans les cellules RPMI 8226. Cet effet du CD437 s'observe également dans d'autres modèles de lignées tumorales : cellules de mélanome, de leucémie, de cancer du sein, de l'ovaire et du col utérin, ou de cellules, comme les thymocytes (Schadendorf *et al*, 1995 et 1996 ; Shao *et al*, 1995 ; Li *et al*, 1996 ; Chao *et al*, 1997 ; Oridate *et al*, 1997 ; Hsu *et al*, 1997 ; Szondy *et al*, 1997). Cependant, les cellules myélomateuses semblent plus sensibles à l'effet du CD437 : la réponse est plus rapide (quelques heures contre quelques jours), et se produit à des concentrations plus faibles (de l'ordre du nM contre du μ M). Plusieurs marqueurs apoptotiques ont été caractérisés, à côté des études morphologiques : la dégradation de l'ADN,

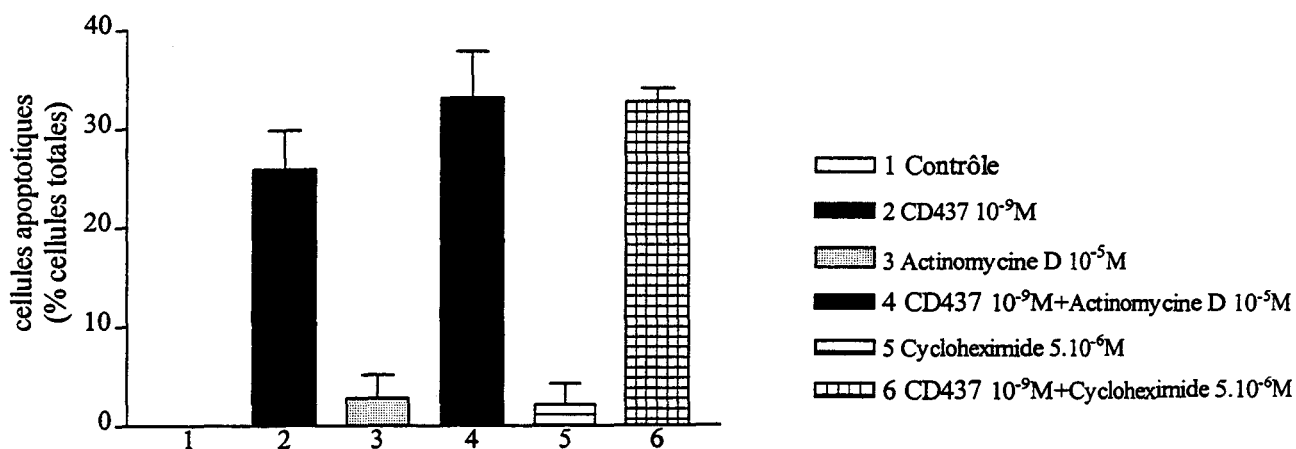


Figure 39 : Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'induction de l'apoptose dans les cellules RPMI 8226 après 7h de traitement par le CD437 10⁻⁹M.

Incubation	Apoptose	Nécrose
	6 heures	6 heures
Contrôle	∅	∅
CD43710 ⁻⁹ M	++	+/-
Actinomycine D 5.10 ⁻⁶ M	+ /-	+
CD43710 ⁻⁹ M + Actinomycine D 5.10 ⁻⁶ M	++	++
Cycloheximide 10 ⁻⁶ M	+/-	∅
CD43710 ⁻⁹ M + Cycloheximide 10 ⁻⁶ M	++	+/-

∅, pas de cellules avec une morphologie altérée.

+/-, cellules isolées.

+, quelques cellules.

++, nombre de cellules modéré.

+++, cellules nombreuses.

ND, non déterminé.

Tableau VI : Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'induction par le CD437. 10⁻⁹M de l'apoptose versus nécrose dans les cellules RPMI 8226 après 6h de traitement.

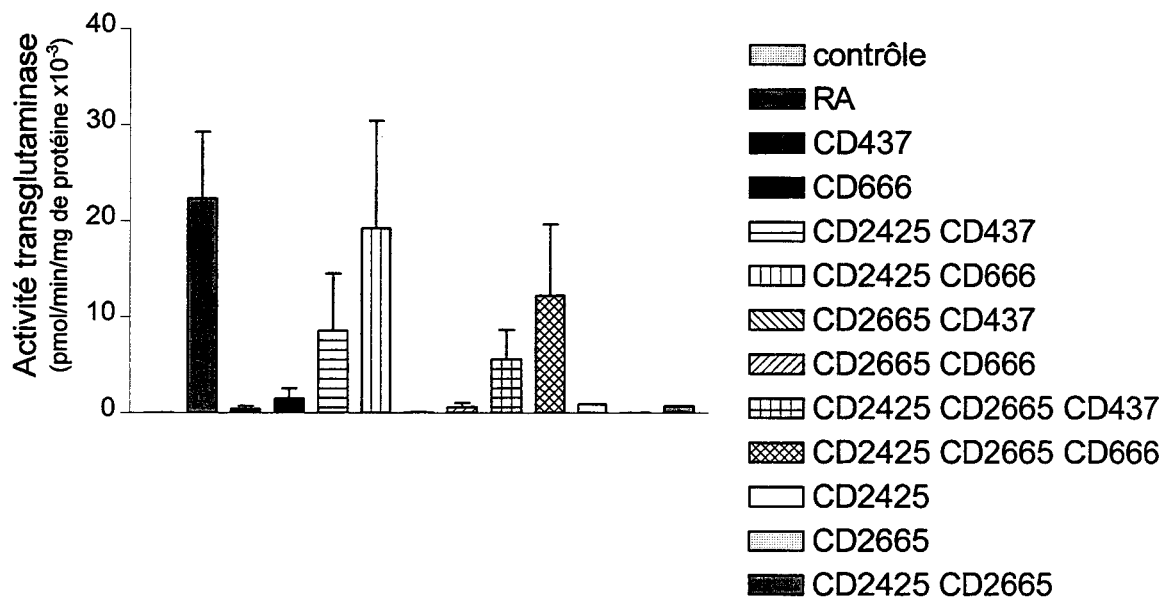


Figure 41 : Effets des rétinoïdes RAR γ sélectifs, seuls ou associés avec un RXR sélectif et/ou un antagoniste RAR β,γ sur l'activité enzymatique de la TGt dans les cellules RPMI 8226.

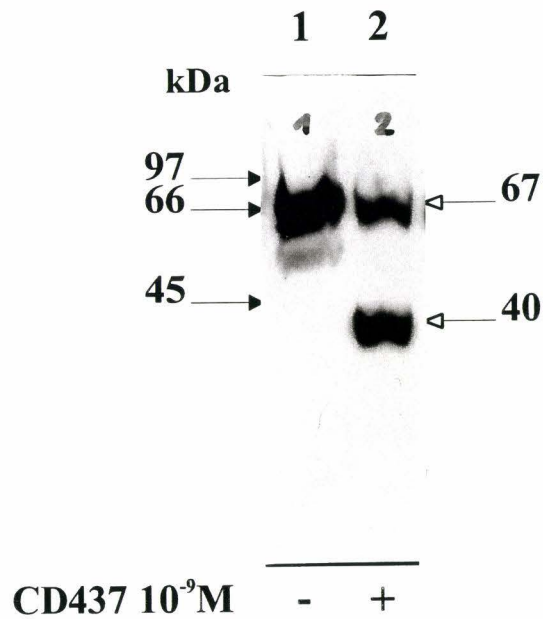
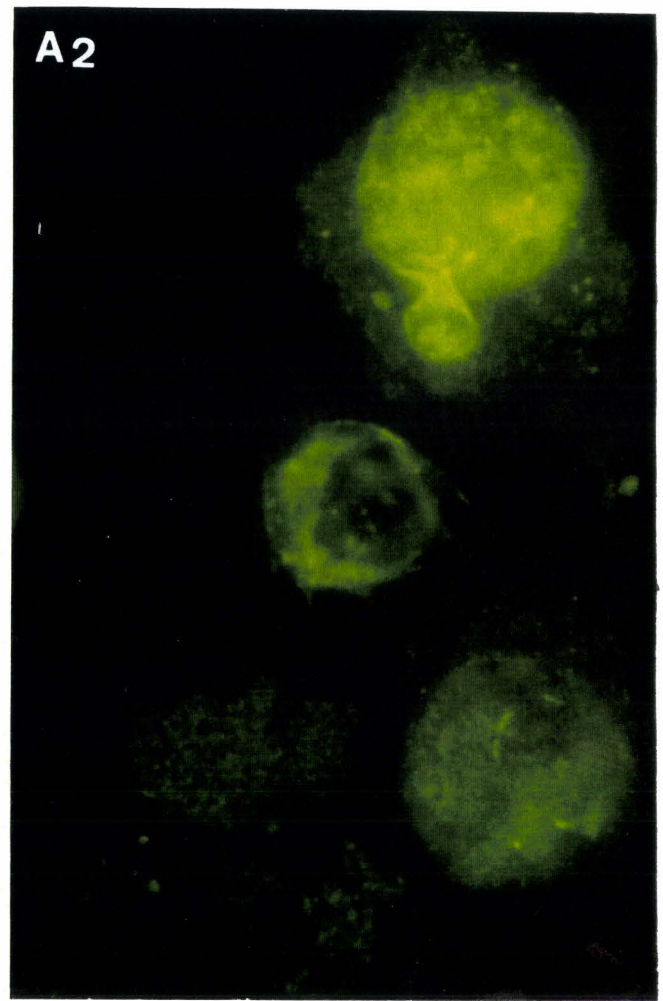
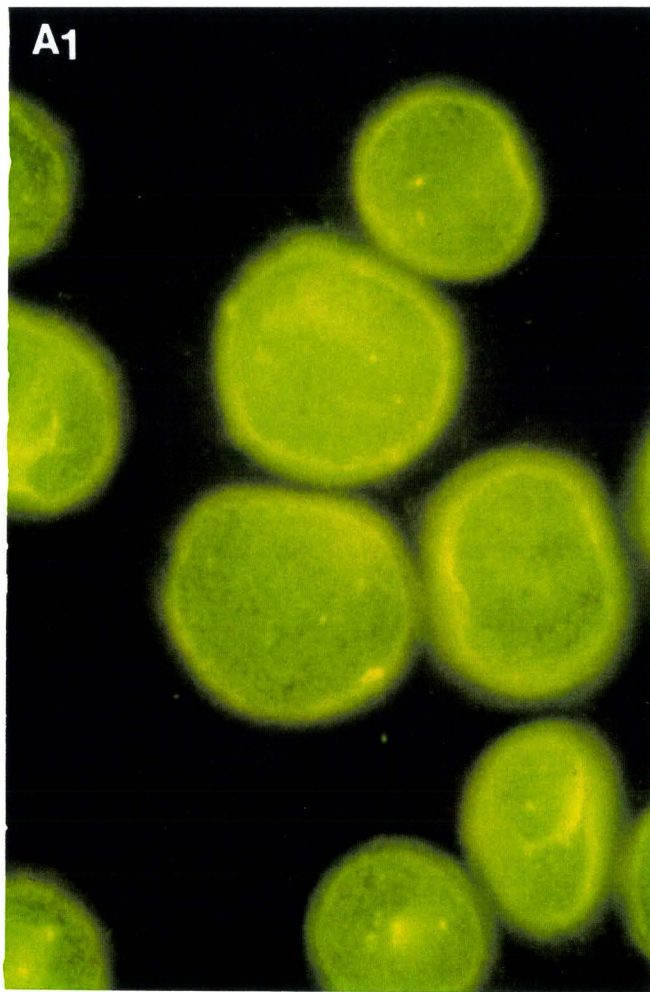


Figure 40 : Effets du CD437 (10^{-9} M) sur le remaniement et la dégradation de la lamine B dans les cellules RPMI 8226 après 7h de traitement :

A) détection par IFI (grossissement x 1000)

B) détection par Western blot

1 : contrôle, 2 : CD437 (10^{-9} M)

cible des endonucléases (TUNEL), la dégradation de la lamine B, cible des caspases et la TGt. Le morphotype apoptotique observé dans les cellules RPMI 8226 traitées par le CD437 est incomplet, les modifications cytoplasmiques sont moins intenses qu'en présence d'ATRA, il y a notamment peu de corps apoptotiques. Cela pourrait être en relation avec l'absence d'induction de la TGt. L'absence d'induction de la TGt, empêchant le déroulement complet du programme apoptotique, contribuerait peut être à l'apparition de la nécrose secondaire. L'association du CD437 ou du CD666 avec le CD2425, RXR sélectif, donne une induction de l'apoptose qui est partiellement inhibée par le CD2665, antagoniste RAR $\beta\gamma$. Le CD437 présente donc aussi des réponses dépendantes des RARs.

Le mécanisme par lequel le CD437 induit la mort des cellules reste à établir. Nous avons montré que ces effets passent par une voie indépendante des récepteurs des rétinoïdes. En effet, l'utilisation d'antagoniste RAR $\beta\gamma$ n'inhibe pas l'effet du CD437, RAR γ sélectif. De plus, l'utilisation du CD666, un autre ligand RAR γ sélectif n'induit pas cet effet. Des observations similaires ont été faites dans les cellules de carcinome cervical (C33, Oridate et al, 1997). Enfin, nous avons montré que la lignée L363, qui n'exprime l'ARNm de RAR γ , est capable de répondre au CD437. Un autre cas d'effet de CD437 ne passant pas par la voie RAR a été démontré dans les cellules HL-60R, qui ne possèdent pas de RARs fonctionnels (Shao et al, 1995 ; Hsu et al, 1997).

Le fait que ni l'actinomycine D ni la cycloheximide ne soient capables d'empêcher l'effet du CD437 suggère que la machinerie permettant l'obtention des effets est déjà présente dans nos cellules. Cette observation ne va pas dans le sens d'une implication de la voie AP-1. Certains auteurs attribuent en effet ces effets antiprolifératifs de l'ATRA à son activité anti-AP-1 (définie comme sa capacité à empêcher la transcription de gènes contrôlés par AP-1). Mais des travaux récents ont montré que le CD437 ne possédait pas d'activité anti-AP-1 (Shao et al, 1995).

Chapitre III

EFFETS DE L'AR ASSOCIE A D'AUTRES MOLECULES DE SIGNALISATION

A. Etude de l'association ATRA-IFN α

L'IFN α est utilisé pour le traitement d'entretien du myélome. En 1992, Siegel *et al* (1992) ont montré que l'association ATRA+IFN α inhibait de manière synergique la croissance de deux lignées myélomateuses (SKMM1 et RPMI 8226). Les effets de ces deux agents sur l'apoptose n'étaient pas étudiés dans ce travail. Il nous a donc semblé intéressant de reprendre cette étude sous cet angle pour documenter une éventuelle synergie pour l'induction de l'apoptose.

1) Effet antiprolifératif

La figure 42 montre l'évolution du nombre de cellules traitées par l'ATRA, l'IFN α et leur association. La procédure expérimentale est identique à celle déjà décrite. Utilisé seul, l'IFN α n'a pratiquement pas d'effet sur le ralentissement de la croissance cellulaire. L'association ATRA+IFN α entraîne un ralentissement de la croissance qui est légèrement accentué par rapport à celui obtenu par l'ATRA seul. Cet effet n'est pas statistiquement significatif.

La même absence d'effet de l'IFN α utilisé seul ou en association avec l'ATRA a été observée dans les expériences d'incorporation de thymidine tritiée (Figure 43). Ici encore, la faible potentialisation de l'effet de l'ATRA par l'IFN α est statistiquement non significative.

Nous ne retrouvons donc pas l'effet marquant rapporté par Siegel *et al* (1992), qui ont pourtant travaillé sur le même modèle cellulaire. Cette différence pourrait peut-être s'expliquer par l'utilisation de sous-clone différents de cellules RPMI 8226.

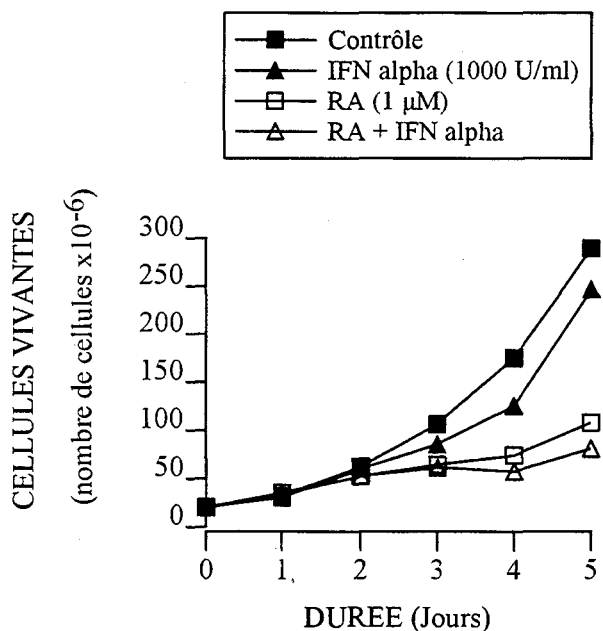


Figure 42 : Croissance d'une population de cellules RPMI 8226 cultivées en présence d'ATRA et/ou d'interféron α (IFN α). Les cellules excluant le bleu trypan sont comptées chaque jour. La déviation standard n'excède pas 14% de la valeur.

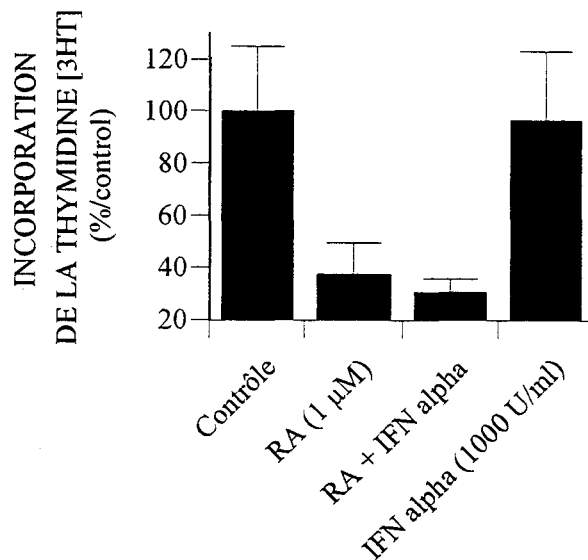


Figure 43 : Prolifération des cellules RPMI 8226 étudiée par incorporation de thymidine tritiée après 48h de traitement par les agents indiqués.

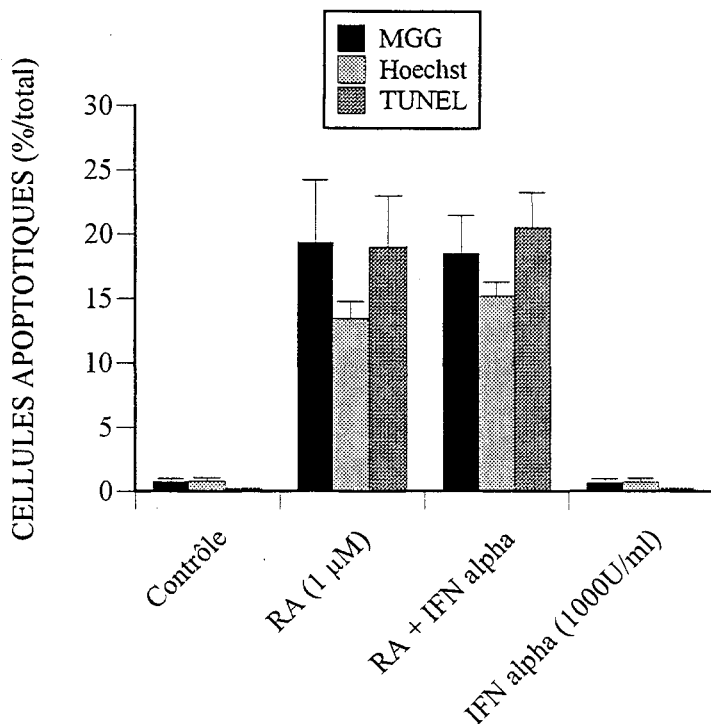


Figure 44 : Quantification des effets de l'ATRA et de l'IFN α sur l'apoptose des cellules RPMI 8226 appréciée par coloration au MGG, Hoechst et TUNEL, après 6 jours de

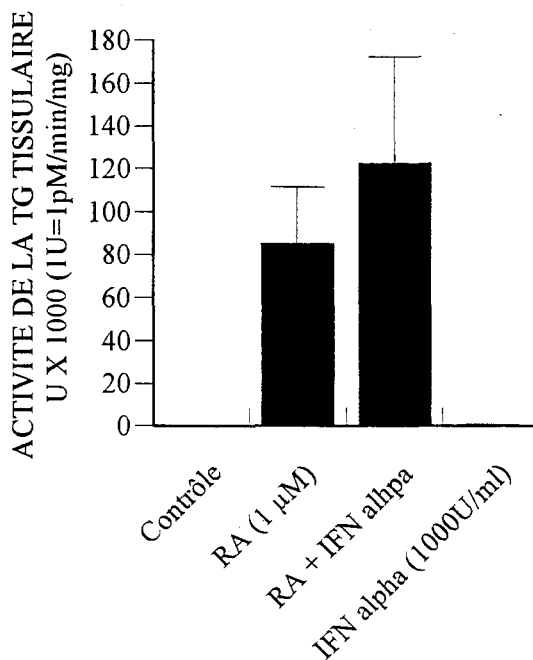


Figure 45 : Mesure de l'activité enzymatique de la TGt après 48h de traitement par les agents indiqués.

2) Induction de l'apoptose

a) Etude morphologique

L'IFN α seul n'induit pas l'apoptose et les cellules présentent la même morphologie que les cellules contrôles. L'association ATRA+IFN α entraîne l'apparition de cellules au phénotype apoptotique classique avec une condensation et une fragmentation nucléaire et cytoplasmique, observée aussi bien par la coloration MGG, Hoechst 33258 et par la méthode TUNEL (non présenté). Comme pour les cellules traitées par l'ATRA seul, les cellules apoptotiques se fragmentent ensuite en corps apoptotiques qui sont phagocytés par les cellules voisines.

Enfin sur le plan quantitatif, l'association ATRA+IFN α et l'ATRA seul donnent des résultats quasiment identiques (Figure 44).

b) Marqueurs biochimiques

Les deux marqueurs apoptotiques étudiés sont induits par l'association AR+IFN α : on visualise l'échelle d'ADN après extraction et analyse par électrophorèse en gel d'agarose de l'ADN, et l'induction de l'activité enzymatique de la TGt (Figure 45). On observe une synergie apparentée retrouvée tant au niveau de l'expression de la protéine détectée par IFI qu'au niveau de l'induction des ARNm (non présenté).

Ici encore, compte tenu des écarts types sur les mesures enzymatiques, le caractère significatif de la potentialisation observée est discutable.

c) Conclusion

Ainsi, dans la lignée RPMI 8226, l'IFN α utilisé seul ne présente aucun effet particulier. Quand on l'associe à l'ATRA, il ne module ni l'effet antiprolifératif, ni l'induction de l'apoptose. Une augmentation synergique modérée de l'induction de la TGt est observée.

En raison de ces résultats un peu décevants, nous n'avons pas poursuivi davantage cette étude.

B. Etude de l'association ATRA/Dex

1) Hypothèse de travail et résumé de l'article

L'idée d'observer les effets des GC repose sur le fait que ces derniers font partie du traitement de base du MM et qu'ils sont connus pour moduler les effets de l'ATRA dans certaines leucémies. Leur association avec l'ATRA présente un intérêt potentiel pour le traitement du myélome.

Nous avons étudié les effets de l'ATRA et de la dexaméthasone (Dex) sur la croissance *in vitro* de la lignée cellulaire myélomateuse humaine RPMI 8226. L'ATRA inhibe la croissance des cellules RPMI 8226 par un effet antiprolifératif et inducteur de l'apoptose. Les caractéristiques morphologiques et biochimiques typiques de l'apoptose, incluant la condensation de la chromatine, la formation des corps apoptotiques et le clivage de l'ADN ont été détectées après 4 jours de traitement par 1 μ M d'ATRA. Le dosage TUNEL *in situ* a démontré que le clivage de l'ADN précédait la condensation de la chromatine et la segmentation nucléaire. L'expression de la TGt, un enzyme connu pour son rôle dans l'apoptose, a été induite avec l'ATRA, comme l'ont montré le dosage enzymatique et la détection *in situ* par IFI. La Dex, utilisée seule, n'a pas d'effet sur la croissance cellulaire et sur l'apoptose. Combinée à l'ATRA, la Dex ne module pas l'inhibition de la prolifération cellulaire dépendante de l'ATRA, mais, de façon inattendue, inhibe plusieurs manifestations morphologiques et biochimiques de l'apoptose, quantitativement et qualitativement. La Dex n'affecte pas la formation des cassures d'ADN induites par l'ATRA mais empêche la segmentation nucléaire et la formation des corps apoptotiques. De façon intéressante, la Dex inhibe aussi l'induction de la TGt dépendante de l'ATRA. Le RU486, un antigluco-corticoïde agissant au niveau du récepteur des GC, contrecarre les effets de la Dex et restaure l'effet de l'ATRA. Ces données démontrent que les événements cytoplasmiques et nucléaires clefs se produisant pendant l'apoptose sont régulés différemment par l'ATRA et la Dex dans lignée myélomateuse RPMI 8226 et qu'un antagonisme est observé.

2) Article

Soumis à Cell Death and Differentiation (accepté sous réserve de modifications)

Voir pages suivantes.

**INDUCTION OF APOPTOSIS BY ALL-TRANS RETINOIC ACID
IN THE HUMAN MYELOMA CELL LINE RPMI 8226
AND NEGATIVE REGULATION BY DEXAMETHASONE.**

RUNNING TITLE :

CONTROL OF APOPTOSIS BY RA AND DEX IN RPMI 8226 CELLS

**Olga Lefebvre¹, Marie-Thérèse Belin¹, Claude Méreau-Richard¹, Thierry Facon^{1,2},
Marc Zandecki³ and Pierre Formstecher¹.**

1- Laboratoire de Biologie Cellulaire, INSERM U459, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex. France.

2- Service des Maladies du Sang, Hôpital Huriez, CH et U de Lille, Place de Verdun, 59037 Lille Cedex.

3- Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Calmette, CH et U de Lille, Bd du Pr. Leclercq, 59037 Lille Cedex.

This work was supported by grants from Université de Lille II, INSERM, Association de la Recherche contre le Cancer, Comité du Pas-de-Calais de la Ligue Nationale Contre le Cancer. All the groups involved in this work belong to and are supported by IFR 22 (INSERM, CH et U, Université de Lille II and Centre Oscar Lambret).

Corresponding Author : P. Formstecher, Laboratoire de Biologie Cellulaire, INSERM U459, Faculté de Médecine, 1, Place de Verdun, 59045, Lille Cedex. FRANCE.
Tel. 33.03.20.62.69.52, Fax. 33.03.20.62.68.84.
e-mail formstecher@lille.inserm.fr

ABSTRACT

We investigated the effects of all-trans retinoic acid (RA) and dexamethasone (Dex) on the *in vitro* growth of the human myeloma cell line RPMI 8226. RA inhibited RPMI 8226 cell growth by both antiproliferative effect and induction of apoptosis. Typical morphological and biochemical characteristics of apoptosis including chromatin condensation, apoptotic bodies formation and internucleosomal DNA cleavage were detected after four days of treatment with 1 μ M RA. *In situ* TUNEL assay demonstrated that DNA cleavage preceded chromatin condensation. The expression of tissue transglutaminase (tTG), an enzyme proposed to play a role in apoptosis was induced with RA, as shown by both enzymatic assay and *in situ* immunofluorescence detection. Dex, when used alone, had no effect on cell growth and apoptosis. When combined to RA, Dex did not interfere with the RA-dependent inhibition of cell proliferation, but unexpectedly inhibited both quantitatively and qualitatively several morphological and biochemical features of the apoptosis induced by RA. Dex did not affect RA-induced DNA breaks formation but impeded the progression of chromatin condensation and the formation of apoptotic bodies. Interestingly, Dex also inhibited the RA-dependent induction of tTG. RU486, a glucocorticoid antagonist, counteracted all Dex effects. Taken together these data demonstrate that key cytoplasmic and nuclear events occurring during apoptosis are differentially regulated by RA and Dex in myeloma cell line RPMI 8226 and that antagonism can be observed.

KEY WORDS : apoptosis, dexamethasone, retinoic acid, myeloma, tissue transglutaminase.

ABBREVIATIONS : RA: all-trans retinoic acid; Dex: dexamethasone; tTG: tissue transglutaminase ; CAM: camptothecin; MGG: May Grünwald Giemsa; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP-biotin nick end labeling; IL-6: interleukin-6; DMSO: dimethylsulfoxide; DABCO: 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane) ; TCA: trichloroacetic acid

INTRODUCTION

Multiple myeloma remains an incurable malignancy. None of the recent advances in chemotherapy resulted in decisive improvement in the prognosis of the disease and new therapeutic approaches are needed (Greipp, 1992).

Retinoids are well known regulators of cell proliferation, cell differentiation and embryonal development (Gudas *et al*, 1994; Hofmann and Eichele, 1994). Their potential use for cancer treatment received a renewed interest since the successful introduction of RA as therapy for acute promyelocytic leukemia, and significant clinical responses have also been observed in other malignancies (Smith *et al*, 1992 ; Hong and Itri, 1994). Sidell *et al* (1991) have reported an inhibitory effect of RA on the growth of a human myeloma cell line, AF-10, via downregulation of IL-6 receptors. This observation was further documented by *in vitro* studies on fresh human myelomatous plasma cells (Ogata *et al*, 1994). RA was also reported to inhibit growth of myeloma cells via a mechanism distinct from IL-6 modulation (Siegel *et al*, 1992). Cell accumulation in cancer can result from either increase in proliferation or failure of cells to undergo apoptosis (Thompson, 1995): RA has been reported to inhibit the proliferation of various cancer cell lines (Hong and Itri, 1994 ; Lotan, 1980), but also to induce apoptosis in several models, including HL-60 human leukemia cells (Martin *et al*, 1990; Piacentini *et al*, 1991; Nagy *et al*, 1995; Zhang *et al*, 1995).

Dex is one of the most effective agents in myeloma therapy (Alexanian *et al*, 1992): however, there are conflicting data about its effects on myeloma cells growth (Gomi *et al*, 1990 ; Ishikawa *et al*, 1990).

In this study we investigated the effects of RA and Dex on both proliferation and cell death of a human myeloma cell line, RPMI 8226 (Moore and Kitamura, 1968). RA was demonstrated to induce apoptosis in these cells. This effect was surprisingly partly inhibited in the presence of Dex.

RESULTS

1) Inhibition of cell growth :

The effects of RA, Dex and RU486, an antiglucocorticoid, on the growth of RPMI 8226 cells were evaluated (fig. 1). Treatment with 1 μ M RA alone resulted in significant slowing down of cell growth observable from the second day and leading to a progressive growth arrest which

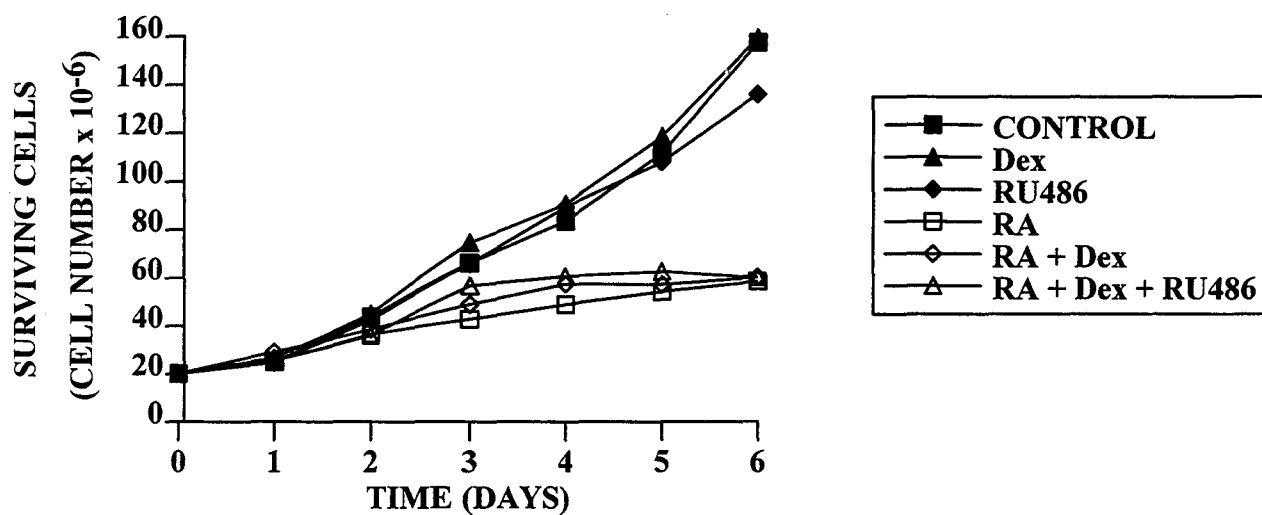


Figure 1 : Effects of RA, Dex and RU486, an antiglucocorticoid, on RPMI 8226 cells growth. Cell proliferation was evaluated by direct counting (Trypan blue method). Cells were cultured for two days with a single dose of each specified compound (RA 1 μ M, Dex 0.5 μ M and RU486 2 μ M) used alone or in combination. After two days, the medium was supplemented to 10% FCS and cells were further incubated for 4 days at 37°C. Living cells were counted daily. Mean values (n=6) are shown plotted against time.

was almost complete after six days. RPMI 8226 cells appeared unresponsive to glucocorticoids, since Dex and RU486 treated cells grew as control cells. Dex had no effect on the growth inhibition induced by RA. No toxic effect was observed with any of the agents at the concentrations used (data not shown).

2) Antiproliferative effect :

To document the antiproliferative effect of RA, the rate of DNA synthesis was evaluated. As shown in fig. 2, an inhibitory effect of RA was also evident in [³H] thymidine incorporation of RPMI 8226 cells : RA suppressed [³H] thymidine uptake by approximately 75% and neither combination of RA and Dex nor RA+Dex+RU486 modified this effect. Dex and RU486, used alone, were here again ineffective. This result was confirmed by determining the growing fraction of the cell population by using Ki-67 antibody. This antibody reacts with an antigen expressed in all stages of the cell cycle with the exception of G0. In control cells, the percentage of Ki-67 positive cells, evaluated after a 3 days culture was 80% (± 7.6) and did not change during the next two days. In RA treated cells, the percentage was 36% (± 7.6) after a 3 days treatment and decreased to 17% (± 2.1) after 4 days. DNA synthesis arrest is an earlier event when compared to the decrease of the number in Ki-67 positive cells, since suppression of [³H] thymidine uptake was effective after a 48h treatment while decrease in Ki-67 positive cells was observed after 3 days. It has been already demonstrated that Ki-67 antigen expression can persist 24 hours after cell cycle arrest (Seignerin and Guillaud, 1991).

3) Induction of apoptosis :

To investigate whether RA-induced inhibition of cell growth was also due to cell death, cell morphology was observed after MGG (May-Grünwald Giemsa) and Hoechst 33258 staining. Cells treated with 1 μ M RA showed typical morphological features of apoptosis (fig.3 and 4, panel B). 20.6% (± 4.5) of RA-treated cells were apoptotic, contrasting with less than 0.9% (± 0.5) for control cells (fig. 5). Dex and RU486 alone did not induce any apoptotic change (results within values of controls). However when used in combination with RA, Dex inhibited the RA-dependent induction of apoptosis (fig. 3 to 5). When compared to RA-treated cells, cells treated with the combination of RA and Dex were characterized by a striking decrease of the number of cells showing typical apoptotic features, and a strong inhibition of apoptotic bodies formation. However in most cells the nucleus was looking different from control cells as it

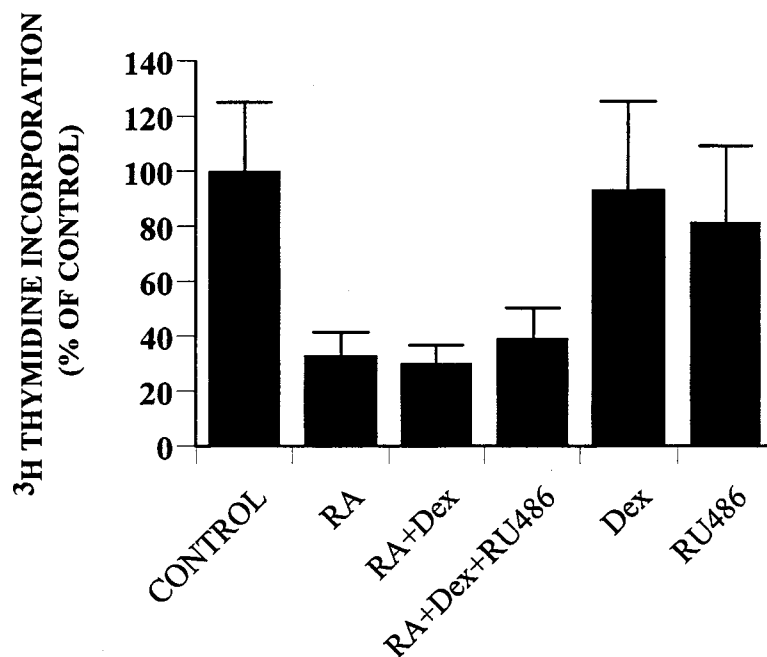


Figure 2 : Effects of RA, Dex, and RU486 on the rate of DNA synthesis. RPMI 8226 cells were incubated in the absence (control) or in the presence of the indicated compounds, used at the same concentration as in fig.3. [³H] Thymidine incorporation was performed at 48h for 3h, as described in materials and methods. Data are expressed as the mean (\pm SD, n=5) percentages of cpm incorporated in cells treated with inducing agents versus control.

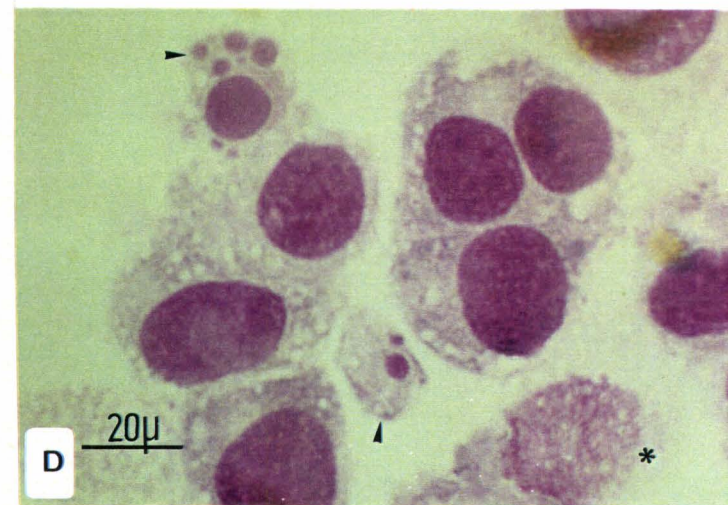
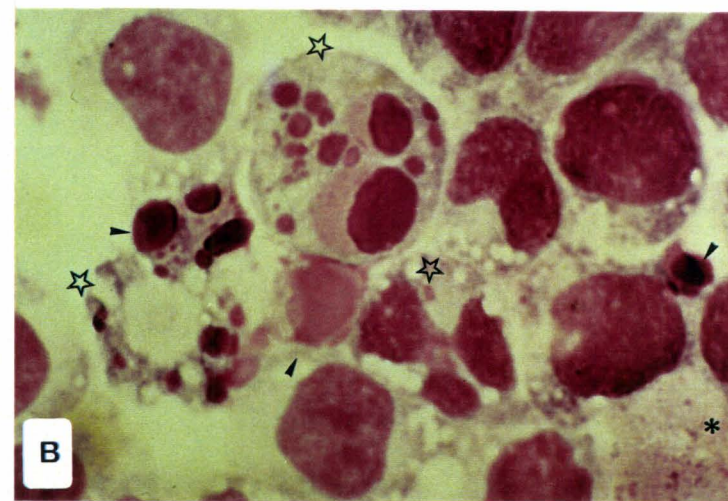
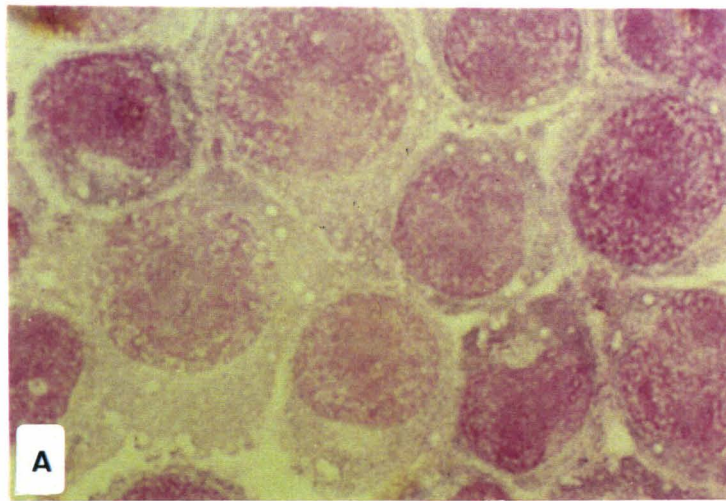


Figure 3 : Morphologic aspect of RPMI 8226 after treatment with RA. Cells were analyzed by May-Grünwald Giemsa staining at day 6 post induction (magnification x 1,000). A : untreated cells, B : cells treated with RA (1µM) alone, C : with RA (1µM) plus Dex (0.5µM) or D : with RA (1µM) plus Dex (0.5µM) and RU486 (2µM). Apoptotic cells (☆), apoptotic bodies (arrowheads) and necrotic cells (*) are indicated. There was no morphological change in cells treated with Dex or RU486 alone (data not shown).

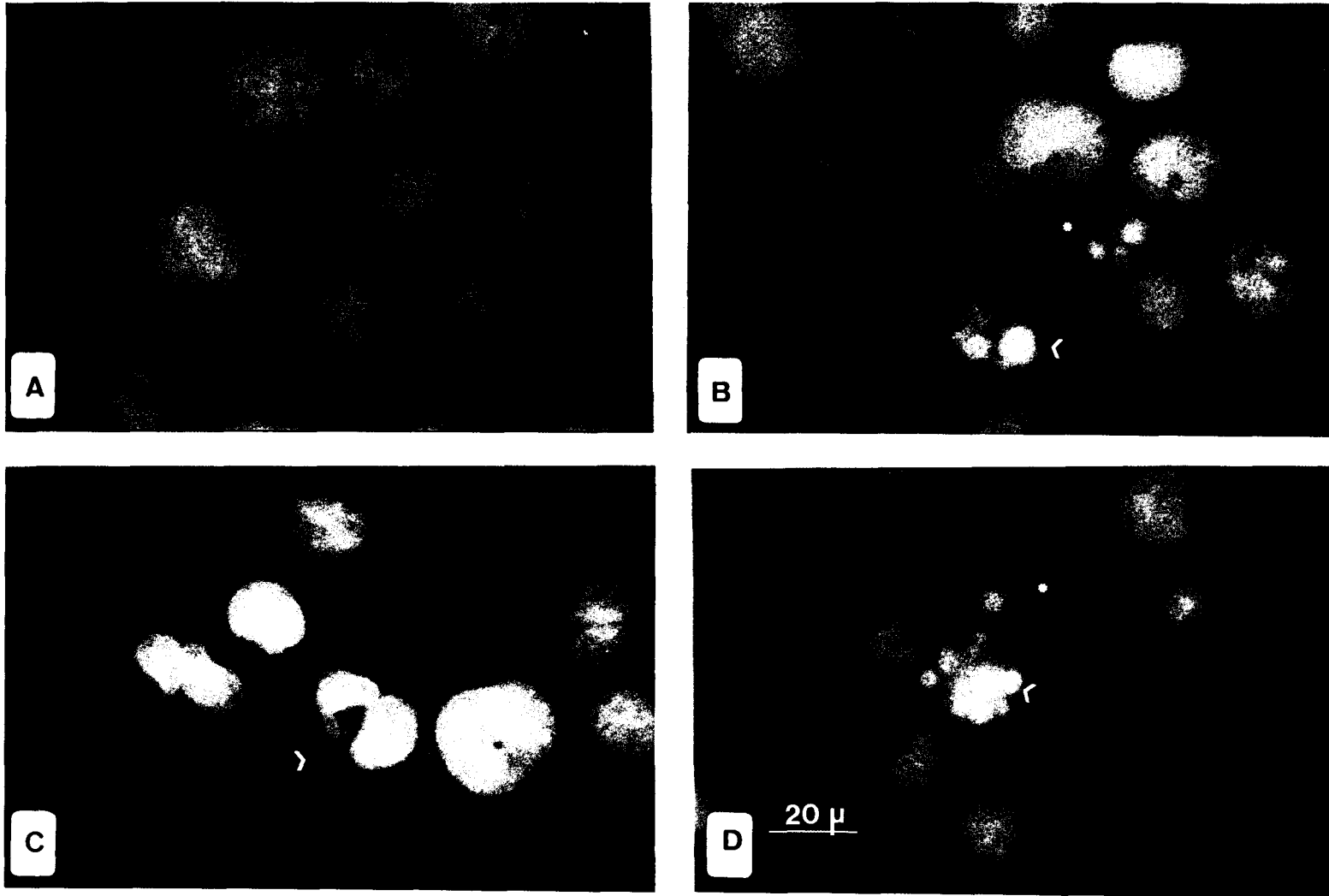


Figure 4 : Hoechst 33258 staining of RPMI 8226 cells nuclei. Untreated cells (A) and cells treated with either RA (B), RA plusDex (C) or RA plus Dex and RU486 (D) at the same concentrations as in fig.3 were analyzed at day 6. Apoptotic cells (*) and apoptotic bodies (arrowheads) are indicated.

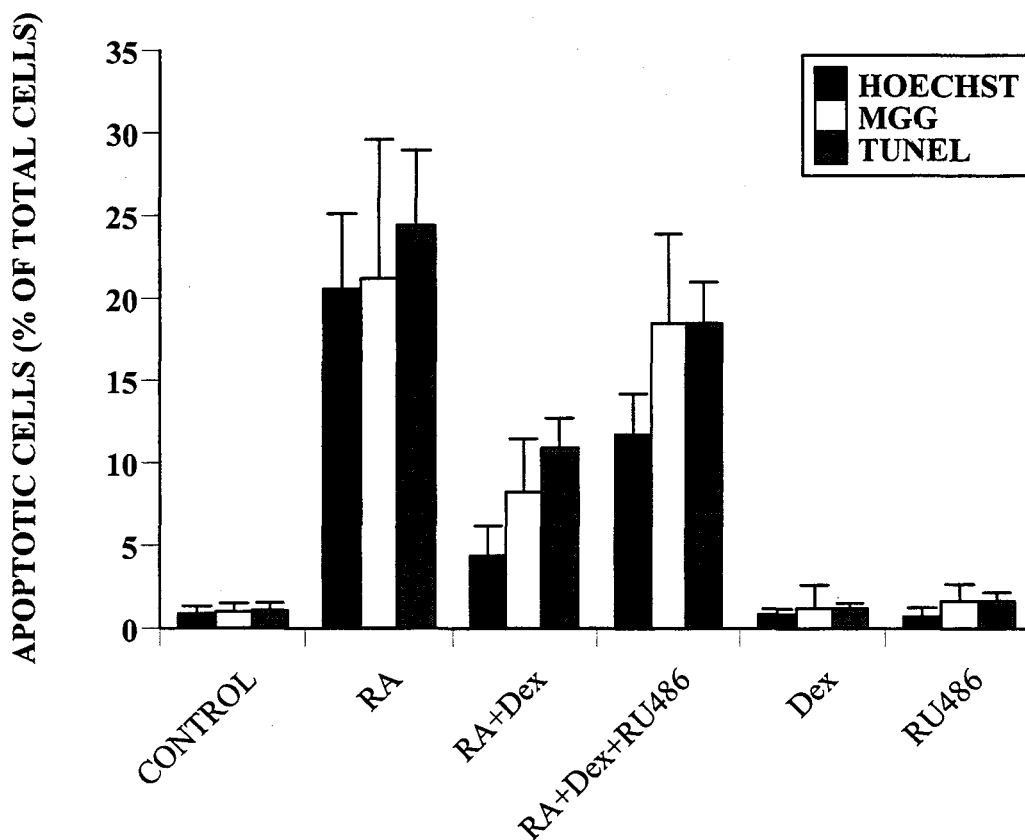


Figure 5 : Quantification of apoptotic cells after treatment with RA and/or Dex and RU486. RPMI 8226 cells treated as described in fig.4 were stained either by Hoechst 33258 (HOECHST) or by May-Grünwald Giemsa (MGG) or by the TUNEL method (TUNEL). In each case the percentage of apoptotic cells was determined in duplicate counts 400 cells. Mean values \pm SD from 6 independent experiments are shown.

appeared partially condensed and fragmented (fig. 3 and 4, panel C). Interestingly these effects of Dex could be counteracted by RU486, which restored the classical morphology of apoptosis induced by RA (fig. 3 and 4, panel D), and were therefore probably mediated by the glucocorticoid receptor.

4) DNA fragmentation :

To ascertain that RA induced apoptosis in RPMI 8226 cells, treated cells were submitted to qualitative analysis of DNA fragmentation using agarose gel electrophoresis (fig. 6). Two positive controls providing a characteristic DNA ladder were used : S49.1 mouse lymphoma cells treated with Dex (lane 2) and RPMI 8226 cells treated with CAM (camptothecin) (lane 8), a drug known to induce apoptosis in various models (Bruno *et al*, 1992). RPMI 8226 cells treated with RA for 5 days showed the typical DNA ladder (lane 9). Dex alone did not induce any DNA fragmentation in RPMI 8226 cells (lane 5) but was unable to inhibit its induction by RA (lane 14). The RA-induced DNA fragmentation was evaluated by a quantitative assay of the low molecular weight DNA extracted from the lysed cells. $10.1 \pm 2\%$ of fragmented DNA was found in RA-treated cells and only 0.5% in untreated cells. For cells treated with RA+Dex and RA+Dex+RU 486, values were $8\% \pm 1.8$ and $8\% \pm 1.6$ respectively. Taken together these data indicate that RA induce true DNA fragmentation in RPMI 8226 cells. This phenomenon was not inhibited by Dex treatment contrary to the condensation of chromatin and fragmentation of nuclei observed on MGG or Hoechst stained cytospin cell preparations. Finally the TUNEL method provided more details on this puzzling observation by allowing *in situ* labeling of DNA breaks (fig. 7). RA-treated cells showed a high level of DNA fragmentation in the condensed and fragmented chromatin. In cells treated with RA+Dex, a more diffuse labeling was observed in a significant number of cells where no typical chromatin condensation and fragmentation could be observed by MGG or Hoechst staining. These data demonstrated that Dex did not inhibit the RA-induced DNA breaks formation and the beginning of chromatin condensation, but impeded the progression of this condensation followed by the fragmentation of nuclei and the formation of apoptotic bodies.

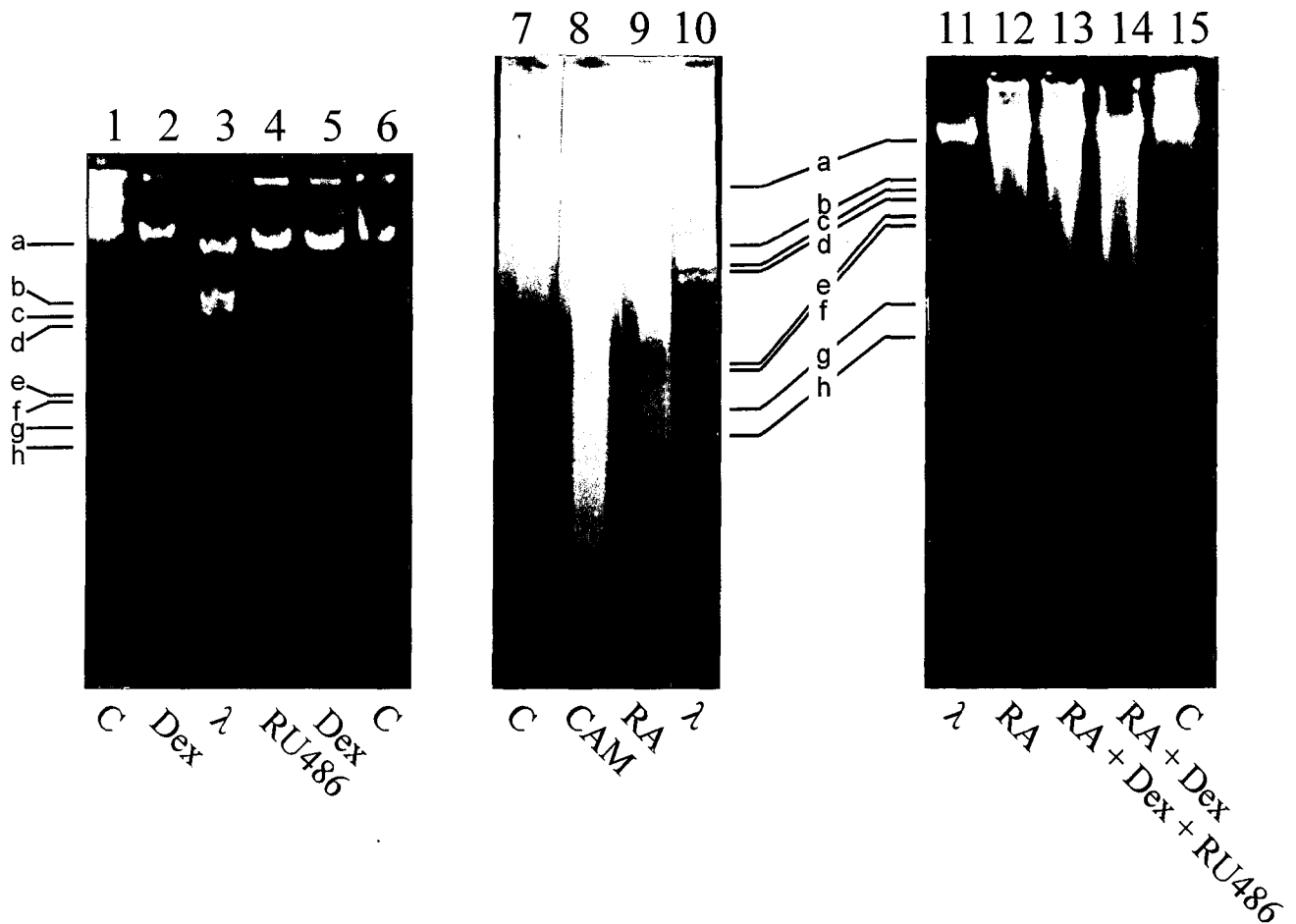


Figure 6 : DNA fragmentation analysis by gel electrophoresis.

Mouse lymphoma S49.1 cells treated (lane 2) or not (lane 1) with Dex ($1\mu\text{M}$) for 48 h were used as control for typical DNA ladder (lane 2). Human myeloma cells were either untreated (lanes 6, 7 and 15) or treated for 5 days with RA, Dex, RU486 alone or in combination (lanes 4, 5, 9, 12, 13 and 14). RPMI 8226 cells treated with $1\mu\text{M}$ camptothecine (CAM) for 3 h (lane 8) yielded a positive control of DNA fragmentation of these cells. Enzymatic digested lambda phage DNA was used as size marker (lanes 3, 10 and 11) with fragments of decreasing sizes (a: 21,226 , b: 5,100, c: 4,277, d: 3,530, e: 2,027, f: 1,904, g: 1,594 and h: 1,330 bp respectively).

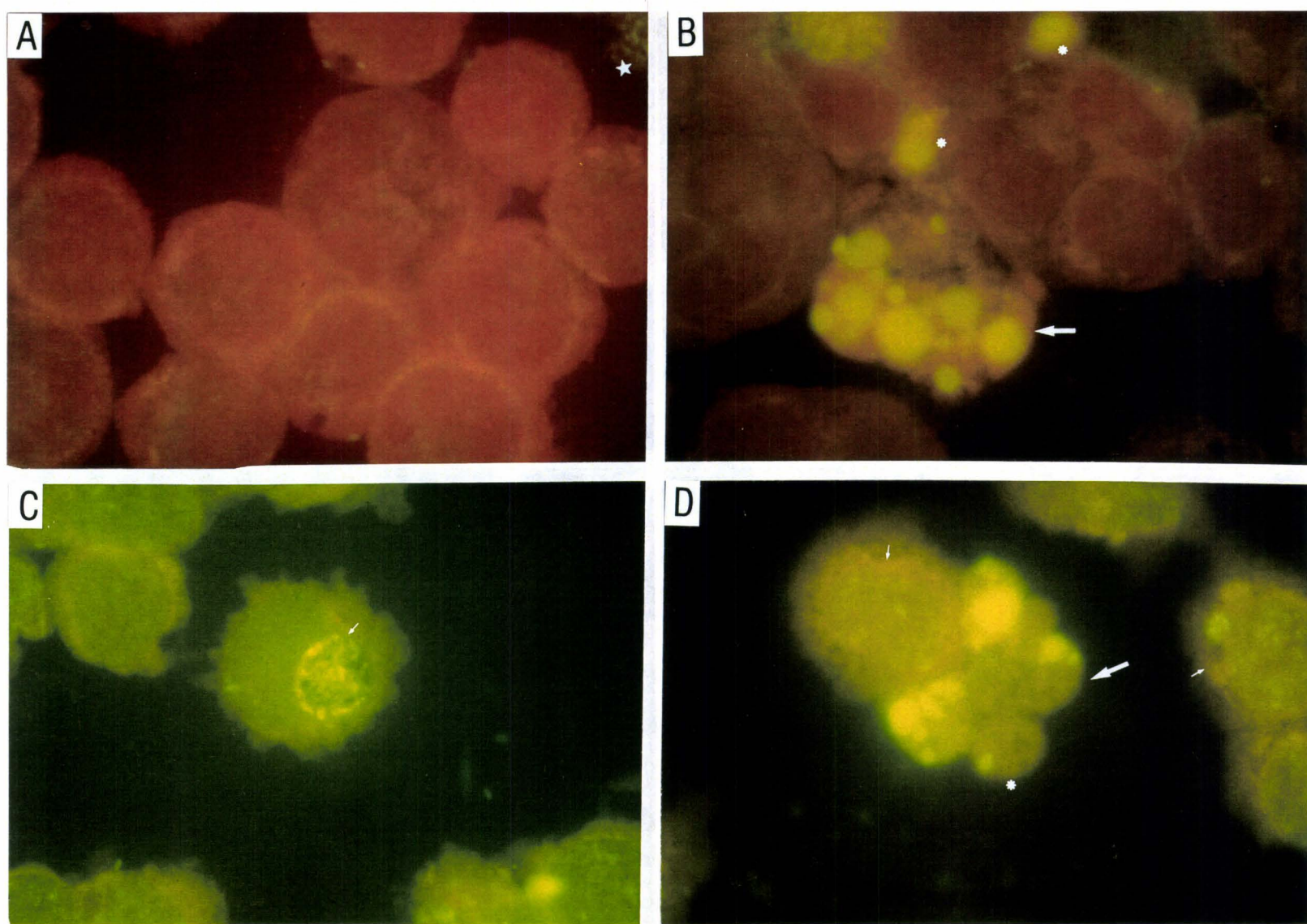


Figure 7 : In situ labeling of DNA strand breaks. Untreated cells (A) and cells treated with either RA (B), RA plus Dex (C) or RA plus Dex and RU486 (D) at the same concentrations as in fig.4 were analyzed at day 6 using the TUNEL assay as described in material and methods. Apoptotic cells (*) and apoptotic bodies (arrows) are indicated.

5) Induction of tissue transglutaminase :

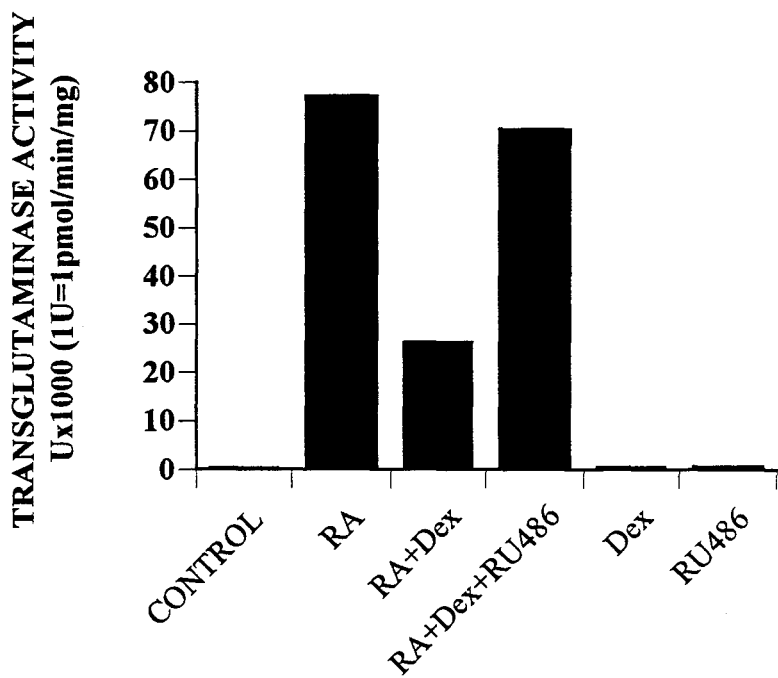
tTG has been suggested to be implicated in the formation of apoptotic bodies (Fesus *et al.*, 1987). Induction of both enzymatic activity and expression of the protein was studied in RA-treated cells. As shown in fig.8, the basal level of tTG activity in untreated cells was extremely low and treatment with 1 μ M RA for 48h resulted in striking induction of this activity. Dex produced a strong inhibition of this induction, an effect prevented by the addition of RU486. Immunofluorescence studies (fig. 9) demonstrated a very low expression of the protein in untreated cells, whereas a very strong expression was found in RA-treated cells, with the strongest reactivity within apoptotic bodies. This effect was inhibited by Dex and as a rule restored by adding RU486. Taken together these results suggested that Dex downregulated tTG induction through ligand activation of the glucocorticoid receptor.

DISCUSSION

We demonstrated here that RA modulates RPMI 8226 cell growth by both inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis. Surprisingly the latter effect was inhibited when Dex was combined to RA.

Conflicting data have been reported about the effect of RA on RPMI 8226 cell growth, some authors observing a clear inhibition of cell proliferation (Koskela *et al.*, 1994 ; Taetle *et al.*, 1995 ; Levy *et al.*, 1996) whereas others found no effect (Chen *et al.*, 1996). We have no clear explanation for these discrepancies which are probably due to the use of different RPMI 8226 subclones. The mechanism by which RA inhibits myeloma cell growth is still not clearly understood. In IL-6 dependent myeloma cell lines, and in myeloma cells freshly isolated from patients, RA has been shown to downregulate IL-6 receptor expression, and was identified as a negative modulator of the IL-6 mediated autocrine/paracrine growth (Sidell *et al.*, 1991 ; Ogata *et al.*, 1994 ; Levy *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1996). However RA has also been reported to inhibit the growth of IL-6 independent myeloma cell lines (Siegel *et al.*, 1992). In fact the mechanisms by which retinoids negatively regulate tumor cell growth are largely unknown. A better understanding of these mechanisms will require the characterization of the subtype of receptor involved, RAR and/or RXR (Leid *et al.*, 1992), and the identification of the target genes involved. Preliminary results from our laboratory suggest that the activation of both RAR and RXR is required to obtain a full response on cell proliferation and apoptosis (Joseph B *et al.*, submitted).

A)



B)

SAMPLES (n=5)	%/RA	SD
CONTROL	0.6	1.2
RA	100	0
RA + Dex	31.8	8.2
RA + Dex + RU486	82.2	8.6
Dex	1.0	1.4
RU486	1.2	1.5

Figure 8 : Tissue transglutaminase activity in RPMI 8226 cells treated with RA, Dex or RU486.

Specific tTG activity (1U = 1 pm of [³H] putrescin incorporated in NN' methylcasein/min/mg of cell proteins at 30°C) was analyzed in cells treated for 48h with the same concentrations and combinations of agents as in the preceding figures. A: results of a representative experiment, B: mean of five different experiments. Results are expressed as a percentage of tTG activity detected after treatment with 1μM RA.

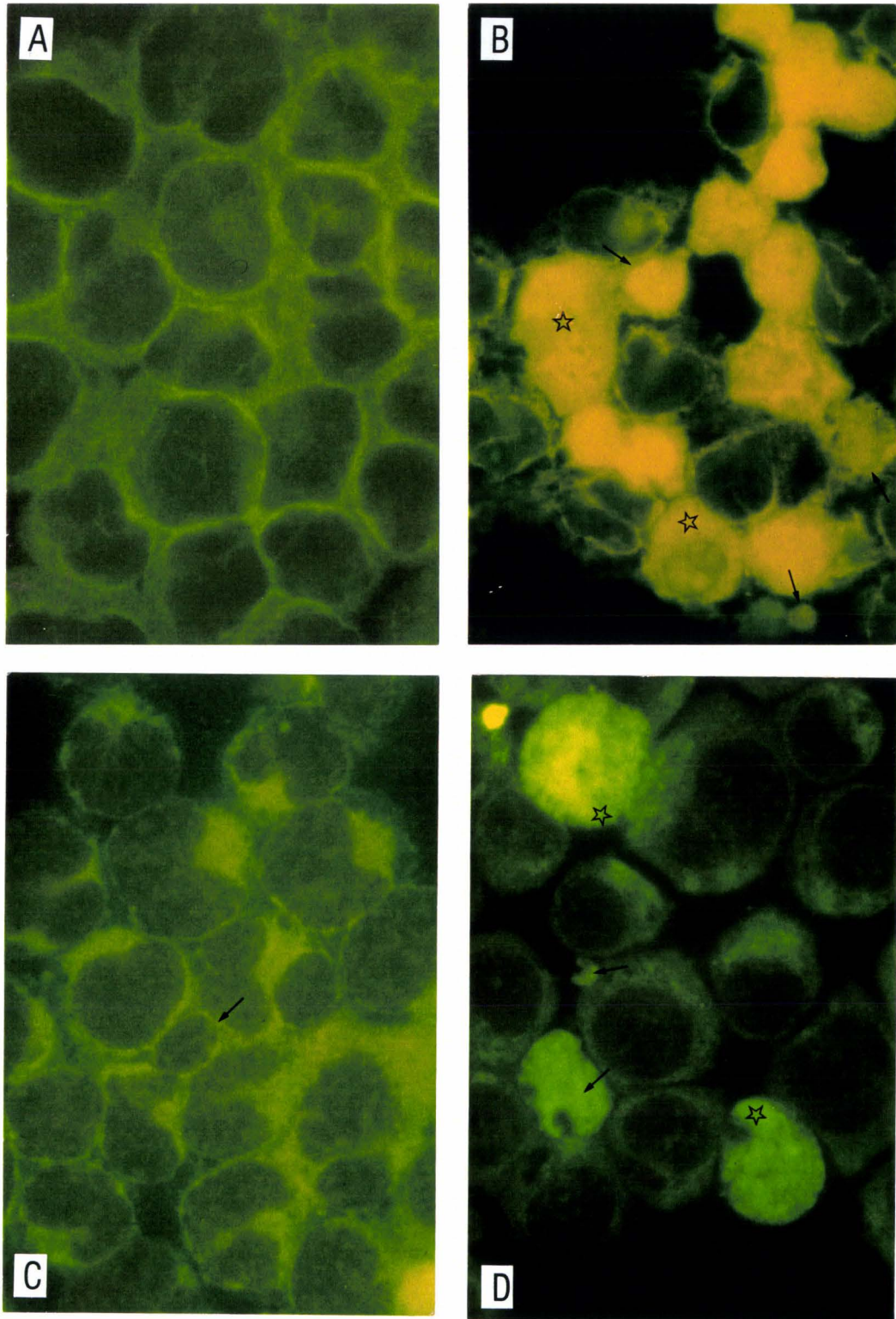


Figure 9: Indirect immunofluorescence detection of tissue transglutaminase in RPMI 8226.

Untreated cells (A) and cells treated with either 1 μM RA (B) or 1 μM RA plus 2 μM Dex (C) or 1 μM RA plus 1 μM Dex (D) were analyzed after 6 days of culture (magnification X 1,000).

Cells treated with Dex or RU486 alone gave results similar to untreated cells (data not shown).

Apoptotic cells (*) and apoptotic bodies (arrows) are indicated.

We did not observe any effect of Dex alone on RPMI 8226 cell growth. Our data are in agreement with previous papers reporting that RPMI 8226 cells growth was insensitive to glucocorticoids (Gomi *et al*, 1990 ; Chen *et al*, 1996). This resistance was attributed to a post-receptor mechanism, since the presence of a functional glucocorticoid receptor was documented in these cells (Gomi *et al*, 1990). This result is in concordance with our findings that Dex, despite its lack of effect on RPMI 8226 cell growth, was still able to modulate RA-dependent induction of apoptosis and tTG in these cells. These responses were likely mediated by the glucocorticoid receptor, as suggested by the inhibitory effect of RU486, an antiglucocorticoid acting at the receptor level. Very recently RPMI 8226 cells have been reported to be sensitive to Dex, which inhibited cell growth at low concentrations and induced apoptosis at high (micromolar) concentrations (Shiao *et al*, 1995 ; Lichtenstein *et al*, 1995). In a recent congress abstract a synergy between RA and Dex has been reported (Siegel *et al*, 1992). This discrepancy with previous results could also be due to the use of different RPMI 8226 subclones. If glucocorticoids are among the most effective agents in treating myeloma and inhibit the proliferation of myeloma cells freshly purified from bone marrow aspirates (Ishikawa *et al*, 1990), their effects on myeloma cell lines in culture are far more variable (Gomi *et al*, 1990 ; Shiao *et al*, 1995 ; Lichtenstein *et al*, 1995 ; Hardin *et al*, 1994 ; Moalli *et al*, 1992). In fact myeloma cells become progressively resistant to glucocorticoids either by acquiring a glucocorticoid receptor mutation (Moalli *et al*, 1993) or more commonly by a post-receptor mechanism (Gomi *et al*, 1990). The latter mechanism could affect the expression of only a subset of the different genes normally controlled by glucocorticoids in the fully sensitive cell lines and explain why some other cell lines exhibit dissociated or incomplete responses to glucocorticoid treatment.

Our results demonstrated clearly that RA is able to induce apoptosis in RPMI 8226 cells. Typical morphological and biochemical characteristics of apoptosis (Arends and Wyllie, 1991) were observed. When compared to the inhibition of cell proliferation the kinetic of induction of apoptosis appeared slower. Typical apoptotic cells were detected by MGG and Hoechst staining after four days of RA treatment. However with the more sensitive TUNEL assay DNA cleavage was already observable *in situ* after three days. DNA cleavage has already been demonstrated to occur before chromatin condensation in other models (Falcieri *et al*, 1994). RPMI 8226 cells treated with both RA and Dex failed to show any typical chromatin condensation, whereas DNA breaks were detected by both TUNEL assay and DNA electrophoresis, suggesting that these two phenomena were independently regulated in our cells. It has been reported that morphological changes typical of apoptosis, like chromatin condensation, could be dissociated from internucleosomal cleavage (Oberhammer *et al*, 1993) and the role played by DNA fragmentation in the

apoptotic process is presently controversial (Bortner *et al*, 1995). Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B (Oberhammer *et al*, 1994). We started an immunocytochemical study of the expression of lamin B during apoptosis in our cells. Whereas treatment with RA alone resulted in extensive lamin B degradation concomitant to chromatin condensation, in the presence of RA plus Dex lamin B was only partly dissociated (data not shown).

In RPMI 8226 myeloma cells, the basal level of expression of tTG is negligible and RA treatment induces expression detectable after few hours at the mRNA level (data not shown) and after two days at both the protein and enzymatic activity levels (fig. 8 and 9). The control of expression of tTG by RA is well documented in other human and animal models (Aeschlimann and Paulsson, 1994), where it appears to be transcriptional (Chiocca *et al*, 1988). Conflicting data have been reported about the type of RA receptors involved in this control (Zhang *et al*, 1995 ; Boehm *et al*, 1995). Whereas a retinoid response element has been identified within the mouse tTG gene promoter (Nagy *et al*, 1996), such a responsive element has not yet been found in the human promoter sequence (Lu *et al*, 1995). tTG is a Ca⁺⁺-dependent enzyme catalyzing the formation of ϵ (γ -glutamyl) lysine cross-links between polypeptide chains (Folk, 1980) and could play a role in apoptosis by cross-linking cellular proteins and preventing the release of intracellular macromolecules (Fesus *et al*, 1987). Our observation that this enzyme accumulates in apoptotic bodies is in agreement with previous observations suggesting that this enzyme could participate in their formation (Fesus *et al*, 1987). Overexpression of tTG in human neuroblastoma cells renders these cells highly susceptible to apoptosis suggesting a direct effect of tTG in the phenotypic maturation process leading to apoptosis (Melino *et al*, 1994). Interestingly, in our experiments, Dex inhibited the RA-dependent induction of tTG expression and of some of the morphological hallmarks of apoptosis (namely the apoptotic bodies), reinforcing the hypothesis that a functional link exists between the two phenomenons. The ability of tTG to play an effector role in the apoptotic program depends on the cellular context (Piacentini, 1995). In our RPMI 8226 cells as in HL-60 leukemia cells, both tTG expression and apoptosis are induced following RA treatment (Nagy *et al*, 1995 ; Boehm *et al*, 1995), whereas in other cellular models, like NB-4 human acute promyelocytic leukemia cells, RA-dependent tTG induction may be observed without any occurrence of apoptosis (Benedetti *et al*, 1996). tTG regulation in apoptosis probably requires cooperation with other effector agents, which may be differentially expressed and controlled according to the cell type studied.

A growing attention is focused on apoptosis in multiple myeloma. It has been recently shown that apoptosis could be elicited in certain myeloma cell lines by various culture conditions,

including serum starvation and treatment with antimetabolic agents or with glucocorticoids, an effect prevented by interleukin-6, a major myeloma growth factor (Shiao *et al*, 1995 ; Lichtenstein *et al*, 1995 ; Hardin *et al*, 1994). RA was also recently reported to interfere, in long-term culture experiments, with the IL-6 autocrine growth of the two human myeloma cell lines U266 and RPMI 8226, via induction of apoptosis (Levy *et al*, 1996). Beyond this cross-talk with the IL-6 pathway we are trying now to define how RA can interact with the expression of various elements of the complex network of cell death regulators (Hoffman and Liebermann, 1994 ; Korsmeyer, 1995).

Finally, RPMI 8226 cells afford a good model to study the differential regulation of the various cytoplasmic and nuclear events occurring during apoptosis. A better understanding of the effects of RA in myeloma cells and of their interference with the effects of the drugs already used in myeloma therapy is clearly required since the therapeutic potential of RA, alone or in combined therapy, is currently evaluated in patients (Musto *et al*, 1995).

MATERIALS AND METHODS

Reagents

RA, Dex (both from Sigma, St Louis, MO, USA) and RU486 (Roussel Uclaf, Romainville, France) were dissolved in absolute ethanol at 10^{-2} M stock concentration and stored at -20°C in the dark. The final ethanol concentration in culture medium was below 0.01%. Camptothecin (Sigma) was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a initial stock concentration of 3.10^{-3} M and stored at -20°C in the dark.

Cell lines and cell culture

RPMI 8226 cells (human myeloma, CCL-155 American Type Culture Collection, USA) (Moore and Kitamura, 1968 ; Moore *et al*, 1982) and S49.1 cells (mouse lymphoma, TIB-28 ATCC, USA) were maintained as suspension cultures in RPMI or DMEM complete media, supplemented with Glutamax I, 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 100U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (all from Gibco-BRL, Paisley, Scotland). Cells were maintained in logarithmic growth at a cell density of about 5.10^5 cells/ml. Cells mean doubling time was around 48 hours.

Cells in logarithmic phase were resuspended in culture medium (RPMI 1640 containing Glutamax I, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferrin, 5 ng/ml sodium selenite (Sigma) and supplemented with 5% FCS) at a density of 3.10^5 cells/ml into culture flasks protected from light. Cells were treated with 10^{-6} M RA, $0.5.10^{-5}$ M Dex, 2.10^{-6} M RU486, alone or combined, or with vehicle only. After 48 hours of contact, the medium was adjusted to 10% FCS and cells were diluted daily to maintain a concentration of 5.10^5 cells/ml for 6 days.

Proliferation assays

[^3H] thymidine incorporation assay: After 48 hours treatment, 0.25 ml cell samples (2.10^5 cells/ml) resuspended in complete medium were distributed in 24 wells-plates. [^3H] thymidine (20

Ci/mmol, Amersham, UK) was then added at 1 μ Ci/well for 3 hours. Cells were washed twice with ice cold Earle's medium (Gibco-BRL) and incubated overnight at 4°C with 50 μ l of lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA). 1N NaOH was added to the lysate. Incubation proceeded for 1h at 4°C then the lysate was neutralized by 50 μ l HCl. Proteins and DNA were precipitated by 5% TCA (4°C, 30 min) and collected over a GF/C (Whatman, Paris, France) glass fiber filter. Thymidine incorporation was assayed by scintillation counting of the GF/C filters (average thymidine incorporation in untreated cells was usually 8,600 cpm/well).

Ki-67 detection by indirect immunocytochemistry: Percentage of Ki-67 positive cells was evaluated after 2 to 5 days of treatment. Cells spread on glass slides were washed 3 times with 1X PBS, fixed by cold-acetone (buffered at pH 7.6) and by absolute cold-acetone (each for 2 min at -20°C). After drying for 10 min at room temperature, cells were fixed again with 4% paraformaldehyde (Merck) in 1X PBS for 2 min, permeabilized in 0.1% Triton X100 in 1X PBS for 5 min and then incubated with reagents diluted in 1X PBS-3% BSA. Cells were labeled with successive layers of mouse monoclonal IgG anti-Ki-67 (MIB 1, Immunotech, Marseille, France) and avidin/biotinylated enzyme complex (Vectastain Elite-ABC Peroxidase kit, Vector laboratories, INC, USA). DAB (Sigma) was used as the peroxidase substrate. Cells were stained with diluted Giemsa.

Morphological studies

Cell viability was determined using the trypan blue exclusion test. Cells were counted with a Malassez hemocytometer over the 6 days treatment (living and apoptotic cells excluded trypan blue).

After the appropriate time of treatment, 10^5 cells were centrifuged on glass slides (Cytospin 3, Shandon, Cergy Pontoise, France), air-dried for at least 2h and stored at -20°C. Cells were stained with MGG. DNA staining with Hoechst 33258 [Bis (benzidine)] (Sigma) was performed as described by Galli and Fratelli (1993). Briefly, cells were fixed by Carnoy solution (methanol : acetic acid, 3:1, v/v), stained with Hoechst 33258 (0.1 μ g/ml in 1X PBS for 10 min at 37°C), washed with tap water for 5 min, air-dried and mounted with DABCO-glycerol (1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane, Aldrich, Milwaukee, WI, USA). Cells were observed using a Olympus BH fluorescence microscope (excitation wavelength: 365 nm). The number of apoptotic cells was determined after counting at least 2000 cells.

Apoptotic cells were identified upon the following morphological features (Arends and Wyllie, 1991): cells displaying chromatin condensation, nuclear disintegration, vacuole formation and membrane blebbing were identified as apoptotic. By contrast, cells with cytoplasmic swelling, membrane disruption and disappearance of nuclear chromatin or distribution of the nuclear chromatin in small ill-defined particles, could be early classified as lysed.

DNA analysis by gel electrophoresis

DNA from apoptotic cells was prepared according to Bellomo *et al* (1992). Briefly, at indicated times, 2.10^7 cells were harvested in 1X PBS and resuspended in 600 μ l of ice-cold lysis buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 10m M EDTA, 1% Triton X100). Lysates were first incubated for 30 min at 4°C then incubated with 100 μ g/ml proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) for 1 hour at 50°C, with 100 μ g/ml RNase A-DNase free (Boehringer Mannheim) for 1 hour at 50 °C. Finally samples were treated overnight at 37°C with 100 μ g/ml proteinase K and 5% sarcosyl. DNA was extracted twice by 500 μ l phenol/chloroforme 1:1 (v/v) (Appligene, Illkirch, France), and once with chloroform/isoamyl alcohol 24:1 (v/v) and precipitated with ethanol. DNA fragmentation was estimated by electrophoresis on a 1.8% agarose gel.

Quantification of DNA fragmentation

Solubilized DNA was quantified by the diphenylamine assay as described by Bansal *et al* (1991). Treated and untreated cells (2.10^7) were harvested, washed at 4°C in 1X PBS and lysed for 30 min at 4°C in 5 mM Tris/HCl pH 8.0, 20 mM EDTA buffer containing 0.5% Triton

X100. Lysates were centrifuged at 27,000g for 20 min to separate low molecular weight DNA (supernatant) from intact chromatin (pellet). Pellet and supernatants were resuspended in 500µl of lysis buffer supplemented with 2 mg/ml BSA. After adding 1 ml 10% trichloroacetic acid (TCA), and incubation for 20 min at 4°C, samples were centrifuged for 5 min at 10,000g. Pellets were resuspended in 1 ml 100% ethanol at 4°C and incubated overnight at -20°C. After centrifugation at 18,000g for 30 min, RNA was hydrolysed in 1N NaOH at 37°C for 1 hour. Reaction mixtures were incubated for 15 min on ice, brought to 10% TCA (30 min at 4°C) and centrifuged at 4°C for 10 min at 8,000g. Pellets were resuspended in 1ml of 5% perchloric acid for 15 min at 90°C and frequently mixed. Samples were centrifuged for 20 min at 900g at 4°C and supernatants were treated overnight at 37°C with 2 ml Burton's reagent (Burton, 1956). OD₆₀₀ of each sample was assayed and the DNA amount found in supernatants was expressed as the percentage of total DNA from 2.10⁷ cells.

TUNEL technique

In situ nuclear DNA fragmentation was measured according to a method based on 3'OH end labeling of DNA breaks with deoxyuridine terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) (Gavriely *et al*, 1992), with minor modifications. Treated or untreated cells were spread on glass slides, rehydrated with 1X PBS for 5 min, fixed with 1% paraformaldehyde (pH 7.4) (Merck, Darmstadt, Germany) for 15 min at 4°C, and washed twice with 1X PBS. The TUNEL reaction was carried out by incubating cells for 1h at 37°C in a moist chamber with 1 nmol/µl FITC-12-dUTP (Boehringer Mannheim), 25 mM CoCl₂, 25 U/µl TdT (Boehringer Mannheim) and TdT buffer (125 mM Tris-HCl, 1M potassium cacodylate, 1.25 mg/ml BSA, pH 6.6). Cells were then washed twice with ice-cold 1X PBS, stained with Evans blue and mounted with DABCO-glycerol. Fluorescence was observed using the fluorescence microscope.

Tissue transglutaminase

Immunofluorescence staining: Treated or untreated cells were processed on slides as described by Collard *et al* (1992) and incubated with the primary antibody, a specific mouse monoclonal anti-tTG IgG raised against purified guinea pig enzyme (Birckbichler *et al*, 1985) (generously gift from Dr P. Birckbichler, Ardmore, Oklahoma, USA). The secondary antibody was fluorescein-conjugated sheep anti-mouse IgG, used at a dilution of 1/1000 (Biosys, Compiègne, France). Slides were observed using the fluorescence microscope.

Activity assay: tTG activity of cell lysates was assayed by Ca⁺⁺- dependent incorporation of [³H] putrescine into N,N' dimethylated casein (Lorand *et al*, 1972). 1.10⁷ treated or untreated cells were harvested, washed twice with 1X PBS and lysed in ice cold lysis buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.5% Triton X100) for 30 min. 0.2 mg protein were incubated at 30°C for 20 min in a total volume of 100µl containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM CaCl₂, 10 mM β mercaptoethanol, 2 mg/ml N,N' dimethylated casein, 2 µCi [³H] putrescine (30-60 Ci/mmol, Dupont-NEN), 0.2 mM putrescine. Aliquots were spotted on Whatman 3MM filter paper, fixed in 10% TCA and then sequentially washed in 5% TCA, ethanol/acetone (v/v) and acetone. Protein-bound [³H] putrescine was determined by liquid scintillation counting of the filters. Background value was obtained by substitution of 1 mM EGTA for CaCl₂ in the reaction mixture. Enzyme activity was expressed in picomoles of [³H] putrescine incorporated into N,N' dimethylated casein per minute and per milligram of protein. Protein concentration was assayed by the Bradford method (Bradford, 1976) using fraction V Albumin (Boehringer Mannheim) as a standard.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to B. Masselot, M Tual for skillfull technical assistance and to B. Joseph and P. Lefebvre for helpful discussion.

REFERENCES

- Aeschlimann D and Paulsson M (1994) Transglutaminases Protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thrombosis and Haemostasis* 71: 402-415
- Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K and Barlogie B (1992) Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood* 80: 887-890
- Arends MJ and Wyllie AH (1991) Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. of Exp. Pathol.* 32: 223-254
- Bansal N, Houle A and Melnykouch G (1991) Apoptosis: mode of cell death induced in T cell leukemia lines: dexamethasone and other agents. *Faseb J.* 5: 211-216
- Bellomo G, Perotti M, Taddei F, Mirabelli F, Finardi D, Nicotera P and Orrenius S (1992) Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca^{2+} concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res.* 52: 1342-1346
- Benedetti L, Grignani F, Scicchitano BM, Jetten AM, Diverio D, Lo Coco F, Avvisati G, Gambacorti-Passerini C, Adamo S, Levin AA, Pelicci PG and Nervi C (1996) Retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia involves PML-RAR α -mediated increase of type II transglutaminase. *Blood* 87: 1939-1950
- Birckbichler PJ, Upchurch HF, Patterson MK and Conway E (1985) A monoclonal antibody to cellular transglutaminase. *Hybridoma* 4: 179-186
- Boehm MF, Zhang L, Zhi L, McClurg MR, Berger E, Wagoner M, Mais DE, Suto CM, Davies PJA, Heyman RA and Nadzan AM (1995) Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *J. Med. Chem.* 38: 3146-3155
- Bortner CD, Oldenburg NBE and Cidlowski JA (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 5: 21-26
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 :248-254
- Bruno S, Del Bino G, Lassota P, Giaretti W and Darzynkiewicz Z (1992) Inhibitors of proteases prevent endonucleolysis accompanying apoptotic death of HL-60 leukemic cells and normal thymocytes. *Leukemia.* 6: 1113-1120
- Burton K (1956) A study of the conditions of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem. J.* 62: 315-323

- Chen YH, Desai P, Shiao RT, Lavelle D, Haleem A and Chen J (1996) Inhibition of myeloma cell growth by dexamethasone and all-trans retinoic acid : synergy through modulation of interleukine-6 autocrine loop at multiple sites. *Blood* 87: 314-323
- Chiocca EA, Davies PJA and Stein JP (1988) The molecular basis of retinoic acid action. *J. Biol. Chem.* 263: 11584-11589
- Collard JF, Senecal JL and Raymond Y (1992) Redistribution of nuclear lamin A is an early event associated with differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J. Cell Sci.* 101: 657-670
- Falcieri E, Zamai L, Santi S, Cinti C, Gobbi P, Bosco D, Cataldi A, Betts C and Vitale M (1994) The behaviour of nuclear domains in the course of apoptosis. *Histochemistry* 102: 221-231
- Fesus L, Thomazy V and Falus A (1987) Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett.* 224: 104-108
- Folk JE (1980) Transglutaminases. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 517-531
- Galli G and Fratelli M (1993) Activation of apoptosis by serum deprivation in a teratocarcinoma cell line : inhibition by L-acetylcarnitine. *Exp. Cell Res* 204: 54-60
- Gavriely Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501
- Gomi M, Moriwaki K, Katagiri S, Kurata Y and Thompson EB (1990) Glucocorticoid effects on myeloma cells in culture: Correlation of growth inhibition with induction of glucocorticoid receptor messenger RNA.. *Cancer Res.* 50: 1873-1878
- Greipp PR (1992) Advances in the diagnosis and management of myeloma. *Seminars in Hematology* 29: 24-25
- Gudas LJ, Sporn MB and Roberts AB (1994) Cellular biology and biochemistry of retinoids. In *The retinoids : Biology, Chemistry, and Medecine*, in Sporn MB, Roberts AB and Goodman DS, eds. pp. 443-520. 2nd Ed. New York, Raven Press, Ltd
- Hardin J, MacLeod S, Grigorieva I, Chang R, Barlogie B, Xiao H and Epstein J (1994) Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood* 84: 3063-3070
- Hoffman B and Liebermann DA (1994) Molecular controls of apoptosis: differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive and negative modulators. *Oncogene* 9: 1807-1812
- Hofmann C and Eichele G (1994) Retinoids in development. In *The retinoids : Biology, Chemistry, and Medecine*, in Sporn MB, Roberts AB and Goodman DS, eds., pp. 387-442. 2nd Ed. New York, Raven Press, Ltd
- Hong WK and Itri LM (1994) Retinoids and human cancer. In *The retinoids : Biology, Chemistry, and Medecine*, in Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds., pp. 597-630. 2nd Ed. New York, Raven Press, Ltd

- Ishikawa H, Tanaka H, Iwito K, Tanabe O, Asaoku H, Nobuyoshi M, Yamamoto I, Kawano M and Kuramoto A (1990) Effect of glucocorticoids on the biologic activities of myeloma cells: Inhibition of interleukin-1 β osteoclast activating factor-induced bone resorption. *Blood*. 75: 715-720
- Korsmeyer SJ (1995) Regulators of cell death. *Trends in Genetics*. 11: 101-105
- Koskela K, Neva M, Remes K, Pelliniemi TT and Pulkki K (1994) Inhibition of interleukine-6 receptor (IL-6R) secreting human myeloma cell proliferation by all-trans retinoic acid (ATRA) and alpha-interferon (α -IFN). *Blood* 84: 175a(Abstract)
- Leid M, Kastner P and Chambon P (1992) Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *TIBS* 17: 427-433
- Levy Y, Labaume S, Colombel M and Brouet JC (1996) Retinoic acid modulates the in vivo and in vitro growth of IL-6 autocrine human myeloma cell lines via induction of apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* 104: 167-172
- Lichtenstein A, Tu Y, Fady C, Vescio R and Berenson J (1995) Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cellular Immunology* 162: 248-255
- Lorand L, Campbell-Wilkes LK and Cooperstein L (1972) A filter paper assay for transamidating enzymes using radioactive amine substrates. *Anal. Biochem.* 50: 623-631
- Lotan R (1980) Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochem. Biophys. Acta* 605: 33-91.
- Lu S, Saydak M, Gentile V, Stein JP and Davies PJA (1995) Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 270: 9748-9756
- Martin SJ, Bradley JG and Cotter TG (1990) HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* 79: 448-453
- Melino G, Annicchiarico-Petruzzelli M, Piredda L, Candi E, Gentile V, Davies PJA and Piacentini M (1994) Tissue transglutaminase and apoptosis: Sens and antisens transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol. Cell Biol.* 14: 6584-6596
- Moalli PA, Pillay S, Weiner D, Leikin R and Rosen ST (1992) A mechanism of resistance to glucocorticoids in multiple myeloma: Transient expression of a truncated glucocorticoid receptor mRNA. *Blood* 79: 213-222
- Moalli PA, Pillay S, Krett NL and Rosen ST (1993) Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 53: 3877-3879
- Moore GE, Marbell JW, Woods LK, Morgan RT and Semple TU (1982) RPMI 8226, a human myeloma cell line: an update. *Cancer Res.* 33: 126
- Moore GE and Kitamura H (1968) Cell line derived from a patient with myeloma. *New York State J. Med.* 68: 2054-2060
- Musto P, Falcone A, Sajeve MR, D'Arena G, Bonini A and Carotenuto M (1995) All-trans retinoic acid for advanced multiple myeloma. *Blood* 85: 3769-3970

- Nagy L, Saydak M, Shipley N, Lu S, Basilion JP, Yan ZH, Syka P, Chandraratna RAS, Stein JP, Heyman RA and Davies PJA (1996) Identification and characterization of a versatile retinoid response element (retinoic acid receptor response element-retinoid X receptor response element) in the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 271: 4355-4365
- Nagy L, Thomazy VA, Shipley G, Fesus L, Lamph W, Heyman RA, Chandraratna RAS and Davies PJA (1995) Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol. Cell Biol.* 15: 3540-3551
- Oberhammer F, Fritsch G, Schmied M, Pavelka M, Printz D, Purchio T, Lassmann H and Schulte-Hermann R (1993) Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *J Cell Sci.* 104: 317-326
- Oberhammer F, Hochegger K and Froschi G (1994) Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B without activation of cdc2 kinase. *J. Cell Biol.* 126: 827-83
- Ogata A, Nishimoto N, Shima Y, Yoshizaki K and Kishimoto T (1994) Inhibitory effect of all-trans retinoic acid on the growth of freshly isolated myeloma cells via interference with interleukine-6 signal transduction. *Blood* 84: 3040-3046
- Piacentini M (1995) Tissue transglutaminase: A candidate effector element of physiological cell death. In *Apoptosis in Immunology*, in Kroemer G and Martinez A, eds., Springer Ed. pp. 163-175
- Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L and Melino G (1991) The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *Europ. J. Cell Biol.* 54:246-254
- Seignerin D and Guillaud P (1991) L'antigène Ki-67, marqueur du cycle cellulaire et de la prolifération tumorale. *Pathologie Biologie* 39: 1020-1028
- Shiao RT, Miglietta L, Khera SY, Wolfson A and Freter CE (1995) Dexamethasone and suramin inhibit cell proliferation and interleukine-6-mediated immunoglobulin secretion in human lymphoid and multiple myeloma cell lines. *Leukemia and Lymphoma* 17: 485-494
- Sidell N, Taga T, Hirano T, Kishimoto T and Saxon A (1991) Retinoic acid-induced growth inhibition of a human myeloma cell line via down-regulation of IL-6 receptors. *J. Immunol.* 146: 3809-3814.
- Shiao RT, Miglietta L, Khera SY, Wolfson A and Freter CE (1995) Dexamethasone and suramin inhibit cell proliferation and interleukine-6-mediated immunoglobulin secretion in human lymphoid and multiple myeloma cell lines. *Leukemia and Lymphoma* 17: 485-494
- Siegel D, Niesvizky R, Miller WH, Busquets X, Kumar R and Micaeli J (1992) All-trans retinoic (ATRA) and interferon α (IFN α) synergistically inhibit myeloma cell growth and induce retinoic acid receptor α (RAR α) expression. *Blood* 80 suppl:121a(Abstract)
- Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD and Friedman MA (1992) Retinoids in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* 10: 839-864

Taetle R, Dos Santos B, Akamatsu K, Koishihara Y and Ohsugi Y (1995) Effects of all-trans retinoic acid and anti-growth factor receptor antibodies on growth and programmed cell death of human myeloma cells. *Blood* 86: 189a (Abstract)

Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462

Zhang LX, Mills KJ, Dawson MI, Collins SJ and Jetten AM (1995) Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR α -dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J. Biol. Chem.* 270: 6022-6029

3) Discussion et résultats complémentaires :

Nous avons démontré l'inhibition par la Dex des effets antiprolifératif et inducteur de l'apoptose induits par l'ATRA.

Nous avons observé que la Dex seule n'exerce aucun effet sur la croissance des cellules RPMI 8226. Nos données sont en accord avec des travaux préalables montrant que la croissance des cellules RPMI 8226 est insensible aux GC (Gomi *et al*, 1990 ; Chen *et al*, 1996). Cette résistance est attribuée à un mécanisme post-récepteur puisque la présence d'un GR fonctionnel est documenté dans ces cellules (Gomi *et al*, 1990). Ces résultats sont en accord avec nos résultats montrant que la Dex, en dépit de son manque d'effet sur la croissance des cellules RPMI 8226, est capable de moduler l'induction de l'apoptose et de la TGt, dépendantes de l'ATRA, dans ces cellules. Ces réponses sont sûrement médiées par le GR, comme le suggère l'effet inhibiteur du RU486, un antiglycocorticoïde agissant au niveau du récepteur. Très récemment, des travaux ont montré que dans des cellules RPMI 8226 sensibles à la Dex, celle-ci inhibe la croissance cellulaire à basses concentrations et induit l'apoptose à concentrations élevées (micromolaires) (Shiao *et al*, 1995 ; Lichtenstein *et al*, 1995). D'autres travaux ont montré qu'il pouvait exister une synergie entre l'ATRA et la Dex (Siegel *et al*, 1992). Les discordances entre ces résultats peuvent être dues à l'utilisation de différents sous-clones de RPMI 8226. Les GC sont les agents les plus efficaces dans le traitement du myélome, et inhibent la prolifération des cellules myélomateuses isolées à partir de patients atteints de MM (Ishikawa *et al*, 1990). Toutefois, leurs effets sur des lignées cellulaires myélomateuses en culture sont plus variables (Gomi *et al*, 1990 ; Shiao *et al*, 1995 ; Lichtenstein *et al*, 1995 ; Hardin *et al*, 1994 ; Moalli *et al*, 1992). En fait, les cellules myélomateuses deviennent progressivement résistantes aux GC soit en acquérant des mutations dans le GR (Moalli *et al*, 1993) ou, plus probablement, par un mécanisme post-récepteur (Gomi *et al*, 1990). Ce dernier mécanisme pourrait affecter l'expression d'une série de gènes normale-

ment contrôlés par les GC dans les lignées cellulaires sensibles, et expliquerait pourquoi certaines lignées cellulaires présentent des réponses aux traitements par les GC dissociées ou incomplètes.

Nos résultats montrent clairement que l'ATRA est capable d'induire l'apoptose dans les cellules RPMI 8226 (voir chapitre I). De façon surprenante, les cellules RPMI 8226 traitées par l'ATRA et la Dex ne montrent pas de condensation et de fragmentation typique de la chromatine. Par contre, les cassures de l'ADN sont détectées à la fois par la méthode TUNEL et l'électrophorèse de l'ADN. Cela suggère que ces deux phénomènes sont régulés indépendamment dans nos cellules. L'observation des cellules en microscopie électronique (Figure 46) montre qu'une proportion importante des cellules traitées par l'ATRA+Dex présente un noyau non fragmenté contenant une masse d'hétérochromatine condensée ($8,6 \% \pm 2,7$ observé au marquage TUNEL). En comparaison, les cellules traitées par l'ATRA présentent un noyau segmenté en fragments contenant de l'hétérochromatine concentrée et marginalisée au niveau des corps apoptotiques et toujours entourée par l'enveloppe nucléaire. D'autres auteurs ont déjà montré que les changements morphologiques typiques de l'apoptose, comme la condensation de la chromatine, pouvaient être dissociés du clivage internucléosomique de l'ADN (Oberhammer *et al*, 1993). Le rôle joué par la fragmentation de l'ADN dans le processus apoptotique est à présent controversé (Bortner *et al*, 1995).

La condensation de la chromatine pendant l'apoptose est accompagnée par la dégradation des lamines A et B (Oberhammer *et al*, 1994). Nous avons étudié l'expression immunocytochimique de la lamine B dans l'apoptose de nos cellules. Tandis qu'un traitement par l'ATRA seul entraîne une dégradation de la lamine B concomitante à la condensation de la chromatine, en présence d'ATRA+Dex, les lamines sont partiellement dissociées (Figure 47) : on n'observe pas de formation de corps apoptotiques ni de chromatine condensée complètement fragmentée. Le réseau de lamine apparaît beaucoup plus lâche, des trous apparaissent dans la structure. Visiblement ce réseau commence à se dissocier ou à disparaître puis il y a apparemment un blocage de la fragmentation nucléaire. (Notons que dans les cellules traitées par la camptothécine (CAM) pendant 4 heures, on retrouve également des trous dans le réseau de lamine avant la condensation de la chromatine et l'apparition de corps apoptotiques, et à ce stade, on obtient une belle échelle d'ADN).

De plus, la Dex inhibe l'induction de l'expression de la TGt dépendante de l'ATRA et de certaines phases morphologiques de l'apoptose (principalement la formation des corps apoptotiques), renforçant l'hypothèse qu'un lien fonctionnel existe entre ces deux phénomènes. La capacité de la TGt à jouer un rôle effecteur dans le programme apoptotique dépend du contexte cellulaire (Piacentini, 1995). Dans nos cellules RPMI 8226, comme dans les cellules HL-60, la TGt et

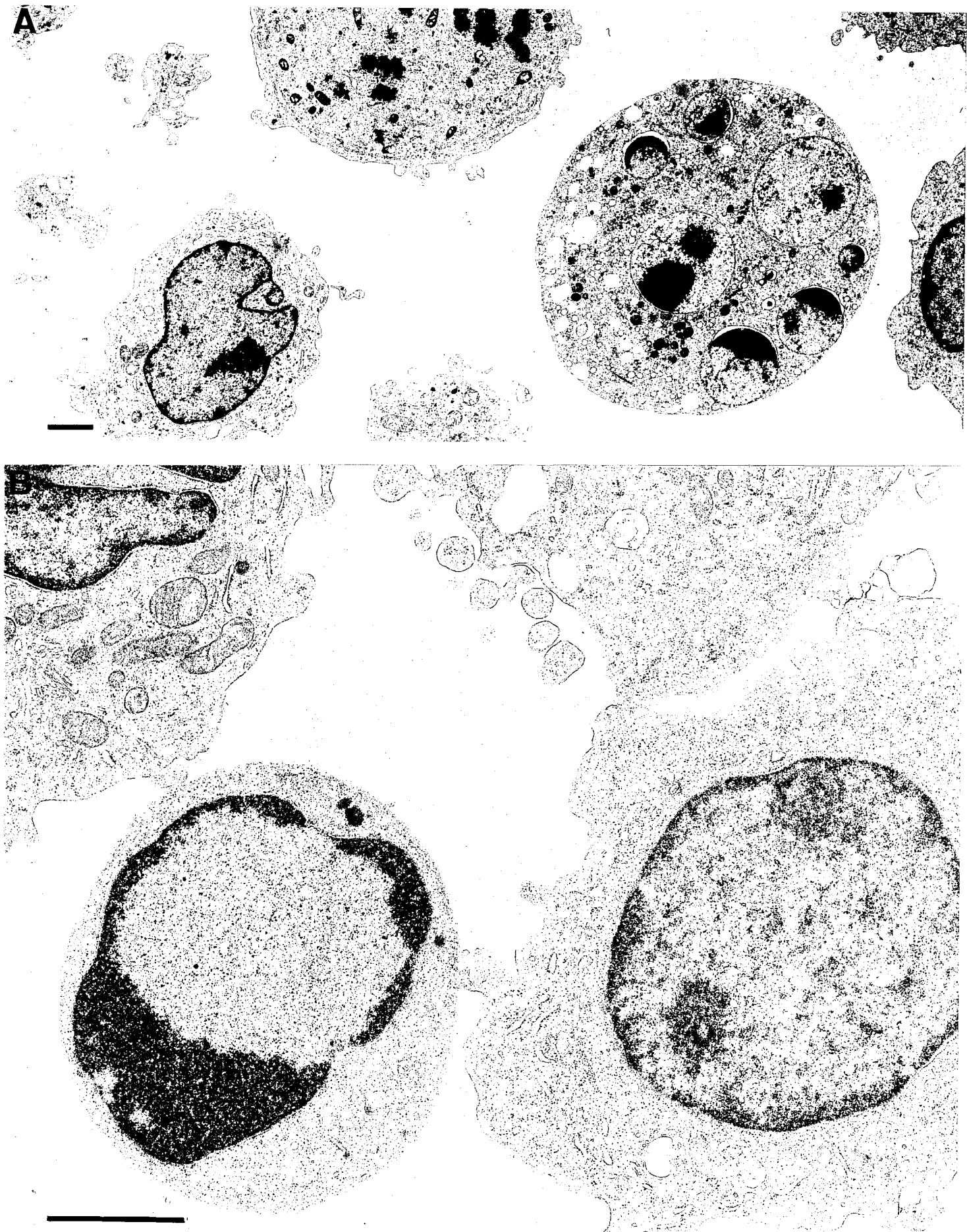


Figure 46: Morphologie des cellules RPMI 8226 après six jours de traitement par l'ATRA (1 μM, A) ou l'association ATRA (1 μM) + Dex (0,5 μM) (B), observée en microscopie électronique (la barre = 2 μm).

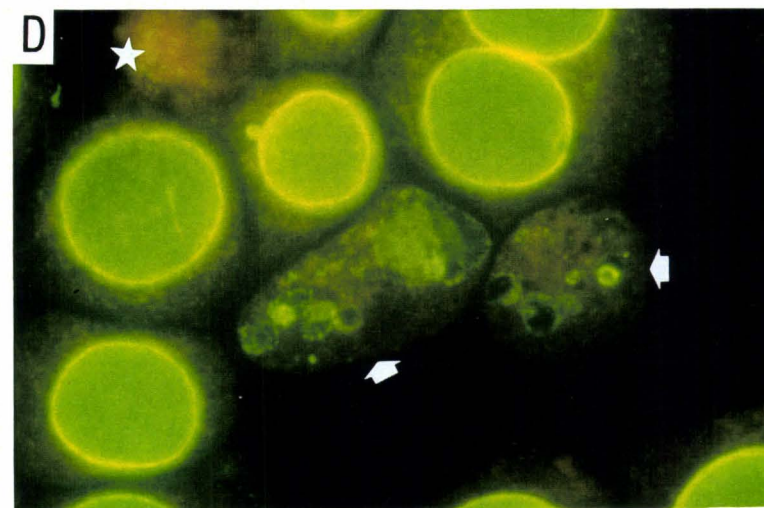
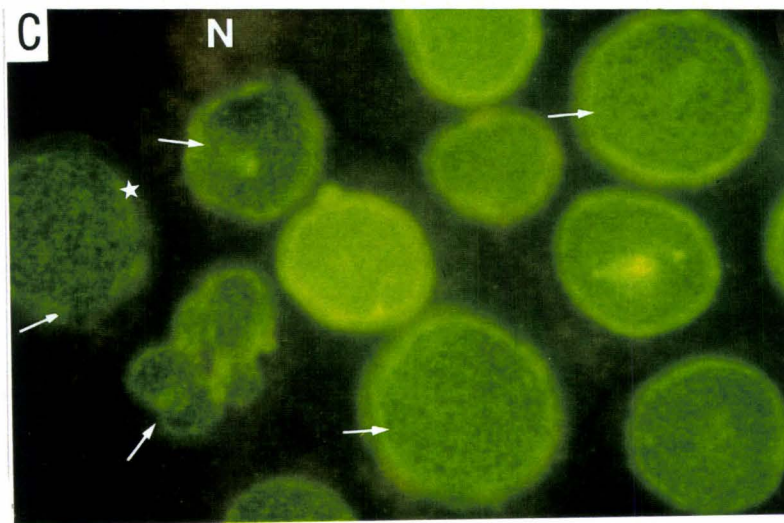
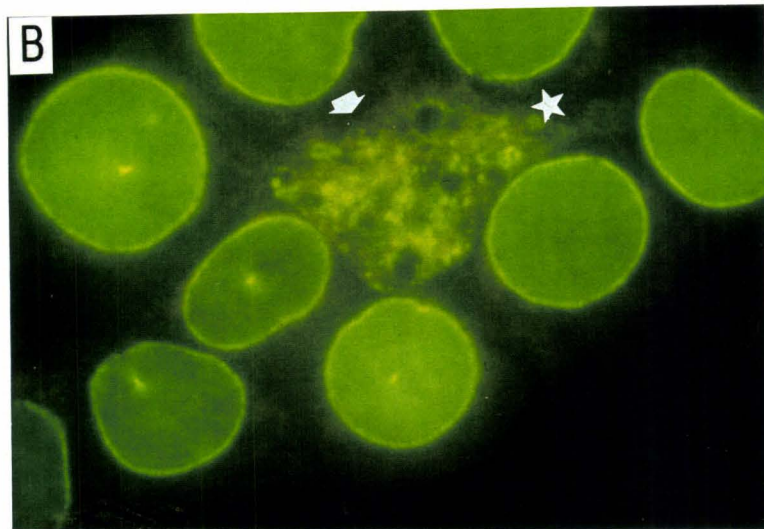
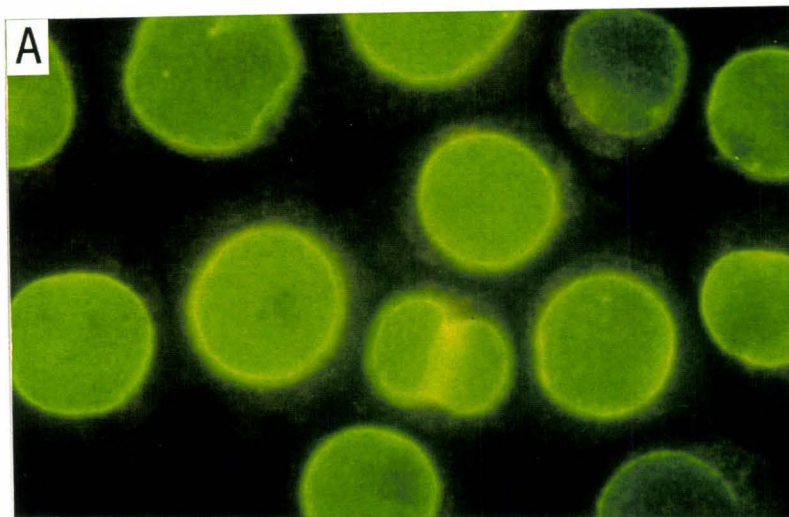


Figure 47 : Détection de la lamine B par IFI dans les cellules RPMI 8226 traitées pendant 6 jours.
 ● cellule apoptotique, ★ corps apoptotique, → cellule avec remaniement partiel de la chromatine. (grossissement x 1000)

	A	B	C	D
ATRA (1 μ M)	-	+	+	+
Dex (0,5 μ M)	-	-	+	+
RU486 (2 μ M)	-	-	-	+

l'apoptose sont tous deux induit après un traitement par l'ATRA (Nagy *et al*, 1995 ; Boehm *et al*, 1995). Dans d'autres modèles cellulaires, comme les cellules NB4 de leucémie aigüe à promyélocytes, l'induction de la TGt dépendante de l'ATRA, serait observée sans que soit induite l'apoptose (Benedetti *et al*, 1996). La régulation de la TGt dans l'apoptose nécessite probablement la coopération avec d'autres agents effecteurs, dont l'expression serait contrôlée de façon différentielle et selon le type cellulaire étudié.

4) Caractérisation de marqueurs apoptotiques

Nous avons également étudié les effets de la dexaméthasone sur l'expression d'autres marqueurs et relais moléculaires de l'apoptose (Tableau VII). Ni le remaniement des phospholipides membranaires, ni la translocation de la PKC δ , ni la diminution de l'expression de Bcl-2, observés après traitement par l'ATRA seul, ne sont modulés par l'association de la Dex à l'ATRA.

Tableau VII : Apoptose induite par l'ATRA et l'associations ATRA + Dex.
C : cytoplasmique, T : translocation au noyau.

	MORPHOTYPE			MARQUEURS				
	MGG	Hoechst	TUNEL	Lamine B	TGt	Annexine V	PKC δ	Bcl-2
Contrôle	-	-	-	+	-	-	C	+
ATRA	TYPIQUE			+	+	+	T	-
ATRA + Dex	PARTIEL			+/-	-	+	T	-

5) Conclusion

En conclusion, nous avons étudié les effets de l'association ATRA+Dex sur l'apoptose, à la fois au niveau morphologique et au niveau d'un certain nombre de marqueurs spécifiques. Avec l'ATRA on obtient une apoptose typique. Par contre l'association ATRA+Dex entraîne l'apparition d'une inhibition quantitative de l'apoptose ainsi qu'une morphologie partielle, caractérisée par l'observation d'une chromatine partiellement condensée et fragmentée et une inhibition de la formation des corps apoptotiques. Au niveau des marqueurs, la situation est hétérogène : pour certains, la situation est identique à celle provoquée par l'ATRA (annexine V, Bcl-2). Pour d'autres, les événements se déroulent différemment. C'est le cas de la lamine B où on a vraisemblablement un blocage après un début de dissociation ou de protéolyse. C'est aussi le cas de la TGt où on a une inhibition drastique de l'expression. Il se pourrait donc qu'il y ait plusieurs sous-programmes dans l'apoptose, dont une partie serait inhibée par la Dex dans notre modèle.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de notre thèse montrent clairement que l'ATRA inhibe la prolifération et induit l'apoptose dans les cellules myélomateuses humaines RPMI 8226 et U266. L'effet antiprolifératif est l'effet majeur. L'effet d'induction de l'apoptose est indiscutable mais ne dépasse jamais 20% des cellules. L'importance quantitative de l'apoptose est sans doute sous-estimée car il y a phagocytose par les cellules voisines. Ces effets n'ont pas été retrouvés dans les cellules fraîches issues de patients atteints de MM (Maschke, 1997). De plus, des études cliniques utilisant l'ATRA seul pour des essais de traitement du MM, même si elles n'ont concerné qu'un nombre limité de malades en phase avancée de la maladie, ont donné des résultats décevants (Facon, 1997). Cela remet donc en question l'utilisation de l'ATRA seul en thérapeutique.

Différentes associations de l'ATRA avec d'autres agents tel que la dexaméthasone ou l'IFN α , qui font partie du traitement de la maladie, ont été testées en raison de l'importance que prennent les traitements combinés dans le MM. Une légère synergie avec l'association ATRA+IFN α a été observée. Par contre, de manière inattendue, il est apparu que les glucocorticoïdes, réputés induire l'apoptose dans d'autres modèles cellulaires, et largement utilisés dans le traitement du MM, s'opposent à l'effet de l'ATRA dans les lignées RPMI 8226 et U266. Ces résultats suscitent plusieurs perspectives intéressantes :

- sur le plan fondamental, ils pourraient servir de base pour une meilleure compréhension du programme apoptotique et de ses sous-programmes. En transfectant des gènes reporter contrôlés par des éléments de réponse à l'ATRA, on pourrait analyser ce mécanisme et savoir comment les gènes contrôlés par l'ATRA sont modulés par la Dex. Les techniques de biologie moléculaire pourraient nous aider à localiser le point d'interférence entre deux voies de signalisation.

- sur le plan médical, il apparaît indispensable de compléter nos résultats pour comprendre ce qui se passe dans les cellules myélomateuses, compte tenu de cet antagonisme inattendu.

Actuellement, d'autres associations de l'ATRA avec des agents, également utilisés dans le MM, suscitent un intérêt considérable. C'est le cas de l'association ATRA + melphalan. Une potentialisation des effets inducteur de l'apoptose avec le Melphalan associé à l'ATRA a été observé dans les cellules provenant de lignées stables et des cellules fraîches issues de patients atteints de MM (Maschke, 1997).

L'utilisation de rétinoïdes sélectifs d'une des classes de récepteurs (le CD367, sélectif des RARs et le CD2425, sélectif des RXRs) ont montré que les effets d'inhibition de la prolifération et d'induction de l'apoptose réclament la mise en jeu de deux classes de récepteurs, les RARs et les RXRs. De plus, un certain équilibre entre leur activation respective est nécessaire pour produire tous ces effets. Des associations utilisant l'ATRA en présence d'un excès de ligand RAR ou RXR ont permis de mettre en évidence des modifications du programme apoptotique

induit par l'ATRA et de préciser l'implication des deux classes de récepteurs dans certaines étapes du déroulement de l'apoptose.

En testant un rétinoïde sélectif de RAR γ , le CD437, nous avons eu la surprise de voir, qu'utilisé seul, il provoque rapidement et de façon massive une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose. Cet effet étant observé dans des cellules dépourvus de RAR γ , il ne passe pas par les RARs. D'autres rétinoïdes peuvent induire l'apoptose sans nécessiter la présence des RARs ou RXRs. C'est le cas du 4-HPR, réputé induire l'apoptose dans les cellules résistantes aux effets de l'ATRA (Formelli et al, 1996). Ainsi, l'utilisation de rétinoïdes, utilisant des mécanismes indépendants de la transactivation par les RARs ou RXRs, présente des perspectives prometteuses pour le traitement du MIM et d'autres cancers et ouvre un nouveau champ d'investigation à la fois au niveau des applications cliniques et de la connaissance des mécanismes produisant l'apoptose.

APPENDICE TECHNIQUE

A. TECHNIQUES DE CULTURE CELLULAIRE

1) Les lignées cellulaires étudiées

Plusieurs lignées cellulaires tumorales ont été utilisées au cours de notre étude, elles sont présentées ci-dessous :

La lignée myélomateuse humaine RPMI 8226 (American Type Culture Collection A.T.C.C. CCL-155) est une lignée cellulaire hématopoïétique humaine établie par G. Moore *et al* en 1968. Les cellules dérivent du sang périphérique d'un homme âgé de 61 ans ; elles produisent et sécrètent la chaîne lambda d'une immunoglobuline.

La lignée myélomateuse humaine U266 (A.T.C.C. TIB-196) a été établie à partir du sang périphérique d'un patient atteint d'un myélome de type IgE (epsilon2, lambda2). Ces cellules sécrètent l'IgE (Nilsson *et al*, 1970).

La lignée myélomateuse humaine L-363 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSM ACC 49) dérive du sang périphérique d'une patiente âgée de 36 ans. Ces cellules ont été décrites comme étant EBNA-négative et exprimant l'ARNm du protooncogène bcl-2. (Diehl *et al*, Blut, 1978)

Les cellules S49-1 sont une lignée établie de lymphome de souris (A.T.C.C TIB 28). Elles ont gardé les propriétés des thymocytes, en particulier la sensibilité à la dexaméthasone (Harris A.W. *et al*, 1970)

2) Culture cellulaire

Toutes les cellules sont cultivées en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂ à 37°C et en présence de 100 UI/ml de pénicilline (BIO WHITAKER) et de 100µg/ml de streptomycine (BIO WHITAKER).

Les cellules RPMI 8226, U266 et L363 sont entretenues dans le milieu RPMI 1640 Glutamax I (BIO WHITAKER) contenant 10% de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur (décomplémenté, 30 min à 56°C). Le milieu doit être renouvelé tous les deux jours dès que la

concentration cellulaire atteint 10^6 cellules/ml (valeur maximale), la concentration minimale est de $0,3 \cdot 10^6$ cellules par ml.

Les cellules S49-1 sont maintenues dans du milieu DMEM Glutamax I (BIO WHITAKER) contenant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté. Le milieu doit également être renouvelé tous les deux jours.

3) Test de viabilité

La viabilité des cellules étudiées est appréciée par le test d'exclusion au bleu trypan (0,9% NaCl, 0,4% de bleu trypan dans de l'eau distillée). Cette méthode permet de distinguer les cellules vivantes, en bon état, qui excluent le bleu trypan et restent incolores, des cellules mortes dont la membrane altérée laisse pénétrer le colorant (les cellules en apoptose excluent également le bleu trypan). Ce test, effectué chaque jour de la période d'induction, permet la réalisation d'une numération des cellules vivantes par leur comptage dans une cellule de Malassez et l'obtention de la viabilité (en %). Le nombre de cellules contenues à l'intérieur du quadrillage de la cellule de Malassez, multiplié par 8000 donne le nombre de cellules contenues dans 1 ml de milieu).

4) Traitement des cellules par différents agents : rétinoïdes, glucocorticoïdes, interféron alpha.

Le milieu d'induction employé est un milieu minimum comprenant un milieu RPMI 1640 Glutamax I contenant de la pénicilline, de la streptomycine auquel sont ajoutés $5\mu\text{g/ml}$ d'insuline et de transferrine, 5ng/ml de sélénate de sodium (SIGMA). Du SVF (3 ou 5% final) est ajouté selon le but de l'expérimentation.

L'acide rétinoïque tout trans (SIGMA), l'acide 9-cis rétinoïque (HOFFMANN LA ROCHE) et tous les rétinoïdes de synthèse: CD367, CD437, CD666, CD2425, CD2665 (CIRD-GALDERMA) se trouvent en solution à 10^{-2}M dans du DMSO ; ils sont stockés à l'obscurité à -20°C . L'induction se fait à l'abri de la lumière (les cultures cellulaires sont enveloppées dans du papier aluminium pendant toute la durée du traitement). La dexaméthasone (DEX, SIGMA) et le RU486 (ROUSSEL UCLAF) sont également en solution à 10^{-2}M , la camptothécine (CAM, SIGMA) est diluée à $3 \cdot 10^{-3}\text{M}$ dans du DMSO (MERCK) à l'abri de la lumière. Le stockage des solutions se fait à -20°C . Les dilutions sont effectuées dans l'éthanol, sa concentration finale n'excédant pas 1 pour 1000 dans la culture. L'interféron alpha (Roferon A, ROCHE) est stocké à 4°C . Les cellules témoins (non traitées) contiennent toujours la quantité de solvant équivalente à celle employée pour les autres cultures.

B. ETUDE DE LA PROLIFERATION

1) Etude du cycle cellulaire après marquage par l'iodure de propidium

Le marquage de l'ADN par l'iodure de propidium (IP), un fluorochrome qui s'intercale au niveau des acides nucléiques permet l'analyse du contenu en ADN après la digestion des ARNm par la RNase. La quantité d'IP fixée par chaque cellule et par conséquent la fluorescence émise est proportionnelle au contenu en ADN (les résultats, mesurés en cytométrie de flux, apparaissent sous forme d'un histogramme monoparamétrique, où sont représentés sur l'axe des abscisses l'intensité de fluorescence et sur l'axe des ordonnées le nombre de cellules). On calcule ainsi le nombre de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (le calcul de la répartition des cellules dans le cycle fait appel à des modèles mathématiques basés sur le contenu en ADN d'une cellule qui dépend de sa position dans le cycle cellulaire).

Ploïdie des cellules	Phase du cycle cellulaire
moins de 2n chromosomes	cellules en apoptose
2n chromosomes	G1 ou G0
entre 2n et 4n	S ou M
4n chromosomes	G2M

NB : les cellules polyploïdes *au départ* peuvent présenter le même profil que des cellules en sub-G2 (Darzynkiewicz *et al*, 1996).

Après traitement, 10^6 cellules sont récupérées par centrifugation à 1000g pendant 10 min, lavées trois fois par du PBS puis fixées par 1ml d'une solution de paraformaldéhyde (PAF) à 0,25% dans du PBS. L'incubation dure 15 min à l'obscurité et à température ambiante. Elles sont ensuite centrifugées à 1000g pendant 5 min (toutes les centrifugations qui suivront se feront dans les mêmes conditions) et lavées trois fois par du PBS. 1ml de méthanol à 70% est alors ajouté au culot cellulaire. L'incubation dure 1h dans la glace. Après centrifugation et lavage par 3ml de PBS, 500µl de la solution d'IP (IP 50µg/ml, triton X100 0,1%, RNase 50µg/ml dans du PBS) sont ajoutés au culot cellulaire, l'incubation dure 1h à l'obscurité et à température ambiante. Les cellules sont alors centrifugées et lavées deux fois par 3ml d'une solution de PBS que l'on a ajustée à 4% de SVF. Une dernière centrifugation permet la récupération finale des cellules auxquelles on ajoute 100µl de fixateur COULTER. Les échantillons sont traités en triple exemplaire. La fluorescence est mesurée par un cytofluoromètre Epics Profile, COULTER.

2) Marquage des cellules par l'anticorps monoclonal Ki-67

L'antigène Ki-67, présent uniquement dans le noyau des cellules en cycle et non dans les cellules quiescentes, est détecté par immunocytochimie à l'aide d'un anticorps monoclonal (souris) anti-Ki-67, révélé par un anticorps de cheval anti-lapin biotinylé (fixant la streptavidine couplée à la peroxydase). Après traitement des cellules par l'AR $10^{-6}M$ pendant trois jours, 150 000 cellules sont cytocentrifugées pendant 10 min à 600 g et lavées par du PBS pendant 5 min. La technique ABC peroxydase (coffret réactif : VECTASTAIN Elite-ABC kit référence f PK 6102, VECTOR) est utilisée.

Les cellules sont fixées successivement par :

- de l'acétone tamponnée à pH 7,6 (2 min à $-20^{\circ}C$),
- de l'acétone pure (2 min à $-20^{\circ}C$), et après séchage à l'air pendant 10 min,
- une solution de paraformaldéhyde à 4% (2 min).

Elles sont ensuite perméabilisées pendant 5 min par 100 μ l d'une solution de triton X100 à 0,1% et lavées trois fois par du PBS (deux fois 2 min puis une fois 10 min). Elles sont alors incubées pendant 20 min en présence de 50 μ l de sérum de cheval dilué au 1/66 dans du tampon PBS puis, 30 min, avec 50 μ l d'anticorps monoclonal anti-Ki-67 (MIB-1 de IMMUNOTECH) dilué au 1/50 dans un tampon PBS auquel on a ajouté 10% de sérum de cheval. Après un lavage de 10 min par du PBS, elles sont incubées pendant 30 min avec 50 μ l d'anticorps biotinylé anti-lapin fabriqué chez le cheval (dilution au 1/200 dans PBS + 2% de sérum de cheval). Afin d'inhiber la peroxydase endogène, les lames sont trempées durant 30 min dans du méthanol absolu contenant 0,3% d' H_2O_2 à 30% puis lavées deux fois pendant 10 min par du PBS. Elles sont alors recouvertes, pendant 30 min, avec 100 μ l de complexe ABC, préalablement préparé selon la méthode du kit ABC et contenant l'avidine ainsi que le complexe biotine-peroxydase. Après un lavage de 10 min par du PBS et un contact de 7 min à l'abri de la lumière avec la solution DAB (diaminobenzidine) (SIGMA) [contenant 10 ml de solution A à pH 7,4 (10 mg de DAB dissous dans 10 ml de tampon Tris 0,1M, 7 mg d'imidazole) et 10 ml de solution B (30 μ l d' H_2O_2 à 30% dans 100 ml d'eau distillée)], les cellules sont rincées pendant 10 min par du PBS et séchées. Une contre-coloration au Giemsa dilué au 1/20 à pH 7 est effectuée. Après séchage, le montage se fait en Eukitt.

3) Test d'incorporation de la thymidine tritiée

La réaction est basée sur l'incorporation d'un précurseur radioactif, la thymidine [3H], dans l'ADN des cellules lors de la division cellulaire. La précipitation sur filtre de l'ADN par

l'acide trichloroacétique (TCA) est suivie par le comptage de la radioactivité du filtre qui permet d'évaluer le pourcentage des cellules en phase S.

Les cellules myélomateuses sont traitées pendant 48h avec l'AR 10^{-6} M dans le milieu d'induction (précédemment décrit), récupérées et centrifugées à 600 g pendant 10 min.

Elles sont réparties ($0,8 \cdot 10^6$ par ml dans le milieu RPMI 1640 + SVF 10%) dans des plaques à 24 puits (10^5 /puits). Elles sont incubées pendant 3h en présence de $1\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]T (AMERSHAM ; activité spécifique : 20,0 Ci/mmol). La solution mère de [^3H]T est diluée à $2\mu\text{Ci/ml}$ dans du milieu de Earle (GIBCO). Les échantillons sont préparés en triples exemplaires. Des témoins non marqués sont prévus. Après récupération, les cellules sont centrifugées à 800g pendant 10 min et lavées par la solution de Earle. $50\mu\text{l}$ de tampon de lyse (Tris 20mM, NaCl 100mM, EDTA 10mM ; pH7,4) sont ajoutés au culot cellulaire, l'incubation dure une nuit à 4°C . Après addition de 1ml de soude 1M, 1h à 4°C , une neutralisation par $50\mu\text{l}$ d'acide chlorhydrique concentré est effectuée. Les protéines et l'ADN sont alors précipités par une solution aqueuse de TCA à 10% pendant 30 min à 4°C . Le mélange obtenu est déposé sur filtre GF/C (WHATMAN). Après rinçage à 4°C par 2 ml de TCA 5% puis par de l'éthanol absolu, les filtres sont séchés et transférés dans des pots contenant du liquide de scintillation (J.T. BAKER). Le comptage est effectué par un compteur LKB. Le pourcentage d'incorporation est calculé par référence à l'incorporation des cellules non traitées.

4) Détection de la p21 par immunofluorescence indirecte

Les cellules sont traitées par l'AR 10^{-6} M pendant trois jours puis préparées pour l'immunofluorescence avec amplification (voir technique d'immunomarquage). La protéine p21 est reconnue par un anticorps monoclonal de souris Clone 24420 anti-CIP1(WAF1), TRANSDUCTION LABORATORIES, Mab C24420, dilué au 1/1000 et révélé par un anticorps polyclonal biotinylé anti-souris dilué au 1/400, (cf chapitre Immunomarquage).

C. ETUDE DE L'APOPTOSE

1) Etude de la morphologie

a) Coloration des cellules par le MGG

150 000 cellules sont cytocentrifugées sur lame de verre à 400g pendant 10 min puis fixées par le méthanol pendant 4 min. La coloration s'effectue par incubation des lames dans les solutions suivantes : May-Grünwald pur pendant 4 min, May-Grünwald dilué au 1/3 dans du

PBS pendant 4 min, Giemsa dilué au 1/10 ème pendant 10 min et enfin deux rinçages à l'eau distillée pendant 4 min. Le montage se fait en Eukitt. L'observation s'effectue en lumière blanche.

b) Coloration des cellules par le Hoechst 33258

Le Hoechst 33258 [Bis(benzimide) ; SIGMA, ref. B2883] est un agent qui s'intercale dans l'ADN des cellules et permet la visualisation des noyaux et en particulier de la chromatine.

Les cellules sont préalablement traitées par l'AR 10^{-6} M pendant 5 ou 6 jours. 150 000 cellules sont cyto centrifugées pendant 10 min à 400g sur lame de verre et lavées par du PBS. Elles sont fixées pendant 10 min à -20°C dans la solution de Carnoy (méthanol/acide acétique : 3v/1v) et colorées 10 min à 37°C par dépôt sur les cellules de 60 μl de Hoechst 33258 à 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dans le PBS. Après deux lavages de 10 min par de l'eau distillée, les lames sont séchées. Le montage des lamelles s'effectue par une solution contenant 80% de glycérol, 20% de PBS, 100mg/ml de DABCO [1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane] (ALDRICH), 0,1% d'azide de sodium. L'observation se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence (OLYMPUS-BH2). La longueur d'onde d'émission est de 365nm. On détermine ainsi le nombre de cellules fragmentées pour 100 cellules totales (moyenne de 4 comptages de 400 cellules).

c) Technique TUNEL

La fragmentation de l'ADN *in situ* est détectée selon la méthode du TUNEL (Gavrieli *et al*, 1992, TdT-dUTP Nick End Labeling). Elle est basée sur l'addition aux extrémités 3'OH des cassures de l'ADN de groupements dUTP marqués à la fluorescéine ou la rhodamine grâce à la terminal déoxynucléotidyl transférase (TdT).

Les cellules traitées ou non sont cyto centrifugées sur lamelle de verre, réhydratées par du PBS pendant 5 min, fixées par une solution de paraformaldéhyde à 1% dans le PBS (pH7,4) (MERCK) pendant 15 min à 4°C et lavées deux fois par du PBS. La réaction TUNEL est effectuée en incubant les cellules pendant 1h à 37°C dans une atmosphère humide avec une solution contenant du triton X100 à 0,1% final, 5 nmol/ml de FITC-12-dUTP (BOEHRINGER MANNHEIM), 2,5 mM de CoCl_2 , 0,125 U/ μl de TdT (BOEHRINGER MANNHEIM) dans du tampon TdT (125 mM de Tris-HCl, 1M de cacodylate de potassium, 1,25 mg/ml de BSA, pH6,6). Les cellules sont alors lavées deux fois par du PBS à 4°C , colorées par du bleu Evans et montées avec du DABCO. La fluorescence est observée en utilisant un microscope à fluorescence.

d) Techniques d'immunomarquage

Principe : Cette méthode utilise un anticorps primaire dirigé contre la protéine recherchée, révéler par un anticorps secondaire couplé à un marqueur :

- soit à un fluorochrome : l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou de rhodamine (TRITC) ou le rouge-texas, dans le cas de techniques d'immunofluorescence indirecte (IFI)
- soit à un enzyme dont la réaction provoque la coloration d'un substrat (la peroxydase et son substrat par exemple), dans le cas de techniques d'immunomarquage.
- Un système amplificateur streptavidine-biotine peut être utilisé par l'emploi d'un anticorps secondaire biotinylé et de la streptavidine couplée avec une des molécules énoncées ci-dessus.

Préparation des cellules : 150.000 cellules sont récupérées par cyto-centrifugation pendant 10 min. à 400g et lavées par du PBS. La réaction se déroule ensuite en plusieurs étapes:

a) **Fixation et perméabilisation** : cette étape est primordiale pour la préservation volumique des cellules. Elle doit être un compromis entre la pénétration de l'anticorps dans les structures cibles et la préservation de l'antigène ainsi que le maintien de l'intégrité de la cellule entière. Deux types de méthodes sont couramment utilisés:

- **Méthode I** (Collard *et al.*, 1992) : la fixation par le méthanol 95% dans le PBS, 5 min à -20°C suivie par l'acétone, 10 min à -20°C est appropriée pour la détection des protéines nucléaires et périmoléculaires en simple marquage. Après trois lavages de 5 min par du PBS, les cellules sont perméabilisées par du tween 80 1% dans le PBS, pendant 5 min à température ambiante.

- **Méthode II** : la fixation par une solution de paraformaldéhyde (PAF) à 1% ou 3% dans le PBS, pH 7,4, pendant 15 min à 4°C est appropriée pour le marquage simple de l'ADN ou le double marquage protéine/ADN. Après un lavage de 5 min dans le PBS à 4°C l'excès de PAF est neutralisé par la glycine à 0,1M à température ambiante (si nécessaire). Les cellules sont perméabilisées par une solution de triton X100 à 0,1% dans le PBS à température ambiante.

b) **Saturation des sites non spécifiques** : après un à trois lavages par le PBS, elle s'effectue par incubation des cellules en présence de sérum provenant de l'animal dont est issu l'anticorps portant le marqueur. Elle dure une nuit à 4°C ou 1h à température ambiante.

c) **Incubation avec l'anticorps primaire** : elle dure 1h à 37°C en atmosphère humide. L'anticorps, soit un monoclonal de souris (MAb), soit un polyclonal de lapin, est dilué dans le PBS contenant 3% de sérumalbumine bovine (BSA). Des témoins où l'anticorps spécifique est

omis (témoin de fluorescence) ainsi que des témoins où il est remplacé par un anticorps primaire non immun, sont soumis au même traitement.

d) Incubation avec l'anticorps secondaire : après 4 lavages de 10 min par du PBS, les cellules sont incubées 1h à 37°C avec l'immunsérum marqué, dilué dans du PBS+3%BSA. Cette incubation est suivie de 4 lavages. On utilise soit une immunoglobuline totale (H+L), soit le fragment F(ab)'2 si la protéine détectée est nucléaire.

e) Amplification : l'anticorps secondaire utilisé est biotinylé, l'incubation dure 1h à 37°C. Après 3 lavages, les cellules sont incubées 30 min à température ambiante avec la streptavidine couplée à un marqueur, diluée dans PBS+3%BSA [Streptavidine FITC : Molecular Probe INC (1µg/ml), Streptavidine Rouge Texas : Vector (1µg/ml)]. Cette incubation est suivie de 3 lavages.

f) Montage : 10µl de solution de DABCO-glycérol permettent le montage des lamelles.

Tableau des anticorps secondaires utilisés.

Marqueur	Produit chez le	Fragment	Caractéristiques	Marque	Dilution
FITC	mouton		anti-lapin IgG (H+L)	Byosis	1/1000
FITC	chèvre	Fab'2	anti-lapin IgG (H+L)	Jackson	1/250
FITC	mouton		anti-souris IgG (H+L)	Biosys	1/1000
FITC	chèvre	Fab'2	anti-souris IgG (H+L)	Jackson	1/400
TRITC	mouton		anti-souris IgG (H+L)	Byosis	1/500
Biotine SP	chèvre		anti-lapin IgG (H+L)	Jackson	1/400
Biotine SP	chèvre	Fab'2	anti-souris IgG (H+L)	Immunotech	1/400

e) Préparation des cellules pour la microscopie électronique

Le pouvoir de résolution du microscope électronique (pouvoir séparateur de 0,1 nm) permet une étude détaillée de l'ultrastructure cellulaire et tissulaire. Cette précision n'a de sens que dans la mesure où la préservation de la morphologie cellulaire et tissulaire atteint presque la perfection. On devra donc recourir à des procédés propres à la préparation des tissus pour cette étude ultrastructurale.

Les étapes de fixation puis d'inclusion dans une résine monomérique permettent l'obtention d'un bloc solide qui permettra d'en effectuer des coupes très fines de tissu ou de

cellules. Dans ces coupes ultrafines, les molécules biologiques sont saturées par des sels de métaux lourds pour les rendre plus visibles : Les différents constituants cellulaires sont révélés avec des degrés de contraste différents selon leur degré d'imprégnation ou de coloration par ces sels.

10 millions de cellules, traitées ou non par les agents utilisés, sont récupérées par centrifugation à 800g pendant 10 min, lavées une fois par du milieu RPMI 1640 puis deux fois par du tampon cacodylate à 0,2M, pH 7,4 (centrifugation à 800g pendant 5 min à 1000g à chaque lavages).

a) Fixation : les cellules sont fixées 15 min à 4°C par 4,5ml de glutaraldéhyde à 1,25% (diluée dans du tampon cacodylate) puis lavées deux fois par une solution de cacodylate. Après addition d'1 ml de BSA 10% sur le culot cellulaire, homogénéisation puis centrifugation pendant 5 min à 1000g, 1 ml de glutaraldéhyde est déposé délicatement sur le culot qui se présente sous forme d'un bloc. L'incubation dure une heure à 4°C. Après élimination de la glutaraldéhyde, le culot est lavé deux fois par du cacodylate.

b) Post-fixation : les blocs de cellules obtenus, coupés au scalpel, sont alors incubés une heure à 4°C dans 2ml d'acide osmique à 1% dans le tampon cacodylate puis lavés trois fois par du cacodylate.

c) Déshydratation : après un lavage à l'eau distillée, les blocs sont placés successivement dans une série de bains d'alcool en concentrations croissantes (15 min dans de l'éthanol à 70%, 15 min dans de l'éthanol à 90-95%, deux fois 15 min dans de l'éthanol absolu et enfin quelques minutes dans l'oxyde de propylène).

d) Imprégnation par la résine et inclusion : les cellules sont imprégnées d'une solution à parties égales d'oxyde de propylène et d'Epon, pendant 1h à température ambiante, puis dans l'Epon pur pendant 60 min. Elles sont alors incluses dans des gélules et placées dans une étuve à 60°C pendant une nuit pour la polymérisation de la résine.

e) Coupe : des coupes semi-fines sont réalisées dans un premier temps pour vérifier la présence de cellules. Puis des coupes ultra fines (60 nm) sont réalisées avec un ultramicrotome (LKB Bromma) puis déposées sur grille de cuivre (HR 25, Cu/Rh 3 mm, 300 mesh).

f) Coloration uranyle-plomb: les coupes sont contrastées sur une solution d'acétate d'uranyle à 5% dans l'eau distillée pendant 10 min à l'abri de la lumière. Les grilles sont rincées à l'eau, séchées à l'étuve puis déposées sur une goutte de citrate de plomb pendant 4min, rincées et séchées. Les grilles sont observées sur un microscope électronique (Zeiss EM 10 CS).

f) Analyse morphologique par la microscopie confocale

Principe : L'un des principes de base du microscope confocal est d'illuminer la préparation avec une source ponctuelle fortement convergente. Elle permet que seuls les points objets situés dans le plan de mise au point (ou de son environnement proche) participent à la réalisation de l'image finale.

Le microscope utilisé est un BIORAD MRC 600 équipé d'un laser Ar-Kr.

La préparation des cellules est la même que celle destinée à l'observation par un microscope à fluorescence classique.

2) Etude de marqueurs de l'apoptose

a) Analyse de la fragmentation de l'ADN

Fragmentation de l'ADN

La méthode que nous avons mise au point s'inspire de plusieurs protocoles (Martin *et al*, 1990, Bansal *et al*, 1991, Valentine et Licciardi, 1992, Bellomo *et al*, 1992).

Induction et récupération des cellules : après traitement par l'AR 10^{-6} M pendant cinq ou six jours, les cellules sont centrifugées à 800g pendant 15 min, lavées par du PBS dépourvu de Ca et Mg (EUROBIO) et aliquotées par 20 millions. Les culots peuvent être stockés à -70°C .

Lyse cellulaire : elle est obtenue en ajoutant aux culots dans 600 μl de tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM pH7,4, EDTA 10 mM, triton X100 1%) dans la glace, 30 min, avec agitations légères intermittentes.

Traitement du lysat cellulaire : il est incubé :

-1 h à 50°C après addition de protéinase K à 100 $\mu\text{g/ml}$ (BOEHRINGER),

-1h à 50°C après addition de RNase 'DNase free' à 100 $\mu\text{g/ml}$ (BOEHRINGER),

-enfin toute une nuit à 37°C avec la protéinase K à 100 $\mu\text{g/ml}$ et du sarcosyl de sodium à 1% final.

Extraction de l'ADN : 2 extractions au phénol-chloroforme (v/v) (APPLIGENE et PROLABO) sont effectuées. Les centrifugations se font à 13 000g pendant 10 min. Les phases aqueuses, contenant l'ADN dépourvues de protéines, sont extraites par un mélange de chloroforme/alcool isoamylique (24v/1v) et recueillies par centrifugation (13 000g, 10 min). L'ADN est alors précipité par addition de 2 volumes d'éthanol absolu et de NaCl (0,3M final) et laissé en incubation trois heures minimum à -70°C . Une centrifugation à 18 000g, pendant 30 min à 4°C , permet l'isolement de l'ADN, suivie de 2 centrifugations à la même vitesse avec

lavages du culot par de l'éthanol à 70% dilué dans du tampon TE (Tris-HCl 10mM, pH7,4, EDTA 1mM). La réhydratation de l'ADN se fait par une solution de TE à pH 8,3 pendant une nuit à 4°C et sous agitation lente.

Electrophorèse sur gel d'agarose : l'ADN est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,8 %, contenant une solution de bromure d'éthidium (0,1µg/ml). On dépose environ 30µg d'ADN par puits, dans une solution de TE contenant un volume de tampon de dépôt (bleu de bromophénol 0,05%, xylène 0,05%, glycérol 8%). La migration est réalisée dans du tampon TAE (Tris-Acétate 40mM pH7,4, EDTA 1mM) à 50 volts pendant 6 à 8h. Un marqueur de taille I DNA/EcoRI/Hind III (PROMEGA) est utilisé (tailles : 21226 , 5100 , 4277 , 3530 , 2027 , 1904 , 1594 et 1330 paires de bases-bp).

Dosage de l'ADN dégradé par la méthode de Burton

Extraction de l'ADN (Bhalla *et al*, 1993) :

Les culots de 20 millions de cellules (obtenus comme précédemment décrit) sont remis en suspension durant 20 min à 4°C dans un tampon de lyse (Tris-HCl 5mM pH8,0, Triton X100 0,5%, EDTA 20mM). Le lysat cellulaire est centrifugé à 27 000g pendant 20 min afin de séparer l'ADN de faible poids moléculaire (dans le surnageant) de la chromatine intacte (dans le culot). Les culots sont remis en suspension dans 500µl de tampon de lyse et 50 µl de séralbumine bovine (SAB 2mg/ml) (BOEHRINGER) leur sont ajoutés ainsi qu'aux surnageants. Après addition de 1ml de solution aqueuse de TCA à 10% et action 20 min à 4°C, les culots sont récupérés par centrifugation à 10 000g pendant 5 min et stockés une nuit dans 1ml d'éthanol absolu à -20°C. Après une centrifugation de 30 min à 18 000g, ils sont traités par 500µl de soude 1M pendant 1h à 37°C afin d'hydrolyser l'ARN. Le mélange est refroidi 15 min dans la glace, incubé 30 min à 4°C dans 1,5 ml de TCA 20% et centrifugé 10 min à 4°C à 8000g. Les culots sont alors remis en suspension et l'ADN est hydrolysé pendant 15 min à 90°C par 1ml d'une solution aqueuse d'acide perchlorique (PCA 0,4N). Ils sont fréquemment agités pour extraire l'ADN du culot et, après élimination des résidus par centrifugation à 900g pendant 20 min à 4°C, le surnageant contenant l'ADN est traité une nuit à 37°C par le réactif de Burton.

Dosage à la diphénylamine (Burton *et al*, 1970) :

Il s'agit d'un dosage colorimétrique qui permet la quantification de l'ADN coloré en bleu (longueur d'onde 600nm). Une gamme étalon (0 à 100µg) est établie avec des quantités connues d'ADN purifié de sperme de saumon. La gamme préparée dans du PCA 0,4N (volume final 1ml) est traitée parallèlement aux échantillons à doser. Le réactif de Burton (0,75g de diphénylamine, 50ml d'acide acétique glacial, 0,75 ml d'acide sulfurique concentré, 0,25 ml d'acétaldéhyde)

colore la solution d'ADN en bleu après réaction. L'absorbance à 600 nm est lue par un spectrophotomètre et la quantification de l'ADN est établie par comparaison avec la gamme étalon.

b) Etude de la transglutaminase tissulaire (TGt)

Mesure de l'activité enzymatique de la TGt :

La réaction est basée sur l'incorporation d'un substrat aminé radioactif, la putrescine tritiée, dans une protéine «accepteur», la caséine. La précipitation, sur filtre, par l'acide trichloroacétique (TCA) de ce complexe marqué par l'isotope est suivie d'une élimination de la radioactivité libre par des lavages successifs et du comptage de la radioactivité du complexe restant sur le filtre.

Réactifs et solutions : tampon TBS (Tris-HCl 20mM pH7,5, NaCl 150mM), solution de lyse TET (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1mM, Triton X100 0,5%), mélange réactionnel [Tris-HCl 20mM pH 7,5 ; CaCl₂ 5 mM, β-mercaptoéthanol 15 mM ; N,N'- diméthylcaséine 2mg/ml ; [³H]-putrescine 2μCi (activité spécifique : 41,05 Ci/mmol) ; putrescine 0,1 mM et dans un volume final de 100μl].

Protocole :

Induction et récupération des cellules : 10 millions de cellules sont traitées pendant 48h par l'AR 10⁻⁶M dans le milieu d'induction à 3% de SVF. Elles sont récupérées par centrifugation pendant 15 min à 800 g et lavées par du tampon TBS (Tris-HCl 20mM pH7,5, NaCl 150mM). Les culots sont stockés à -20°C.

Dosage : pendant la décongélation à température ambiante, 150 μl de solution de lyse TET (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1mM, Triton X100 0,5%) sont ajoutés aux culots cellulaires. Une fois décongelées, les cellules sont transférées immédiatement dans la glace. Une centrifugation pendant 10 min à 16 000g, à 4°C, est réalisée. Les surnageants sont récupérés. Des échantillons de 50 μl sont préparés en double pour le dosage de l'activité enzymatique. Le reste du surnageant est congelé à -20°C pour le dosage des protéines. Deux contrôles négatifs sont préparés en ajoutant 50 μl de solution de lyse au mélange réactif en présence d'un chélateur de calcium, l'EDTA 100mM qui inhibe la réaction enzymatique. Aux échantillons, 0,2 mg de protéine du lysat cellulaire, sont ajoutés 50 μl du mélange réactionnel [Tris-HCl 20mM pH 7,5 ; CaCl₂ 5 mM, β-mercaptoéthanol 15 mM ; N,N'- diméthylcaséine 2mg/ml ; [³H]-putrescine 2μCi (activité spécifique : 41,05 Ci/mmol) ; putrescine 0,1 mM], ceci dans un volume final de 100μl.

La réaction se fait à 30°C pendant 20 min, puis stockage dans la glace. Un volume de 80 µl du mélange réactionnel est déposé sur un filtre de papier Whatman 3MM que l'on plonge aussitôt dans un bain froid de solution aqueuse de TCA à 10%, sous agitation douce, pendant 20 min. Le complexe [³H-putrescine-N,N'-diméthylcaséine] précipite sur le papier filtre. La 3H-putrescine libre est éliminée par lavages successifs, trois fois dans le TCA 5% pendant 5 min à 4°C, une fois dans un mélange éthanol/acétone (1:1 v/v) à 4°C pendant 5 min, une fois dans de l'acétone à 4°C pendant 5 min. Les filtres sont séchés à température ambiante et transférés dans un pot à scintillation puis la radioactivité est mesurée après avoir ajouté 5 ml de liquide à scintillation (J.T. BAKER).

Calcul : les valeurs sont mesurées en soustrayant aux résultats les valeurs de base obtenues à partir des contrôles négatifs et du mélange réactionnel correspondant au bruit de fond. Une unité d'enzyme est définie comme la quantité d'enzyme liant 1 pmol de putrescine à la N,N'-diméthylcaséine/min. L'activité spécifique mesurée est exprimée par mg de protéines cellulaires présentes dans le lysat.

$$\text{activité spécifique (pmol/min/mg)} = \frac{\text{cpm} - \text{cpm blanc}}{r \times 2220 \times AS \times T \times Q}$$

cpm = nombre de cpm obtenu à partir de l'échantillon

cpm blanc = nombre de cpm obtenu à partir du blanc

r = rendement de la putrescine tritiée

2220 dpm = 1 nCi

AS = activité spécifique en Ci/mmol (nCi/pmol)

T = temps réactionnel en minutes

Q = quantité de protéine du lysat cellulaire déposée sur le filtre en mg

Dosage des protéines (méthode de Bradford, 1976)

135µl de l'échantillon dilué au 1/20 sont ajoutés à 2565 µl de réactif colorant (réactif de Coomassie : Bleu de Coomassie G250 15mg, alcool absolu 4,7ml, H₃PO₄ 85% 10ml, H₂O qsp 100ml, filtré sur papier Whatman 3MM) et laissés 5 min à température ambiante. La lecture se fait à 595 nm contre le blanc. Une gamme étalon de séralbumine bovine (BOEHRINGER) de 5 à 200 µg/ml est établie.

Détection de la TGt par IFI

La TGt est reconnue par un anticorps monoclonal (MAb CUB 7402 aimablement fourni par le professeur P.J.Birckbichler, Oklahoma, dilué au 1/300), révélé par IFI avec un anticorps de mouton anti-souris marqué à la fluorescéine (BIOSYS, dilution : 1 :1000). Un anticorps non immun de souris (MoAb CUB 101) est utilisé comme contrôle.

Induction et récupération des cellules : Les cellules, traitées ou non, sont observées après 48h ou 6 jours, fixées par la méthode I et préparées selon les techniques déjà décrites (technique d'immunomarquage).

Analyse des mRNA de TGt par RT-PCR

Induction et récupération des cellules : après traitement par les rétinoïdes pendant 7h, 5 à 10 millions de cellules sont centrifugées à 600g pendant 10 min et lavées par du PBS à 4°C.

Extraction des ARN totaux (selon la méthode RNable): La lyse cellulaire est obtenue par resolubilisation des culots dans 2 ml de RNable (EUROBIO, ref. 018367) et homogénéisation douce. L'extraction est effectuée par addition de 0,1 volume de chloroforme. Après agitation vigoureuse, l'incubation dure 5 min à 4°C. La centrifugation se fait à 12 000g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse supérieure (incolore) obtenue contient exclusivement les ARN que l'on précipite par addition d'un volume d'isopropanol et laisse en incubation pendant 1h à -20°C. Une centrifugation à 12 000g pendant 15 min à 4°C permet l'isolement de l'ARN, suivie d'une centrifugation à la même vitesse avec lavage du culot par de l'éthanol à 70%. Le culot est alors dissous dans 20µl d'eau stérile, aliquoté et conservé à -70°C.

Calcul de la pureté et du rendement de l'extraction: une lecture de l'absorbance (A) à 260nm et 280nm est effectuée sur 4µl d'ARN dilué dans 1ml d'eau. Elle permet de déterminer :

- la pureté de l'échantillon (estimée suffisante si le rapport A260/A280 est compris entre 1,7 et 2).
- le calcul de la concentration d'ARN (sachant qu'à 1 U de DO260 correspondent 40µg d'ARN).

Technique de rétrotranscription (RT) : la réaction de transcription inverse consiste à transcrire inversement un ARNm en ADNc à l'aide d'un enzyme, la transcriptase inverse (reverse transcriptase). Les ARN totaux sont pour cela mis en présence d'oligonucléotides ou 'random primer' (pd(N)₆). Ce sont des hexamères qui se fixent au hasard et qui servent d'amorce à la transcriptase inverse. Celle-ci synthétise l'ADNc en incorporant les dATP, dCTP, dGTP et dTTP (dNTPs).

Réactifs: dNTPs (dATP, dCTP, dGTP,dTTP) (PROMEGA) ; pd(N₆) (PHARMACIA Biotech) ; RNAsin Ribonuclease Inhibitor (39U/μl) (PROMEGA) ; M-MLV Reverse Transcriptase (200 000 U/ml) (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, PROMEGA) ; Tampon 5x (Tris-HCL 250mM pH8,3, KCl 375mM, MgCl₂ 15 mM, dithiothréitol (DTT) 50 mM) (PROMEGA).

Protocole: La réaction de rétrotranscription se réalise à 37°C pendant une heure en réunissant, dans un volume réactionnel de 20μl, 1μg d'ARN totaux (qsp 5μl d'eau distillée) dénaturé à 68°C pendant 5 min, du tampon RT 1x, 20 UI de RNAsin, 5μM de pd(N)₆, 0,5mM de dNTP, 200 U M-MLV RT.

Technique de PCR :

Cette réaction permet d'amplifier de façon spécifique l'ADNc correspondant au transcrit désiré. Elle nécessite des amorces spécifiques qui sont des séquences sens et antisens complémentaires de l'ARNm étudié et un enzyme permettant la polymérisation, la Taq polymérase, qui est résistante à de hautes températures. La réaction PCR comporte trois étapes (dénaturation, hybridation et polymérisation) qui vont constituer un cycle. L'amplification est obtenue au bout de plusieurs cycles.

Matériel : thermocycleur (MG RESEARCH), huile minérale (PERKIN ELMER)

Réactifs : Taq DNA polymérase (5U/μl) (PROMEGA), tampon 10x (Tris-HCl 100mM pH9 à 25°C, KCl 500mM, triton X100 1%) (PROMEGA), dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (PROMEGA), MgCl₂ 25mM (PROMEGA). Les amorces ont été sélectionnées en utilisant la séquence de la TGt II humaine de cellules endothéliales de veine ombilicale, cDNA provenant de la banque EMBL (numéro d'accès : M55153). Les séquences sont localisées dans la région codante de deux exons (Elsässer *et al*, 1993). Une paire d'amorces a été sélectionnée à partir de la séquence du cDNA de l'actine β humaine provenant de la banque EMBL (numéro d'accès : X00351).

Amorces	Localisation	Séquence
TGt	sens	5'-CAGTTCCAGTTCGTGCCATCA-3'
	antisens	5'-ATGCCTGTCTCCTCCTTCTCG-3'
Actine	sens	5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAA-3'
	antisens	5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'
Sonde		
TGt		5'-ATCACCCACACCTACAAATACCCAGAG-3'

Protocole : La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée sur un mélange contenant un aliquot (5µl) de la réaction RT auquel sont ajoutés 20 µl de mix (tampon PCR 1x, 1U Taq DNA polymerase, 0,1mM dNTP, 100ng de chaque amorce (cf tableau ci-dessus). La PCR consiste en une dénaturation préalable des échantillons à 95°C pendant 5 min, d'une série de 25 cycles de réactions de dénaturation pendant 1 min à 95°C, d'hybridation pendant 1 min à 54°C, d'élongation pendant 10 min à 72°C puis d'une réaction d'élongation finale pendant 10 min à 72°C et enfin de l'arrêt de la réaction à 4°C.

Electrophorèse sur gel d'agarose : l'ADN est analysé par séparation sur gel d'agarose à 2%, contenant une solution de bromure d'éthidium (0,1µg/µl). On dépose 10µl de produits de PCR mélangé à une solution de dépôt (bleu de bromophénol 0,025%, glycérol 50%). La migration est réalisée dans du tampon TAE 1X (Tris-Acétate 40mM, EDTA 1mM) à 70V pendant 1h30. Un marqueur de taille, le DNA ladder 100 bp (PROMEGA) est utilisé.

Southern blot : les échantillons sont ensuite transférés par capillarité sur membrane Hybond N' (AMERSHAM), dans une solution aqueuse contenant du NaOH à 0,4M et du NaCl à 0,6M, pendant une nuit, à température ambiante.

Marquage des sondes par la polynucléotide T4 kinase :

100ng de sondes, du tampon kinase 1X (PROMEGA), 1U d'enzyme T4 kinase (PROMEGA) et 20µCi de γ ATP³²P (3000 Ci/mmol) sont incubés pendant 1h à 37°C, la sonde est ensuite dessalée sur chromaspin (CLONTECH) pour éliminer tout le γ ATP non fixé.

Révélation : afin d'éviter une fixation aspécifique de la sonde, les membranes sont soumises à une étape de préhybridation. Lorsque le transfert est terminé, la membrane est neutralisée par du tampon SSC 2X (NaCl 0,3M, citrate de sodium 0,03M, pH ?), préhybridée pendant 6h dans du tampon 5X Denhardt (1 g/l PVP40, 1g/l Ficool 400, 1g/l SAB), 6X SSPE (NaH₂PO₄ 40mM, 2H₂O, NaCl 1M pH7,2, EDTA 6mM, NaOH 50mM, héparine 0,5 mg/ml, SDS 0,1%) à raison de 5µl/cm² et hybridée pendant une nuit dans le même tampon auquel sont ajoutées les sondes marquées au ³²P. Après deux lavages par du tampon SSPE 6X, SDS 0,1% pendant 5 min à température ambiante et 30 min à 60°C respectivement, le blot est exposé à - 80°C sur film Kodak XOMAT AR.

c) Etude d'un marqueur membranaire de l'apoptose par l'annexine V

L'annexine V est une protéine Ca⁺⁺-dépendante se liant aux phospholipides. Elle présente une forte affinité pour la phosphatidyl-sérine (PS) qui se trouve relocalisée du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique dans les cellules en apoptose. L'apparition de PS sur

le feuillet externe de la membrane est utilisée comme marqueur de l'apoptose (Koopman *et al*, 1994). L'annexine couplée à la fluorescéine se fixe sur les PS externes accessibles et détecte les cellules apoptotiques en microscopie à fluorescence.

Détection des cellules apoptotiques par fluorescence

Les cellules sont cytocentrifugées sur lamelle de verre et réhydratées par du PBS pendant 5 min. Elles sont fixées par la PAF 1% (pH7,4) (MERCK), (voir méthode d'immunomarquage). Après plusieurs lavages (une fois pendant 5 min avec du PBS puis une fois pendant 5 min avec la solution B (Hepes 10mM, NaOH pH7,4, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mm, CaCl₂ 1,8mM) elles sont incubées pendant 5 min à température ambiante avec l'annexineV couplée à la FITC (Boehringer Ingelheim, BMS 306F 1/a, 5µg/ml dans la solution B) et lavées deux fois 10 min à température ambiante par du PBS. Le montage se fait au DABCO et l'observation des lames se fait au microscope à fluorescence.

Combinaison de la détection de cellules apoptotiques avec d'autres paramètres

Hoechst/AnnexineV-FITC : après la fixation et la saturation, les cellules sont colorées par le Hoechst 33258 (0,1µg/ml, 10 min à 37°C), lavées deux fois 10 min par le PBS, colorées par l'annexineV et montées après deux lavages.

AnnexineV-FITC/BET : après fixation, les cellules sont colorées simultanément par l'annexine et par le BET, pendant 5 min à température ambiante.

TUNEL/AnnexineV : après marquage par la technique TUNEL, les cellules sont lavées deux fois 5 min par du PBS à 4°C et incubées pendant 5 min à température ambiante dans un solution d'annexineV à 5µg/ml dans la solution B avant le lavage par le PBS.

Sélection des cellules apoptotiques par l'annexineV

Principe: Le tri et l'isolement des cellules apoptotiques portant l'annexine biotinylée se fait par des billes magnétiques couplées à la streptavidine et grâce à un champ magnétique (appareillage PROMEGA). On utilise des billes magnétiques marquées par la streptavidine (Magne-Sphere, Promega, Z.5481) et de l'annexineV biotinylée (Boehringer-Ingelheim, BMS 306 BT).

Induction et récupération des cellules : 10 millions de cellules, traitées ou non, sont récupérées après six jours d'induction par centrifugation à 800g pendant 10 min et deux lavages par du PBS à 4°C.

Séparation des cellules apoptotiques des cellules intactes par les billes magnétiques couplées à l'annexine biotinylée : après addition de 20 µl d'annexine (375 µg/ml) dans un volume

final de 500µl de tampon annexine (HEPES/NaOH 10mM, pH7,4, NaCl 140mM, CaCl₂ 5mM) le culot cellulaire (10⁶ cellules) est homogénéisé et laissé en incubation pendant 20 min, à température ambiante et sous agitation douce. Les billes magnétiques, après rinçage par 500µl de tampon annexine, sont remises en suspension dans 100µl de tampon et sont ajoutés au culot cellulaire. L'incubation dure 1h à 4°C sous agitation. La population de cellules apoptotiques [A+] est alors isolée des cellules [A-] après passage dans un champ magnétique.

d) Etude de la Lamine B

Détection de la lamine B par immunofluorescence indirecte

La lamine B est reconnue par un anticorps polyclonal de lapin caractérisé par Worman et al (Cance *et al*, 1992) et aimablement fourni par le professeur J.P. Courvalin, Paris (Chaudhary et Courvalin, 1993). L'anti-lamine B, dilué au 1/500 est révélé par IFI après amplification.

Les cellules, traitées ou non, sont fixées par la méthode I et préparées selon les techniques déjà décrites (technique d'immunomarquage).

Détection de la dégradation de la lamine B par western blot

Induction et récupération des cellules : Après traitement par l'AR 10⁻⁶M pendant 5 à 6 jours, 10 millions de cellules sont centrifugées à 600g pendant 10 min et lavées deux fois par du PBS. En raison de la difficulté à mettre en évidence les fragments de lamine dégradée par rapport à la protéine intacte, seules les cellules induites par un réactif provoquant une apoptose importante (▲20%) sont traitées directement. Lorsque le réactif provoque un faible taux d'apoptose, les cellules apoptotiques sont sélectionnées par l'annexine biotinylée et traitées isolément du reste des cellules pour être analysées.

Extraction des cellules :

Réactifs et solutions : les inhibiteurs de protéases PMSF 2mM (Phénylméthylsulfonyl fluoride, SIGMA), TPCK 1mM (N-tosyl-L phényalanine chlorométhylkétone, SIGMA), aprotinine 5µg/ml (SIGMA), pepstatine 5µg/ml (SIGMA), leupeptine 20 µg/ml (SIGMA) sont toujours ajoutés aux tampons d'extraction, celles-ci sont effectuées à 4°C.

Protocole : Le culot cellulaire maintenu à 4°C est repris par 100 µl d'un premier tampon d'extraction hypotonique [Tris 10mM pH7,4 contenant 10mM de NaCl, EGTA 5mM, MgCl₂ 5mM, Tween 40 1% (p/v)] (Chaudary et Courvalin et al, 1993) L'incubation dure 10 min à 4°C. Les cellules sont ensuite passées plusieurs fois à travers une seringue de fin calibre (26 G.0,45 x 12, TERUMO) puis centrifugées pendant 15 min à 12 000g pour l'élimination majeure des

protéines de haut poids moléculaire de l'ADN et des constituants insolubles. Ce premier surnageant est gardé dans la glace, le culot est soumis à un 2^{ème} tampon d'extraction [tampon d'extraction 1 auquel sont ajoutés 500mM final de NaCl, 1% désoxycholate de sodium, 0,1% SDS] et laissé 10 min dans la glace après un mélange vigoureux au vortex. L'extrait est alors centrifugé pendant 10 min à 15 000g et à 4°C, le deuxième surnageant et le culot sont gardés à 4°C. Le culot qui contient toutes les protéines demeurant insolubles ainsi que l'ADN, est traité soit par de la DNase (FLANDRE CHIMIE), soit par désintégration sonique (15 s, 40 W, Vibra-Cell, BIOBLOCK).

Dosage des protéines :

La concentration des extraits protéiques est déterminée par une méthode colorimétrique au bleu de Coomassie (Bradford *et al*, 1973) : 1µl d'échantillon dilué au 1/50 par du PBS est ajouté à 950 µl de réactif colorant (15 mg de bleu de Coomassie G250, 4,7ml d'éthanol absolu, 10ml d'H₃PO₄ à 85%, qsp 100ml d'eau, filtré sur papier Whatman 3MM et laissé pendant 5 min à température ambiante). L'absorbance est lue à 595 nm contre le blanc. Une gamme étalon de BSA (BOEHRINGER) de 5µg à 200µg est préalablement établie.

Migration sur gel de polyacrylamide (PAGE-SDS):

La méthode de Laemmli (1970) est utilisée.

Protocole : Les protéines sont analysées par séparation en électrophorèse sur gel SDS-PAGE (poly-acrylamide gel electrophoresis) à 10% (rapport acrylamide/bis : 29:1). 100 à 200 µg d'échantillon, dilué au demi par une solution de dénaturation (Tris-HCl 0,0312M pH 6,8, urée 6M, SDS 4%, β-mercaptoéthanol 10%, bleu de bromophénol 1%) sont dénaturés à 100°C pendant 3 min et déposés sur le gel. La migration effectuée dans le tampon de migration dure 3h à 35mA. Le marqueurs de taille utilisé est BIORAD (PM : 97,4 , 66,2 , 45 , 31 , 21 , 14,4 et 6,5 KDa).

Western Blot et immunorévélation

Les protéines séparées en fonction de leur masse moléculaire sont transférées sur membrane de nitrocellulose par électrotransfert pendant 16h à 20 volts dans un tampon de transfert (Tris 20mM, Glycine 150 mM pH8,3, méthanol 20%). Le bon déroulement du transfert est vérifié par coloration de la membrane au rouge Ponceau S (0,5% Ponceau S, 1% d'acide acétique). La membrane est ensuite décolorée par lavage à l'eau distillée et incubée pendant 1h à 37°C, sous agitation, dans du PBS contenant 5% de lait en poudre. Après un lavage de 10 min par du PBS, la membrane est incubée avec le premier anticorps spécifique (polyclonal de lapin dilué au 1/1000 dans du PBS/lait à 3%) pendant une nuit à 4°C. Une série de cinq lavages de 10

min à température ambiante (2 par du PBS, 2 par du PBS + Tween 20 à 0,1% puis 1 par de PBS) sont effectués. La membrane est alors incubée pendant 1h à 37°C avec le second anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase (SANOFI-PASTEUR, dilué au 1/10 000 dans du PBS/lait à 3%, PASTEUR). Après une série de 5 lavages (comme précédemment décrit) la membrane est placée dans un tampon de CDS 1X (provenant du kit de révélation) pendant 3 min puis séchée grossièrement sur du papier Whatman. La révélation s'effectue en plaçant une feuille de révélation de la peroxydase couplée à la chimioluminescence (BIOMAX de KODAK) sur la membrane et en l'exposant 10 min sur film Kodak XOMAT AR.

e) Etude de la PKC δ

Détection de la PKC δ par immunofluorescence indirecte

La PKC δ est reconnue par un anticorps monoclonal clone 14 MAb (TRANSDUCTION LABORATORIES, Mab C14, dilution 1/200) révélé par un anticorps biotinylé anti-souris produit chez la chèvre après amplification (cf. Immunomarquage). Un anticorps non immun de souris (CUB 11) est utilisé comme contrôle.

Extraction protéique de la PKC δ et étude par western blot

Induction et récupération des cellules : Après traitement par l'AR 10^{-6} M pendant 3 jours, 10 millions de cellules sont centrifugées à 600g pendant 10 min et lavées deux fois par du PBS.

Extraction des cellules :

Réactifs et solutions : les inhibiteurs de protéases PMSF 2mM (SIGMA), TPCK 1mM (SIGMA), aprotinine 5 μ g/ml (SIGMA), pepstatine 5 μ g/ml (SIGMA), leupeptine 20 μ g/ml (SIGMA) sont toujours ajoutés aux tampons d'extraction, celles-ci sont effectuées à 4°C.

Protocole : Le culot cellulaire maintenu à 4°C est repris par 100 μ l d'un tampon d'extraction contenant [Tris 50mM pH7,4 contenant 200mM de NaCl, EGTA 5mM, Tween 40 1% (p/v)]. L'incubation dure 10 min à 4°C. Les cellules sont ensuite passées plusieurs fois à travers une seringue de fin calibre (26 G.0,45 x 12, TERUMO) puis centrifugées pendant 15 min à 12 000g pour l'élimination majeure des protéines de haut poids moléculaire de l'ADN et des constituants insolubles. Les culot sont gardés à 4°C. Le culot est traité soit soumis à une désintégration sonique (15 s, 40 W, Vibra-Cell, BIOBLOCK).

Dosage des protéines et migration sur gel de polyacrylamide (PAGE-SDS): effectués comme décrit précédemment (chapitre III.2.d).

Western Blot et immunorévélation : après transfert et immunoblot, décrits précédemment, la membrane est incubée pendant une nuit à 4°C, avec le premier anticorps spécifique (monoclonal, clone 14 MAb (TRANSDUCTION LABORATORIES) dilué au 1/200 dans du PBS/lait à 3%. Une série de cinq lavages de 10 min à température ambiante (2 par du PBS, 2 par du PBS + Tween 20 à 0,1% puis 1 par de PBS) sont effectués. La membrane est alors incubée pendant 1h à 37°C avec le second anticorps anti-souris couplé à la peroxydase (SANOFI-PASTEUR, dilué au 1/10 000 dans du PBS/lait à 3%, PASTEUR). Les lavages et la révélation sont effectués comme précédemment décrit (détection des lamines, III/2/d.

3) Etude d'un relais de l'apoptose : bcl-2 et gènes apparentés

a) Détection par immunofluorescence indirecte

La protéine Bcl-2 est reconnue par un anticorps monoclonal (Mab Bcl-2-clone AB-1, ONCOGENE SCIENCE, Apoptosis kit,) La détection a été réalisée en double marquage avec le TUNEL.

Les cellules sont fixées par la PAF 3%, traitées par la glycine 0,1M puis par le réactif TUNEL. Elles sont ensuite préincubées en présence de sérum de mouton à 5% dans PBS + BSA 3%, incubées avec l'immunsérum spécifique dilué au 1/200 puis avec l'immunsérum marqué dilué au 1/1000 dans du PBS + 3% BSA.

b) Analyse par cytométrie de flux

La protéine Bcl2 est reconnue par le monoclonal Bcl-2-ONCOPROTEINE/FITC clone24 DAKO. 10^6 cellules sont prélevées lavées deux fois par 3ml de PBS et le culot cellulaire est fixé par la paraformaldéhyde 0,25% pendant 15 min, à l'obscurité, lavé puis incubé dans le méthanol 70% pendant 1h à 4°C. Après deux lavages par 3ml de PBS contenant 4% SVF. Après l'addition de 100µl de fixateur COULTER sont ajoutés au culot, la mesure s'effectue par un cytofluoromètre Epics Profile, COULTER.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbadie C., Kabrun N., Bouali F., Vandebunder B. et Enrietto P. (1993) High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells *in vitro*. *Cell*, 75 : 899-912.
- Aeschlimann D., Paulsson M. (1994). Transglutaminases : Protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thrombosis and Haemostasis* 71 (4) : 402-415.
- Alexanian R., Yap B.S. et Bodey G.P. (1983) Prednisone pulse therapy for refractory myeloma. *Blood*, 62 : 572-577.
- Alexanian R., Dimopoulos M. (1994) The treatment of multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 330 : 484-489.
- Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W. et Yuan J. (1996). Human ICE/CED-3 protease- Nomenclature. *Cell* 87: 171.
- Amati B. et Land H. (1994) Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr Opin. Genet. & Dev.*, 4 : 102-108.
- Amos B. et Lotan R. (1991) Retinoid sensitive cells and cell lines. In Parker L. (ed) *Methods in enzymology : Retinoids*. Academic Press, Orlando, 217-225.
- Ameisen et al, 1995. *Cell Death and Diff*, 2: 285-300.
- Andrews P (1984) Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line *in vitro*. *Dev. Biol.*, 103 : 285-293.
- Anzai N., Kawabata H., Hirama T., Masutani H., Ohmori M., Yoshida Y. et Okuma M. (1994) Marked apoptosis of human myelomonocytic cell line P39: Significance of cellular differentiation. *Leukemia*, 8/3 : 446-453.
- Anzai N., Kawabata H., Hirama T., Masutani, H., Ohmori M., Yoshida Y. et Okuma M. (1994) Marked apoptosis of human myelomonocytic leukemia cell line P39: Significance of cellular differentiation. *Leukemia*, 8/3 : 446-453.
- Apfel C., Bauer F., Crettaz M., Formi L., Kamber M., Kaufman F., Lemotte P., Pirson W. Et Klaus M. (1992) A retinoic acid receptor-alpha antagonist selectively counteracts retinoic acid effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 7129-7133.
- Amett T.R., Lindsay R., Kilb J.M., Moonga B.S., Spowage M. et Dempster D.W. (1996) Selective toxic effects of tamoxifen on osteoclasts: comparison with the effects of oestrogen. *J. Endocrinol.*, 149/3 : 503-508.

- Arends M.J. and Wyllie A.H. (1991) Apoptosis : mechanism and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol* 32 : 223-254.
- Askew D.S., Ashmun R.A., Simmons B.C. et Cleveland J.L. (1991) Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line supresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*, 6 : 1915-1922.
- Atencia R., Garcia-Sanz M., Unda F. et Arechaga J. (1994) Apoptosis during retinoic acid-induced differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, 214 : 663-667.
- Baffy G., Miyashita T., Williamson J.R., Reed J.C. (1993) Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3 dependent hematopoietic cell line is associated with repartioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J. Biol. Chem.*, 268 : 6511-6519.
- Bansal N., Houle A. et Melnykkouych G. (1991). Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. of Exp. Pathol.* 32: 223-254.
- Bhalla K., Ibrado A.M., Tourkina E., Tang C., Mahoney ME., Huang Y. (1993) Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloma leukemia cells. *Leukemia*, 7 : 563.
- Bakhshi A., Jensen J.P., Goldman P., Wright J.J., Mc Bride A.L., Epstein A.L., Korsmeyer S.J. (1985) Cloning the chromosomal break-point of the t(14:18) human lymphomas: Clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*, 41 : 889-906.
- Barlogie B., Smith L., Alexanian R. (1984) Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.*, 310 : 1353.
- Blaner W.S. et Olson J.A. (1994) Retinol and retinoic acid metabolism. *Retinoids : Biology, chemistry*, 229-255.
- Bellomo G., Perotti M., Taddei F., Mirabelli F., Finardi D., Nicotera P. et Orrenius S. (1992). Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca²⁺ concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res.* 52: 1342-1346.
- Benedetti L., Grignani F., Scicchitano B.M., Jteen A.M., Diverio D., Lo-Coco F., Avvisati G., Gambacorti-Passerini C., Adamo S., Levin A.A., Pelicci P.G., Nervi C. (1996) Retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia involves PML-RARalpha-mediated increase of type II transglutaminase. *Blood*, 87/5 : 1939-1950.
- Bettaieb A. et Laurent G. (1997) Apoptose induite par les agents antitumoraux. *Hématologie*, 3 : 146-154.
- Bezwodna W.R., Mansor N., Seymour L. (1993) Combined cytosine arabinoside plus interferon alpha : interferon a potentiates the effects of cytosine arabinoside in HL-60 cells by stimulation of apoptosis. *Int. J. of Oncol.*, 2 : 463-467.
- Binet J.L. et Merle-Béral H. (1996) Apoptosis in blood diseases. *Hematol.Cell Ther.*, 38 : 253-264.

- Boehm M.F., Zhang L., Zhi L., Mc Clug M.R., Berger E., Wagoner M., Mais D.E., Suto C.M., Davies P.J.A., Heyman R.A. et Nadzan A.M. (1995) Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *J. Med. Chem.*, 38 : 3146-3155.
- Borden E.C. et Sondel P.M. (1990) Lymphokines and cytokines as cancer treatment: immunotherapy realized. *Cancer (Phila.)*, 65 : 800-814.
- Bortner C.D., Oldenburg N. B. E. And Cidlowski J. A. (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. (*Trends in cell biology* 5 : 21-26.
- Boylan J.F. and Gudas L.J. (1992) The level of CRABP-1 expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J. Biol. Chem.*, 30 : 21486-21491.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 : 248.
- Bredesen D.E. (1995) Neural apoptosis. *Ann. Neurol.*, 38 : 839-851.
- Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.J. (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 2936-2940.
- Briehl M.M., Flomerfelt F.A., Wu X.P., Misfield R.L. (1990) Transcriptional analyses of steroid-regulated gene networks. *Mol. Endocrinol.*, 4 : 287-294.
- Brooks III S.C., Kazmer S., Levin A.A. et Yen A. (1996) Myeloid differentiation and retinoblastoma phosphorylation changes in HL-60 cells induced by retinoic acid receptor-and retinoid X receptor- sensitive retinoic acid analogs. *Blood*, 87/1 : 227-237.
- Brown D.G., Sun X.M. and Cohen G.M. (1993) Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J. Biol. Chem.* 268 : 3037-3039.
- Bruel A., Benoit G., De Nay D., Brown S. et Lanotte M. (1995) Distinct apoptotic responses in maturation sensitive and resistant t(15;17) acute promyelocytic leukemia NB4 cells. 9-cis retinoic acid induces apoptosis independent of maturation and Bcl-2 expression. *Leukemia*, 9 : 1173-1184.
- Bruno S., Del Bino G., Lassota P., Giaretti W., Darzynkiewicz Z. (1992) Inhibitors of proteases prevent endonucleolysis accompanying apoptotic death of HL-60 leukemic cells and normal thymocytes. *Leukemia*, 6 : 1113-1120.
- Buchkovitch K., Duffy L.A., Harlow E. (1989) The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, 58 : 1097-1105.
- Buck J., Derguini F., Levi E., Naakanishi K. et Hammerling U. (1991) Intracellular signaling by 14-hydroxy-4, 14-retro-retinol. *Science*, 254 : 1654-1657.
- Bulens F., Ibanez-Tallon I., Van Acker P., De Vriese A., Nelles L., Belayew A. Collen D. (1995) Retinoic acid induction of human tissue-type plasminogen activator gene expression via a direct repeat element (DR5) located at -7 kilobases. *J. Biol-Chem*, 270/13 : 7167-7175.

Bürger C., Wick M. et Müller R. (1994) Lineage-specific regulation of cell cycle gene expression in differentiating myeloid cells. *J. Cell Sci.*, 107 : 2047-2054.

Burton K. (1956) A study of the conditions of diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem. J.* 62 : 315-323.

Butler W.B. et Fontana J.A. (1992) Responses to retinoic acid of tamoxifen-sensitive and -resistant sublines of human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res.*, 52 : 6164-6167.

Camman C.E., Tang D.P., Normolle T.S., Lawrence T.S. and Maybaum J. (1992) Variations in patterns of DNA damage induced in human colorectal tumor cells by 5-fluorodeoxyuridine : implications for mechanisms of resistance and cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci* 89:10474- ?

Cance W.G., Chaudhary N., Worman H.J., Blobel G. et Cordon-Cardo C. (1992). Expression of the nuclear lamins in normal and neoplastic human tissues. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 11: 233-246.

Casiano C.A. et Tan E.M. (1996) Antinuclear autoantibodies: probes for defining proteolytic events associated with apoptosis. *Mol. Biol. Reports*, 23 : 211-216.

Chambon P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.*, 10/9 : 940-954.

Chaudhary N. et Courvalin J.C. (1993). Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *J. Cell Biol.* 122 : 295-306.

Chaya D., Fougère-Deschatrette C. et Weiss M.C. (1996) Spontaneous apoptosis in a rat hepatoma cell line and its inhibition by dexamethasone. *Cell Death Diff.*, 3 : 97-104.

Chen J.Y., Penco S., Ostrowski J., Balaguer P., Pons M., Starrett J.E., Reczek P., Chambon P. et Gronemeyer H. (1995) RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP-1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. *EMBO J.*, 14/6 : 1187-1197.

Chen Y.H., Desai P., Shiao R.T., Lavelle D., Haleem A. et Chen J. (1996) Inhibition of myeloma cell growth by dexamethasone and All-Trans Retinoic Acid: synergy through modulation of interleukin-6 autocrine loop at multiple sites. *Blood*, 87/1 : 314-323.

Chiocca E.A., Davies P.J.A. et Stein J.P. (1988) The molecular basis of retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 263 : 11584-11589.

Chomienne C., Fenaux P., Degos L. (1996) Retinoid differentiation therapy in promyelocytic. *Faseb J.*, 10 : 1025-1030.

Clifford J., Chiba H., Sobieszczuk D., Metzger D. et Chambon P. (1996) RXR α -null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, anti-proliferative and apoptotic effects of retinoids. *EMBO J.*, 15/16 : 4142-4155.

Cohen J.J., Duke R.C., Fadok V.A. et Sellins K.S. (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, 10 : 267-293.

Cohen G.N., Sun X.M., Snowden M.G., Ormerod M.G. and Dinsdale D. (1993) Identification of a transitional preapoptotic population of thymocytes. *J. Immunol.*, 151 : 566.

Collard J.F., Sénégal J.L. et Raymond Y. (1992). Redistribution of nuclear lamin A is an early event associated with redistribution of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J. Cell Sci.* 101: 657-670.

Collins R.J., Harmon G.C., Gobé G.C. et Kerr J.F.R. (1992) Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 61 : 451-453.

Connor J., Pak C.H. et Schroit A.J. (1994) Exposure of phosphatidyl in the outer leaflet of human red cells. Relationship to cell density, cell age and clearance by mononuclear cells. *J. Biol. Chem.*, 269 : 2399-2404.

Conrad Liles W., Dale D.C., Klebanoff S.J. (1995) Glucocorticoid inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood*, 86/8 : 3181-3188.

Cox G. et Austin R.C. (1997) Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J. Leuk. Biol.*, 61/2 : 224-229.

Courtenay N.D., Selby P.J., Smith L.E., Mills J., Peckam M.J. (1978) Growth of human tumor cell colonies from biopsies using two soft agar techniques. *Br. J. Cancer*, 38 : 77-81.

Cuende E., Alés-Martinez J.E., Ding L., Gonzalez-Garcia M., Martinez A., Nunez G. (1993) Programmed cell death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *EMBO J.*, 12 : 1555-1560.

Cuff S., Ruby J. (1996) Evasion of apoptosis by DNA viruses. *Immunol. Cell Biol.*, 74 : 527-537.

Darzynkiewicz Z., Gong J., Juan G., Ardelt B. Et Traganos F. (1996) Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry*, 25 : 1-13.

Davis I.J., Hazel T.G., Lau L.F. (1991) Transcriptional activation by Nurr77, a growth factor-inducible member of the steroid hormone receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.*, 5 : 584.

Davies P.J.A., Stein J.P., Chiocca E.A., Basilon I.P., Gentile V., Fesus L. (1992) Retinoid-regulated expression of transglutaminase: Links to the biochemistry of programmed cell death. In: Morris Kay G. (Ed) *Retinoids in normal development and teratogenesis*. Oxford University Press, Oxford, 249-263.

Davies P.J.A., Nagy L., Thomazy V., Gil D. and Chandraratna R. (??) Studies on the role of retinoid receptors in the induction of gene expression, differentiation and cell death in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells.

Deboise B. et Sen S. (1992) L'apoptose ou mort cellulaire programmée : concepts, mécanismes et apports en cancérologie. *Bull. Cancer*, 79 : 413-425.

Defacque H., Commes T., Contet V., Sevilla C. et Marti J. (1995) Differentiation of U937 myelomonocytic cell line by all-trans retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 : synergistic effects on tissue transglutaminase. *Leukemia*, 9 : 1762-1767.

Degos L. (1993) All trans retinoic acid as a targeting drug for differentiation therapy in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Treat. Res.*, 64 : 1-13.



Delescluse C., Cavey M.T., Martin B., Bernard B.A., Reichert U., Maignan J., Darmon M. et Schroot B. (1991) Selective high affinity retinoic acid receptor-alpha or receptor-beta-gamma ligands. *Mol. Pharmacol.*, 40 : 556-562.

De la Coste A., Perret C. (1997). Bad est-elle la protéine cible des facteurs de survie ?. *Médecine/Sciences*, 13 : 384-386.

Delia D., Aiello A., Lombardi L., Pellici P.G., Grignani F., Formelli F., Menard S., Costa A., Veronesi U., Pierotti M.A. (1993) N-(4-hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis of malignant hematopoietic cells including those unresponsive to retinoic acid. *Cancer Res.*, 53 : 6036-6041.

De Maeyer E. et De Mayer-Guignard J. (1988) *Interferons and other regulatory cytokines*, p.448. New York: John Wiley and Sons.

Demartis A., Bernassola F., Savino R., Melino G. et Ciliberto G. (1996) Interleukin 6 receptor superantagonists are potent inducers of human multiple myeloma cell death. *Cancer Res.*, 56 : 4213-4218.

Diehl *et al*, *Blut*, 1978, 36: 331-338.

Dieken E. et Misfield R.L. (1992) Transcriptional transactivation functions localized to the glucocorticoid receptor N terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 12/2 : 589-597.

Dini L., Coppola S., Ruzittu M. And Ghibelli L. (1996) Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation. *Exp. Cell Res.* 223 : 340-347.

Dive C., Gregory D.C., Phipps D.J., Evans D.L., Milner A.E., Wyllie A.H. (1992) Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta*, 1113 : 275-285.

Dmitrovsky E., Moy D., Miller W., Li A. et Masui H. (1990). Retinoic acid causes a decline in TGF α expression, cloning efficiency, and tumorigenicity in a human embryonal cancer cell line. *Onc. Res.*, 42 : 4771-4775.

Dorsch M. et Goff S.P. (1996) Increased sensitivity to apoptotic stimuli in c-abl-deficient progenitor B-cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 13131-13136.

Doyle L., Giangiulo D., Hussain A., Park H.J., Chin Yen R.W. et Borges M. (1989) Differentiation of human variant small cell cancer lines to a classic morphology by retinoic acid. *Cancer Res.*, 49 : 6745-6751.

Duke R.C., Ojcius D.M., Young J. D. F. (1996). Cell suicide in health and disease. *Scientific American*, December 1996, 80-87.

Earnshaw W.C. (1995) Nuclear changes in apoptosis. *Cur. Op. Cell Biol.*, 7 : 337-343.

Ellis H.M. et Horvitz H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in nematode *C. elegans*. *Cell*, 44 : 817-829

- Elsässer H.P., MacDonald R., Dienst M. Et Kern H.F. (1993) Characterization of a transglutaminase expressed in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 61 : 321-328.
- Elstner E., Linker-Israeli M., Umiel T., Le J., Grillier I., Saïd J., Shintaku I.P., Krajewski S., Reed J.C., Binrerup L. et Koeffler H.P. (1996) Combinaison of a potent 20-*epi*-vitamin D3 analogue (KH 1060) with expression, and induces apoptotic in HL-60 leukemic cells. *Cancer Res.*, 56/15 : 3570-3576.
- Emoto Y., Manome Y., Meihardt G., Kasaki H., Kharbanda S., Robertson M., Ghayur T., Wong W.W., Kamen R., Weichselbaum R. et Kufe D. (1995) Proteolytic activation of protein kinase C δ by an ICE-like protease in apoptotic cells. *Embo J.*, 14/24 : 6148-6156.
- Evan G.I., Wyllie A.H., Gilberts C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Waters C.M., Penn L.Z. and Hancock D.C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69 : 119-128.
- Evans R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240 : 889-895.
- Eyrolles L., Kagechika H., Kawachi E., Fukasawa H., Iijima T., Matsushima Y., Hashimoto Y. Et Shudo K. (1994) Retinobenzoic acids.6. retinoid antagonists with a heterocyclic ring. *J. Med. Chem.*, 37 : 1508-1517.
- Facon T. (1997) Traitement conventionnel du myélome multiple. *Hématologie*, 3 : 245-255.
- Falcieri E., Zamai L., Santi S., Cinti C., Gobbi P., Bosco D., Cataldi A., Betts C. et Vitale M. (1994) The behaviour of nuclear domains in the course of apoptosis. *Histochemistry*, 102 : 221-231.
- Fanjul A.N., Bouterfa H., Dawson M. et Pfahl M. (1996) Potential role for retinoic receptor- γ in the inhibition of breast cancer cells by selective retinoids and interferons. *Cancer Res.*, 56 : 1571-1577.
- Fesus L., Thomazy V. Et Falus A. (1987) Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett.*, 224 : 104-108.
- Fesus L., Thomazy LV, Autori F., Ceru M.P., Tarcsa E., et Piacentini M. (1989) Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett*, 245 : 150-154.
- Fesus L., Davies P.J.A., Piacentini M. (1991) Apoptosis : molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur. J. Cell. Biol.*, 56 : 170-177.
- Fesus L., Madi A., Balajthy Z., Nemes Z. Et Szondy Z. (1996) Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia*, 52 : 942-949.
- Filipski J., Leblanc T., Youdale T., Sikorska M. And Walker P.R. (1990) Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO J.* 9 : 1319-1327.
- Forman B.M., Umesono K., Chen J., Evans R.M. (1995) Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*, 81 : 541-550.

- Formelli F., Barua A.B. et Olson J.A. (1996) Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl b-glucuronide. *FASEB J.*, 10 : 1014-1024.
- Gajewski T.F. et Thompson C.B. (1996) Apoptosis meets signal transduction : elimination of a Bad influence. *Cell*, 87 : 589-592.
- Gallagher R., Lurie K., Leavitt R. et Wiernik P.H. (1987) Effects of interferon and retinoic acid on growth and differentiation of clonogenic leukemia cells. *Leuk. Res.*, 7 : 609-619.
- Galli G., Fratelli M. (1993) Activation of apoptosis by serum deprivation in a teratocarcinoma cell line : inhibition by L-acetylcarnitine. *Exp. Cell. Res.*, 204 : 54-60.
- Gavrieli Y., Sherman Y. et Ben-Sasson S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Res.* 204: 54-60.
- Ghayur T., Hugunin M., Talanian R.V., Ratnofsky S., Quinian C., Emoto Y., Pandey P. Huang Y.Y., Kharbanda S., Allen H., Kamen R., Wong W. et Kufe D. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like proteases induces characteristics of apoptosis. *J. of Exp. Med.*, 184/6 : 2399-2404.
- Ghayur T., Hugunin M., Talanian R.V., Ratnofsky S., Quinlan C., Emoto Y., Pandey P., Datta R., Huang Y., Kharbanda S., Allen H., Kamen R., Wong W. Et Kufe D. (1997) Proteolytic activation of protein kinase C δ by an ICE/CED3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.*, 184 : 2399-2404.
- Giandomenico V., Lancillotti F., Fiorucci G., Rivabene P.R., Malorni W., Affabris E. et Romeo G. (1997) Retinoic acid and IFN inhibition of cell proliferation is associated with apoptosis in squamous carcinoma cell lines : Role of IRF-1 and TGase II- dependent pathways. *Cell Growth Diff.*, 8 : 91-100.
- Gjertsen B.T. et Doskeland S.O. (1995). Protein phosphorylation in apoptosis. *Biochem. Biophys. Acta*, 1269 : 187-199.
- Glass C.K., Rose D.W. et Rosenfeld M.G. (1997) Nuclear receptor coactivators. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 9 : 222-232.
- Golstein P., Marguet D. et Depraetere V. (1995) Homology between Reaper and the cell death domains of Fas and TNFR1. *Cell*, 81 : 185-186.
- Gomi M., Moriwaki K., Katagiri S., Kurata Y. et Thompson E.B. (1990) Glucocorticoid effects on myeloma cells in culture: correlation of growth inhibition with induction of glucocorticoid receptor messenger RNA. *Cancer Res.*, 50 : 1873-1878.
- Goodnight J., Mischak H., Mushinski J.F (1994) Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv. Can. Res.*, 26 : 881-887.
- Gregory W.M., Richards M.A., Malpas J.S. (1992) Combination chemotherapy versus melphalan and prednisone in the treatment of multiple myeloma : an overview of published trials. *J. Oncol.*, 10 : 334-342.
- Green S. et Chambon P. (1988) Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.*, 4 : 309-314.

- Grennberg J.T., Guo A., Klessig D.F. et Ausubel F.M. (1994) Programmed cell death in plants : a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, 77 : 551-563.
- Greenberg J.T. (1996) Programmed cell death : A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 12094-12097.
- Grignani F., Ferruci P.F., Testa U., Talamo G., Fagioli M., Alcalay M., Mencarelli A., Grignani F., Peschle C., Nicoletti I. et Pelicci P.G. (1993) The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cell. *Cell*, 74 : 423-431.
- Gudas L.J. (1994) Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.*, 269 : 15399-15402.
- Guidotti G.G., Urbani S. et Alfieri R. (1995) Genetic control of apoptosis. *Fundamental and clinical immunology*, 3/2 : 56-57.
- Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J., Poellinger L., Okret S., Wilkstrom A.C., Bronnegard M., Gillner M., Dong Y., Fuxe K. et Cintra A. (1987) Biochemistry, molecular biology, and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocrinol. Rev.*, 8 : 185-234.
- Häcker G. et Vaux D.L. (1995) The medical significance of physiological cell death. *Med. Res. Rev.*, 15/4 : 299-311.
- Häcker G. et Vaux D.L. (1995). The medical significance of physiological cell death. *Medicinal Research Reviews*, 15/4 : 299-311.
- Hale A.J., Smith C.A., Sutherland L.C., Stoneman V.E.A., Longthorne V.L., Culhane A.C. et Willams G.T. (1996) Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.*, 236 : 1-26.
- Halter S., Fraker L., Adcock D. Et Vick S. (1988) Effect of retinoids on xenotransplanted human mammary carcinoma cells in athimic mice. *Cancer Res.*, 48 : 3733.
- Hannun Y.A. (1997) Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*, 89/6 : 1845-1853.
- Hardin J., MacLeod S., Grigorieva I., Chang R., Barlogie B., Xiao H. et Epstein J. (1994) Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood*, 84/9 : 3063-3070.
- Harris A.W. *et al*, 1970, *Exp. Cell. Res.* 60 : 61.
- Harrison D.J., Howie S.E.M., Wyllie A.H. (1995) Lymphocyte death, p53, and the problem of « undead » cell. In apoptosis in Immunology. G. Kroemer, C.Martinez-A. Eds Springer-Verlag, p. 123-136.
- Hart S.P., Haslett C. et Dransfield I. (1996) Recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Experientia*, 52 : 950-956.
- Hata H., Matsuzaki H., Takeya M. et al (1995) Expression of Fas/apo-1 (CD95) and apoptosis in tumor cells from patients with plama cell disorders. *Blood*, 86 : 1939-1945.
- Haynes R.C. The pharmacological basis of therapeutics (1990). Chapter 60. Eds Goodman Gilman A., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. Pergamon Press. Eight Edition, p1431-1480.

- Hembree J.R., Agarwal C., Beard RL, Chandraratna R.A.S. et Eckert R.L. (1996) Retinoid X receptor-specific retinoids inhibit the ability of retinoic acid receptor-specific retinoids to increase the level of insulin-like growth factor binding protein-3 in human ectocervical epithelial cells. *Cancer Res.*, 56 : 1794-1799.
- Hentgartner M.O. et Horwitz H.R. (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*, 76 : 665-676.
- Helmberg A., Auphan N., Caelles C. et Karin M. (1995) Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, 14/3 : 452-460.
- Hewison M., Dabrowski M., Vadher S., Faulkner L., Cockerill F.J., Brickell P.M., o'Riordan J.L. et Katz D.R. (1996) Antisense inhibition of vitamin D receptor expression induces apoptosis in monoblastoid U937 cells. *J. Immunol.*, 156/11 : 4391-4400.
- Hockenbery D.M., Zutter M., Hickey W., Nahm M. et Korsmeyer S.J. (1991) *Bcl-2* protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic death. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 : 6961-6965.
- Hollenberg S.M., Weinberger C., Ong E.S., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson E.B., Rosenfeld M.G., Evans R.M. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 318 : 635-641.
- Holman P., Lu J., Jasty R., Suchard S., Mansfield P., Andrews D.W., Leber B., Castle V.P. (1995) *Bax* induced following retinoic acid treatment but cell survival depends on *bcl-2* expression. *Blood*, 56/suppl. 1, 36a.
- Hom V., Minucci S., Ogryzko V.V., Adamson E.D., Howard B.H., Levin A.A. et Ozato K. (1996) RAR and RXR selective ligands cooperatively induce apoptosis and neuronal differentiation in P19 embryonal carcinoma cells. *FASEB J.*, 10 : 1071-1077.
- Hsu A., Rishi A.K., Li X.S., Gerald T.M., Dawson M.I., Schiffer C., Reichert U., Schroot B., Poirier G.C., Fontana J.A. (1997) Retinoid induced apoptosis in leukemia cells through a retinoic acid receptor-independent pathway. *Blood*, 12 : 4470-4479.
- Hu W.X., Gazitt Y. (1996) *bcl-2* plays a major role in resistance to dexamethasone induced apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Int. J. Oncol.*, 9/2 : 375-381.
- Hug H., Sarra T.F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction. *Biochem J.*, 291 : 329-343.
- Huang M.E., Ye Y.C., Chen S.R., Chai J.R., Lu J.X., Zhou L., Gu L.J. et Wang Z.Y. (1988) Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 72 : 567-572
- Ishikawa H., Tanaka H., Iwito K., Tanabe O., Asaoku H., Nobuyoshi M., Yamamoto I., Kawano M. et Kuramoto A. (1990) Effect of glucocorticoids on the biologic activities of myeloma cells : inhibition of interleukin-1 β osteoclast activating factor-induced bone resorption. *Blood*, 75 : 715-720.

- Iwata M., Hanaoka S., Sato K (1991) Rescue of thymocytes and T-cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire. *Eur. J. Immunol.*, 21 : 643-648.
- Iwata M., Mukai M., Nakal Y. et Iseki R. (1992) Retinoic acids inhibit activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes. *J. Immunol.* 149/10 : 3302-3308.
- Iwata M., Iseki R., Sato K., Tosawa Y. Et Choka Y6. (1994) Involvement of protein kinase C-epsilon in glucocorticoid-induced apoptosis in thymocytes. *Int. Immunol.* 6/3 : 431-438.
- Iwata M. (1995) Regulation of apoptosis via steroid receptors. In *Apoptosis in Immunology* G. Kroemer, C. Martinez-A. Eds Springer-Verlag, p81-94
- Jacobson M.D., Weil M. et Raff M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88 : 347-354.
- Jacobson M.D., Burne J.F. and Raff M.C. (1994) Programmed cell death and Bcl-2 protection in absence of a nucleus. *EMBO J.* 13 : 1899-1910.
- James S.Y., Mackey A.G. et Colston K.W. (1996) Effects of 1,25 dihydrovitamin D3 and its analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 58/4 : 395-401.
- Jetten A.M., Kim J., Sacks P., Rearick J., Lotan J., Hong W. Et Lotan R. (1990) Inhibition of growth and squamous-cell differentiation markers in cultured human head and neck squamous carcinoma cells by all-trans retinoic acid. *Int. J. Cancer*, 44 : 195-202.
- Jiang H. et Kochhar D.M. (1992) Induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoic acid in the limb bud. *Teratology*, 46 : 333-340.
- Jiang H., Lin J., Su Z.Z., Collard F.R., Huberman E. et Fisher P. (1994) Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene*, 9 : 3397-3406.
- Jonat C., Rahmsdorf H.J., Park K.K., Cato A.C.B., Gebel S., Ponta H. et Herrlich P. (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, 62 : 1189-1204.
- Joseph B., Lefebvre O., Méreau-Richard C., Danzé P.M., Belin-Plancot M.T. et Formstecher P. (1997) Evidence for the involvement of both retinoic acid receptor and retinoic X receptor-dependent signaling pathways in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis in the human myeloma cell line RPMI 8226. *Blood* accepted.
- Kaiser N., Edelman I.S. (1977) Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 : 638-642.
- Kalemkerian G.P., Slusher R., Ramalingam S., Gadgeel S., Mabry M. (1995) Growth inhibition and induction of apoptosis by fenretinide in small-cell lung cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87 : 1674-1680.
- Karrer P., Morf R., and Schöpp K. (1931) *Helv. Chim. Acta*, 14 : 1431-1436.

- Kahn A. (1997) Mitochondries, pores, Bcl-2...une image apparaît dans le puzzle de l'apoptose. *Médecine/Sciences*, 13 : 738-739.
- Kastner P., Mark M. et Chambon P. (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetics studies telling us about their role in real life? *Cell*, 83: 859-869.
- Kaufmann S.H. (1996) Proteolytic cleavage during chemotherapy-induced apoptosis. *Mol. Med. Today* July 1996: 298-303.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H. and Currie A.R. (1972) Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer*, 26 : 239-257.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1995) Anatomical methods in cell death. In *methods in cell biology*. Eds L.M. Schwartz and Osborne B.A. Academic Press, 46 : 127.
- Kisaki M., Ikeda Y., Tanosaki R., Nakajima H., Morikawa M., Sakashita A. et Koeffler H.P. (1993) Effects of novel retinoic acid compound, 9-cis-retinoic acid, on proliferation, differentiation, and expression of retinoic acid receptor- α and retinoid X receptor- α RNA by HL-60 cells. *Blood*, 82/12 : 3592-3599.
- Klein B, Bataille R. (1991) Interleukine 6 et myélome multiple chez l'homme. *Médecine/Sciences*, 7 : 937-943.
- Knox K.A., Johnson G.D., Gordon J. (1993) A study of protein kinase C isozyme distribution in relation to Bcl-2 expression during apoptosis of epithelial cells *in vivo*. *Exp. Cell. Res.*, 207/1 : 68-73.
- Koopman G., Reutelingsperger C.P.M., Kuijten C.A.M., Keehmen R.M.J., Pals S.T. et Van Oers M.H.J. (1994). Annexin for flow cytometric detection of phosphatidyl serine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84 : 1415-1420.
- Koskela K., Neya M., Remes K., Pelliniemi T.T. et Pulkki K. (1995) Inhibition of interleukin-6 receptor (IL-6R) secreting human myeloma cell proliferation by all-trans retinoic acid (ATRA) and alpha-interferon (α -IFN). *ASH, 1994, Blood*, 84 suppl. 1, abs. 684.
- Kroemer G. (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature medicine*, 6 : 614-620.
- Krupitza G., Hulla W., Harant H., Dittrich E., Kallay E., Huber H., Grunt T., Dittrich C (1995) Retinoic acid induced death of ovarian carcinoma cells correlates with c-myc stimulation. *Int. J. Cancer*, 61 : 649-657.
- Kudoh T., Ishidate T., Nakamura T., Toyoshima K. et Akiyama T. (1996) Constitutive expression of the Wilms tumor suppressor gene WT1 in F9 embryonal carcinoma cells induces apoptotic cell death in response to retinoic acid. *Oncogene*, 13 : 1431-1439.
- Lane D.P. (1992) p53, guardian of the genome. *Nature*, 358 : 15-16.
- Larsen C.J. (1996) L'expansion continue de la famille Bcl-2 vers une approche raisonnée des relations structure/activité ? *Hématologie*, 2 : 301-311.

- Lampron C., Rochette-Egly C., Gorry P., Dolle P., Mark M., Lufkin T., LeMeur M. Et Chambon P. (1995) Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABP II) or in both CRABP I and CRABP II are essentially normal. *Development*, 121 : 539-548.
- Langenfeld J., Lonardo F., Kiyokawa H., Passalaris T., Ahn M.J., Rusch V. et Dmitrovsky E. (1996) Inhibited transformation of immortalized human bronchial epithelial cells by retinoic acid is linked to cyclin E down-regulation. *Oncogene*, 13 : 1983-1990.
- Lavin M.F., Watters D. et Song Q. (1996) Role of protease activity in apoptosis. *Experientia*, 52 : 979-993.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laveau C., Jansen J., Weis K., Lamond A. Et Dejean A. (1994) Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinoïque : le paradoxe. *Médecine/Sciences*, 10 : 817-824.
- Lawrence H., Conner K., Kelly M., Haussler M.R., Wallace P. Et Bagby G.B. jr. (1987) Cis-retinoic acid stimulates the clonal growth of some myeloid leukemia cells in vitro. *Blood*, 69 : 302-307.
- Lebrun D.P., Warnke R.A., Clearly M.L. (1993) Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J. Pathol.*, 142 : 743-753.
- Leid M., Kastner P. Et Chambon P. (1992) Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *TIBS*, 17 : 427-433.
- Lefebvre O., Belin M.T., Mereau-Richard C., Facon T., Zandecki M. et Formstecher P. (1997) Induction of apoptosis by all-trans retinoic acid in the human myeloma cell line RPMI 8226 and negative regulation by dexamethasone. *Cell Death and differentiation* submitted.
- Leszczynski D., Joenväärä S., Foegh M.L. (1995) Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by δ and ζ but not α and ϵ isoenzymes of protein kinase C. *Mol. Biol. Cell*, 6(suppl.) : 246a.
- Leszczynski D. (1996) The role of protein kinase C in regulation of apoptosis: a brief overview of the controversy. *Cancer J.*, 9/6 : 308-312.
- Levy Y., Labaume S., Colombel M. et Brouet J.C. (1996) Retinoic acid modulates the in vivo and in vitro growth of IL-6 autocrine human myeloma cell lines via induction of apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* 104 : 167-172.
- Li X.S., Rishi A.K., Shao Z.M., Dawson M.I., Jong L., Schroot B., Reichert U., Ordonez J., Fontana J.A. (1996) Posttranscriptional regulation of p21WAF1/CIP1 expression in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, 56/21 : 5055-5062.
- Lichtenstein A., Tu Y., Fady C., Vescio R. et Berenson J. (1995) Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell. Immunol.*, 162 : 248-255.
- Liu Z.G., Smith S.W., Mc Laughlin K.A., Schwartz L.M. and Osborne B.A. (1994) Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene Nur77. *Nature*, 367: 281-284.

- Liu Y., Lee M.O., Wang H.G., Li Y., Hashimoto Y., Klaus M., Reed J.C. et Zhang X.K. (1996) Retinoic acid receptor b mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, 16/3 : 1138-1149.
- Loo D.T., Copani A., Pike C.J., Whittemore E.R., Walencewicz A.J., Cotman C.W. (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 7951-7955.
- Lord J., Pongracz J., Griffiths G., Deacon E., Matthews S. et Watters D. (1995) Protein kinase C isoenzyme expression and activation during myeloid cell apoptosis. 3rd Euroconference on apoptosis, European School of Haematology. Oct 21-25, 1995, Cuenca, Spain.
- Lotan R. (1979) Different susceptibilities of human melanoma and breast carcinoma cell lines to retinoic acid-induced growth inhibition. *Cancer Res.*, 39 : 1014-1019.
- Lotan R. (1980) Effects of vitamine A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 605 : 33-91.
- Lotan R., Lotan D., Sacks P. (1990) Inhibition of tumor cell growth by retinoids. In Parker L. (ed) *Methods in enzymology : Retinoids*. Academic Press, Olando, 100-110.
- Lotan R. (1995a) Cellular biology of the retinoids. Degos L., Parkinson DR, eds (copyright spinger-Verlag Berlin Heidelberg New-York), 27-42.
- Lotan R. (1995b) Retinoids and apoptosis: implications for cancer chemoprevention and therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87 : 1655-1657.
- Lotan R., Dawson M.I., Zou C.C., Jong L., Lotan D. et Zou C.P. (1995) Enhanced efficacy of combinations of retinoic acid- and retinoid X receptor-selective retinoids and α -interferon in inhibition of cervical carcinoma cell proliferation. *Cancer Res.*, 55 : 232-236.
- Low P., Bussell K., Dawson S.P., Billett M.A., Mayer R.J. et Reynolds S.E. (1997) Expression of a 26S proteasome ATPase subunit, MS73, in muscles that undergo developmentally programmed cell death, and its control by ecdysteroid hormones in the insect *Manduca Sexta*. *FEBS Lett.* 400/3 : 345-349.
- Lucas M. et Sanchez-Margalet V. (1995). Protein kinase C involvement in apoptosis. *Gen Pharmacol*, 26/5 : 881-887.
- Lu S., Saydak M., Gentile V., Stein J.P. et Davies J.A. (1995) Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter. *J. Biol. Chem.*, 270/17 : 9748-9756.
- Mc Conkey et Orrenius S (1996) The role in calcium in the regulation of apoptosis. *J. of Leukocyte Biol.*, 59 : 775-782.
- Mc Donnell T.J., Meyn R.E. et Robertson L.E (1995) Implications of apoptotic cell death regulation in cancer therapy. *Sem.Cancer Biol.*, 6 : 53-60.
- Mc Gahan A., Bissonnette R., Schmitt R., Cotter K., Green D.R. Cotter T.G. (1994) Bcr-Abl maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood*, 83 : 1179-1187.

Mandelli F., Avvisati G., Amadori S. Boccadoro M., Gernone A., Lauta V.M., Marmont F., Petrucci M.T., Tribalto M., Vegna M.L., Dammacco F., Pileri A. (1990) Maintenance treatment with recombinant interferon alpha-2b in patients with multiple myeloma responding to conventional induction chemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 322 : 1430.

Manechez D, Tbarka N., Danzé PM, Onraed B., Formstecher P. et Dautrevaux M. (1991) Régulation négative par la dexaméthasone de l'expression de la transglutaminase de tissu dans les cellules de leucémie humaine à promyélocyte HL-60 et neuroblastome humain SK-N-SH. 5^{ème} Journée Franco-Belge de Pharmacochimie, Lille, 26-27 sept. 1991.

Mangelsdorf D.J, Umesono K. et Evans R.M. (1994) The retinoid receptors. *Retinoids: Biology, chemistry*: 319-349.

Mangelsdorf D.J, Thummel C., Beato M, Herrlich P., Sxhütz G., Umesono K., Bumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. et Evans R.M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83: 835-839.

Martins L. M. et Earnshaw W. C. (1997). Apoptosis: alive and kicking in 1997. *Trends in Cell Biology* 7: 111-114.

Martin B. Bernardon J.M., Cavey M.T., Bernard B., Carvalan I., Charpentier B., Pilgrim W.R., Schroot B. Et Reichert U. (1992) Selective synthetic ligands for human nuclear retinoic acid receptors. *Skin. Pharmacol.*, 5 : 57-65.

Marth C., Daxenbichler G. et Dapunt O. (1986) Synergistic antiproliferative effect of recombinant interferons and retinoic acid in cultured breast cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 77 : 1197-1202.

Martin S.J., Bradley J.G. et Cotter T.G. (1990) HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin. exp. Immunol.*, 79 : 448-453.

Martin S.J., Lennon S.V., Bonham A.M. et Cotter T.G. (1991) Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J. Immunol.*, 145 : 1859-1867.

Martin S.J., Reutelingsperger C.P.M., McGahon A.J., Rader J., Van Schie R.C.A.A., LaFace D.M. et Green D.R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus : inhibition by overexpression of Bcl-2 and abl. *J. Exp. Med.*, 182 : 1545-1556.

Maschke S., Thomas A.M., Dhuiège E., Lefebvre O., Zandecki M., Bauters F., Formstecher P. and Facon T. (1996) Synergistic effect of the association of all-trans retinoic acid and melphalan on the induction of apoptosis in human myeloma cell lines. *ASH 38th Annual Meeting, December 6/10, 1996, Orlando, Florida, USA.*

Mazars G.R., Porthier M., Zhang X.G., Jourdan M., Bataille R., Theillet C. et Klein B. (1992) Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines. *Onc.*, 7 : 1015-1018.

Mehta K., McQueen T., Neamati N., Collins S. et Andreeff M. (1996) Activation of retinoid receptors RAR α and RXR α induces differentiation and apoptosis, respectively, in HL-60 cells. *Cell Growth Diff.*, 7 : 179-186.

- Melino G., Annicchiarico-Petruzzelli M., Piredda L., Candi E., Gentile V., Davies P.J., Piacentini M (1994). Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, 14/10 : 6584-6596.
- Mereau-Richard C., Belin M.T., Lefebvre O., Dumur V., Facon T. et Formstecher P. (1993) Control of expression of tissue transglutaminase by all-trans retinoic acid, dexamethasone and interferon alpha in myeloma cells. 35th Annual Meeting of The American Society of Hematology. Dec 3-7, 1993, St.Louis, Missouri.
- Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H.G., Lin H.K., Lieberman D.A., Hoffman B., Reed J.C. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*, 9 : 1799-1805.
- Moalli P.A., Pillay S., Weiner D., Leikin R. et Rosen S.T. (1992) A mechanism of resistance to glucocorticoids in multiple myeloma : transient expression of a truncated glucocorticoid receptor mRNA. *Blood*, 79 : 213-222.
- Moalli P.A., Pillay S., Krett N.L. et Rosen S.T. (1993) Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res.*, 53 : 3877-3879.
- Montague J.W. et Cidlowski J.A. (1995). Glucocorticoid-induced death of immune cells: mechanisms of action. In apoptosis in Immunology. G. Kroemer, C. Martinez-A. Eds Springer-Verlag, p. 51-66.
- Montague J.W. et Cidlowski J.A. (1996). Cellular catabolism: DNA degradation and endonuclease activation. *Experientia* 52: 957-961.
- Montano M.M., Muller V., Trobaugh A. Et Katzenellenbogen B.S. (1995) The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor : role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol. Endocrinol.*, 9 : 814-825.
- Moore G.E. and Kitamura H. (1968). Cell line derived from a patient with myeloma. *New York State J. Med.* 68 : 2054-2060
- Morris-Kay G. (1992) (ed) Retinoids in normal development and teratogenesis. Oxford University Press, New-York.
- Moore D.M., Dhananjaya V. K., Lippman S.M., Kavanagh J.J., Ki Hong W., Borden E.C., Paredes-Espinoza M. et Krakoff I. (1994) Retinoic acid and interferon in human cancer : Mechanistic and clinical studies. *Sem. In Hematol.*, 31/4 (suppl 5) : 31-37.
- Motoyama J., Taki K., Osumi-Yamashita N. et Eto K. (1994) Retinoic acid treatment induces cell death and the protein expression of retinoic acid receptor b in the mesenchymal cells of mouse facial primordia *in vitro*. *Dev. Growth Differ.*, 36/3 : 281-288.
- Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wong S.L., Ng S.C. et Fesik S.W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-x_L, and inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381 : 353-357.
- Mundle S. D., Gregory A. S., Preisler H. D., Raza A. (1996) Enzymatic programming of apoptotic cell death. *Pathobiology* 64: 161-170.

- Munker M., Munker R., Saxton R. et Koeffler H.P. (1987) Effect of recombinant monokines, lymphokines and other agents on clonal proliferation of human lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, 47 : 4081-4085.
- Nagasue N., Yu L., Yamaguchi M., Kohno H., Tachibana M. et Kubota H. (1996) Inhibition of growth and induction of TGF-beta 1 in human hepatocellular carcinoma with androgen receptor by cyproterone acetate in male nude mice. *J. Hepatol.*, 25/4 : 554-562.
- Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88 : 355-365.
- Nagy L., Thomazy V.A., Shipley G.L., Fesus L., Lamph W., Heyman R.A., Chandraratna R.A.S. et Davies P. (1995) Activation of retinoid X receptor induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol. Cell. Biol.*, 15/7 : 3540-3551.
- Nagy L., Thomazy V.A., Chandraratna R.A.S., Heyman R.A. et Davies P.J.A. (1996) Retinoid-regulated expression of bcl-2 and tissue transglutaminase during the differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Leuk. Res.* 20/6 : 499-505.
- Nakashima T., Sekiguchi T., Kuraoka K., Fukushima Y., Shibata Y., Komaiyama S., Nishimoto T. (1993) Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD-1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Mol. Cell. Biol.*, 13 : 6367-6374.
- Naito M., Nagashima K., Mashima T. Et Tsuruo T. (1997) Phosphatidylserine externalisation is a downstream event of interleukin-1b-converting enzyme family protease activation during apoptosis. *Blood*, 89/6 : 2060-2066.
- Narvaez C.J., Vanweelden K., Byrne I. et Welsh J. (1996) Characterization of a vitamin D3-resistant MCF-7 cell line. *Endocrinology*, 137/2 : 400-409.
- Naumovski L., Cleary M. (1994) Bcl-2 inhibits apoptosis associated with terminal differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Blood*, 83/8 : 2261-2267.
- Nazareth L.V., Harbour D.V. et Thompson E.B. (1991) Mapping the human glucocorticoid receptor for leukemic cell death. *J. Biol. Chem.*, 266 : 12976-12980.
- Nazareth L.V. et Thompson E.B. (1995) Leukemic cell apoptosis caused by constitutively active mutant glucocorticoid receptor fragments. In *Recent Progress in Hormone Research*, edited by Academic Press, Inc, 50 : 417-421.
- Nicholson D. W. (1996) ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nature Biotechnology* 14: 297-301.
- Nicholson D.W., Thornberry N.A. (1997) Caspases : killer proteases. *TIBS*, 22 : 299-306.
- Nilsson *et al*, (1970) *Clin. Exp. Immunol.* 7: 477-489.
- Nishizuka Y. (1992) Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258 : 607-614.
- Nishizuka Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.*, 9 : 484-496.

- Oberhammer F., Fritsch G., Schmied M., Pavelka M., Printz D., Purchio T., Lassman H., Schulte-Hermann R. (1993) Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *J. Cell Science* 104: 317-326.
- Oberhammer F., Wilson J.W., Dive C., Morris I.D., Hickman J.A., Wakeling A.E., Walker P.R. and Sikorska M. (1993) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12: 3679-3694.
- Oberhammer F.A., Hohegger K., Fröschl G., Tiefenbacher R. Et Pavelka M. (1994) Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J. Cell Biol.*, 126 : 827-837.
- Ogata A., Nishimoto N., Shima Y., Yoshizaki K. et Kishimoto T. (1994) Inhibitory effect of all-trans retinoic acid on the growth of freshly isolated myeloma cells via interference with interleukin-6 signal transduction. *Blood*, 84/9 : 3040-3046.
- Oltvai Z.N. et Korsmeyer S.J. (1996) Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*, 79 : 189-192.
- O'Malley B.W., Schrader W.T., Mani S., Smith C., Weigel N.L., Connely O.M. et Clark J.H. (1995) An alternative ligand-independent pathway for activation of steroid receptors. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 50 : 333-347.
- Ong D.E., Newcomer M.E. et Chytil F. (1994) Cellular retinoid-binding proteins. In *The retinoids: biology, chemistry and medicine*, 2nd edn. Edited by Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. New-York: Raven Press; 283-317.
- Oren M. (1992) The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis. *Cancer and metastasis Reviews*, 11 : 141-148.
- Oridate N., Higuchi M., Suzuki S., Schroot B., Hong W.K., Lotan R. (1997) Rapid induction of apoptosis in human C33A cervical carcinoma cells by the synthetic retinoid 6-[3-(1-adamanty)hydroxyphenyl]-2 naphthalene carboxylic acid (CD437). *Int. J. Cancer*, 70 :484-487.
- Oritani K., Kaisho T., Nakajima K. et Hirano T. (1992) Retinoic acid inhibits interleukin-6-induced macrophage differentiation and apoptosis in a murine hematopoietic cell line, Y6. *Blood*, 80/9 : 2298-2305.
- Orrenius S., McConkey D.J., Bellomo G., Nicotera P. (1989) Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci*, 10 : 281-285.
- Osborne B., Schwartz L. (1994) Essential genes that regulate apoptosis. *Trends in Cell biology*, 4 : 394-398.
- Pandey S., Walker P.R. et Sikorska M. (1997). Identification of a novel 97 kDa endonuclease capable of internucleosomal DNA cleavage. *Biochemistry*, 36/4 : 711-720.
- Parillo J.E. et Fauci A.S. (1979). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 19 : 179-209.
- Park J.R., Robertson K., Hickstein D.D., Tsai S., Hockenbery D.M. et Collins S.J. (1994) Dysregulated bcl-2 expression inhibits apoptosis but not differentiation of retinoic acid-induced HL-60 granulocytes. *Blood*, 84/2 : 440-445.

- Patel T., Gores G.J. et Kaufmann S.H. (1996). The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.* 10: 587-597.
- Peck G.L. (1982) Chemoprevention and treatment of skin cancer with retinoids. *Cancer Surv*, 2 : 315-326.
- Peehl M., Wong S. et Stamey T. (1991) Cytostatic effects of suramin on prostate cancer cells cultured from primary tumour. *J. Urol.*, 145 : 624-630.
- Peitsch MC, Muller C. and Tschopp J. (1993) *Nucleic Acids Res* 18 : 4206-4209.
- Peitsch M.C., Mannherz H.G., Tschopp J. (1994) Apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death ? *Trends in Cell Biology*, 4 : 37-41.
- Peitsch M.C., *Trends in Cell Biology* (1994) 4:39
- Pfahl M., Apfel R., Bendik I., Fanjul A., Graupner G., Lee M.O., La-Vista N., Lu X.P., Piedrafita J., Ortiz M.A., Salbert G. et Zhang X.K. (1994) Nuclear retinoid receptors and their mechanism of action. *Vitamins and Hormones*, 49 : 327.
- Piacentini M., Annicchiarico P.M., Oliverio S., Piredda L., Biedler J.L., Melino E. (1992) Phenotype-specific «tissue» transglutaminase regulation in human neuroblastoma cells in response to retinoic acid : correlation with cell death by apoptosis. *Int. J. Cancer*, 52 : 271-278.
- Piacentini M., Fesus L., Farrace M.G., Ghibelli L., Piredda L. et Melino G. (1991) The expression of «tissue transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *Eur. J. Cell Biol.*, 54 : 246-254.
- Piacentini M. (1995). Tissue transglutaminase : A candidate effector element of physiological cell death. *Curr. Top-Microbiol-Immunol*, 200 :163-175.
- Pongracz J., Johnson G.D., Crockert J., Burnett D. Et Lord J.M. (1994) The role of protein kinase C in myeloid cell apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.*, 22 : 593-597.
- Pongracz J., Tuffley W., Johnson G.D., Deacon E.M., Burnett D., Scockley R.A., Lord J.M. (1995) Changes in protein kinase C isoenzyme expression associated with apoptosis in U937 myelomonocytic cells. *Exp. Cell Res.*, 218 : 430-438.
- Preudhomme C., Facon T., Zandecki M., Vanrumbeke M., Lai J.L., Nataf E., Loucheux-Lefebvre M.H., Kerckaert J.P. et Fenaux P. (1992) Rare occurrence of P53 gene mutations in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 81 : 46-49.
- Rao L., Perez D. et White E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.*, 135/6 : 1441-1455.
- Raff R.A. (1992) Evolution of developmental decisions and morphogenesis : the view from two camps. *Dev.*, Suppl. 15-22.
- Reynolds C., Kane D., Einhorn P., Matthay K.K., Crouse V.L., Wilmur J.R., Shum S.B. et Seeger R.C. (1991) Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro et in vivo. In 'Advances in neuroblastoma research' (A. Evans, G. D'Angio et R. Seeger, eds), pp203-211. Liss, New-York.

- Sacks P., Oke V., Amos B., Vasey T. et Lotan R. (1989) Modulation of growth, differentiation, and glycoprotein synthesis by all-trans retinoic in a multi-cellular tumor spheroid model for squamous carcinoma of the head and neck. *Int. J. Cancer*, 44 : 926.
- Samson D. (1996) Principles of chemotherapy and radiotherapy. In : Gahrton G., Durie B.G.M. eds. *Multiple myeloma*. London : Arnold : 108-129.
- Schadendorf D., Worm M., Jurgovsky K., Dippel E., Reichert U. Et Czarnetzki B.M. (1995) Effects of various synthetic retinoids on proliferation and immunophenotype of human melanoma cells *in vitro*. *Recent-Results-Cancer-Res*, 139 : 183-193.
- Schadendorf D., Kern M.A., Artuc M., Pahl H.L., Rosenbach T., Fichner I., Numberg W., Stuting S., Von-Stebut E., Worm M., Makki A., Jurgovsky K., Kolde G. et Henz B.M. (1996) Treatment of melanoma cells with the synthetic retinoid CD437 induces apoptosis via activation of AP-1 *in vitro*, and causes growth inhibition in xenografts *in vivo*. *J. Cell-Biol.*, 135 : 1889-1898.
- Schroder E.W., Rapaport E., Kabcenell A.K., Black P.H. (1982) Growth inhibitory and stimulatory effects of retinoic acid on murine 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 1549-1552.
- Schulze-Osthoff K., Walczak H., Droge W., Krammer P.H. (1994) Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. Cell Biol.* 127 : 15-20.
- Schwartz L.M., Smith S.W., Jones M.E.E., Osborne B.A. (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis ? *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90 : 980-984.
- Schwartzman R.A., Cidlowski J.A. (1994) Glucocorticoids-induced apoptosis of lymphoid cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 105 : 347-354.
- Seewald V.L., Johnson B.S., Parker M.B., Collins S.J. et Swisshelm K. (1995) Expression of retinoic acid receptor b mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth Diff.*, 6 : 1077-1088.
- Seewaldt V.L., Kim J.H., Cadwell L.E., Johnson B.S., Swisshelm K. et Collins S.J. (1997) All-trans-retinoic acid mediates G1 arrest but not apoptosis of normal human mammary epithelial cells. *Cell Growth Diff.*, 8 : 631-641.
- Seigneurin et Guillaud (1991) L'antigène Ki-67, marqueur du cycle cellulaire et de la prolifération tumorale. *Pathologie Biologie*, 39 : 1020-1028.
- Shao Z.M., Dawson M.I., Xiao S.L., Rishi A.K., Sheikh M.S., Han Q.X., Ordonez J.V., Shroot B. Et Fontana J.A. (1995) p53 independent G0/G1 arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells. *Oncogene*, 11 : 493-504.
- Shi L., Nishioka W.K., Th'ng J., Bradbury E.M., Litchfield D.W. et Greenberg A.H (1994) Premature p34^{cdc2} activation required for apoptosis. *Science*, 263 : 1143-1145.
- Shiao R.T., Miglietta L., Khera S.Y., Wolfson A et Freter (1995) Dexamethasone and suramin inhibit cell proliferation and interleukin-6-mediated immunoglobulin secretion in human lymphoid and multiple myeloma cell lines. *Leukemia and Lymphoma*, 17 : 485-494.

- Shima Y., Nishimoto N., Ogata A., Fujii Y., Yoshisaki Y. et Kishimoto T. (1995) Myeloma cells express Fas antigen/APO-1 (CD95) but only some are sensitive to anti-Fas antibody resulting in apoptosis. *Blood*, 85/3 : 757-764.
- Sherr C. (1994) G1 phase progression: cycling on clue. *Cell*, 73 : 1059-1065.
- Sidell N. et Horn R. (1985) Properties of human neuroblastoma cells following induction by retinoic acid. In 'Advances in neuroblastoma research' (A. Evans, G. D'Angio et R. Seeger, eds), pp203-211. Liss, New-York.
- Sidell N., Taga T., Hirano T., Kishimoto T. et Saxon A. (1991) Retinoic acid-induced growth inhibition of a human myeloma cell line via down-regulation of IL-6 receptors. *J. of Immunol.*, 146 : 3809-3814.
- Siegel D., Niesvizky R., Miller W.H., Busquets X., Michaeli J. (1992) All trans retinoic acid (ATRA) and interferon α (IFN α) synergistically inhibit myeloma cell growth and induce retinoic acid receptor α (RAR α) expression. ASH Meeting, Anaheim, Abs. 473.
- Simboli-Campbell M., Narvaez C.J., Van-Weelden K., Tenniswood M. et Welsh J. (1997) Comparative effects of 1,25(OH)₂D₃ and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 42/1 : 31-41.
- Smith M.A., Parkinson D.R., Cheson B.D. et Friedman M.A. (1992) Retinoids in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.*, 10 : 839-863.
- Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins : activation, costimulation, and death. *Cell*, 76 : 959-962.
- Smith S.W., McLaughlin K.A., Osborne B.A. (1995) Molecular events in thymocytes apoptosis. In *Apoptosis in Immunology* G. Kroemer, C. Martinez-A. Eds Springer-Verlag, p. 147-162.
- Solary E., Bertrand R. et Pommier Y. (1993) Le rôle de l'apoptose dans la genèse et le traitement du cancer. *Médecine/Sciences*, 9 : 667-675.
- Steller H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449.
- Streichert L.C., Pierce J.T., Nelson J.A. et Weeks J.C. (1997) Steroid hormones act directly to trigger segment-specific programmed cell death of identified motoneurons *in vitro*. *Dev. Biol.*, 183/1 : 95-107.
- Stunnenberg H.G. (1993) Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors. *Bioassays*, 15 : 309-315.
- Su I.J., Cheng A.L., Tsai T.F., Lay J.D. (1993) Retinoic acid-induced apoptosis and regression of a refractory Epstein-Barr virus-containing T cell lymphoma expressing multidrug-resistance phenotype. *Br. J. Haematol.*, 85 : 826-?
- Su I.J., Lay Z.D., Cheng A.L. et Chang Y.C. (1994) Modulation of retinoic acid receptor α , growth factors and proto-oncogenes in retinoic acid-induced apoptosis of Ki-1 lymphoma cell line. *Int. J. Oncol.*, 4 : 1089-1095.

- Supino R., Crosti M., Clerici M., Warlters A., Cleris L., Zupino F. et Formelli F. (1996) Induction of apoptosis by fenretinide (4HPR) in human ovarian carcinoma cells and its association with retinoic acid receptor expression. *Int. J. Cancer*, 65 : 491-497.
- Suto N., Ikura K., Shinagawa R. et Sasaki R. (1993) Identification of promoter region of guinea pig liver transglutaminase gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1172/3 : 319-322.
- Szondy Z., Molnar P., Nemes Z., Boyiadzis M., Kedei N., Toth R. et Fesus L. (1997) Differential expression of tissue transglutaminase during in vivo apoptosis of thymocytes induced via distinct signalling pathways. *FEBS Lett.*, 404 : 307-313.
- Taetle R., Dos Santos B., Akamatsu Y., Koishihara Y. et Ohsugi Y. (1995) Effects of all-trans retinoic acid and anti-growth factor receptor antibodies on growth and programmed cell death of human myeloma cells. *ASH 1995, Blood*, 86, suppl.1 : abs. 743.
- Tahayato A. (1996) Rôles des processus de phosphorylation et déphosphorylation dans le mécanisme d'action des rétinoïdes. Thèse 1996.
- Takahashi A. et Earnshaw W.C. (1996). ICE-related proteases in apoptosis. *Curr. Opin. Gen. and Dev.* 6: 50-55.
- Takayama S., Sato T., Krajewski S., Kochel K., Irie S., Millan J.A. et Reed J.C. (1995) Cloning and functional analysis of BAG-1, a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, 80 : 279-284.
- Thein R. et Lotan R. (1982) Sensitivity of cultured human osteosarcoma and chondrosarcoma cells to retinoic acid. *Cancer Res.*, 42 : 4771-4775.
- Theodoro J.G. et Branton P.E. (1997) Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. of Virol.*, 71/3 : 1739-1746.
- Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.
- Tinnemans M.M.F.J., Lenders M.H.J.H., Ten Velde G.P.M., Ramaekers F.C.S. et Schutte B. (1995) Alterations in cytoskeletal and nuclear matrix-associated proteins during apoptosis. *Eur. J. Cell. Biol.*, 68 : 35-46.
- Uren A.G. et Vaux D.L. (1996) Molecular and clinical aspects of apoptosis. *Pharmacol Ther*, 72/1 : 37-50.
- Valentine M.A., Licciardi K.A. (1992). *Eur. J. Immunol.* 22: 3141-3148.
- Van den Eijnde S., Boshart L., Reutelingsperger C.P.M., De Zeeuw C.I. et Vermeij-Keers C. (1997) Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo : a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Diff.*, 4 : 311-316.
- Van Heerde W.L., De Groot P.G. et Reutelingsperger C.P.M. (1995) The complexity of the phospholipid binding protein annexin V. *Thromb Haemost.*, 73 : 172-179.
- Verhoven B., Schlegel R.A. et Williamson P. (1995) Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 182 : 1597-1601.

- Wahli W. and Martinez E. (1991) Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *Faseb J.*, 5 : 2243-2249.
- Walker P.R., Smith C., Youdale T., Leblanc J, Withfield J.F. and Silorska M. (1991) Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptotic cell death in thymocytes. *Cancer Res*, 51:1078-1085.
- Walker P.R. et Sikorska M. (1994) Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 72:621.
- Wang J.Y.J. (1997) Retinoblastoma protein in growth suppression and death protection. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 7 : 39-45.
- Wertz I.E. et Hanley M.R. (1996) Diverse molecular provocation of programmed cell death. *TIBS*, 21: 359-364.
- Westendorf J.J., Mammert J.M. et Jelinek D.F. (1995) Expression and function of Fas (APO-1/CD95) in patient myeloma cells and myeloma cell lines. *Blood*, 85/12 : 3566-3576.
- White H. (1996) Life, death, and pursuit of apoptosis. *Genes and Development*, 10 : 1-15.
- White K., Grether M.E., Abrams J.M., Young L., Farrell K. et Steller H. (1994) Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science*, 264 : 677-683.
- Wilcken N.R.C., Sarcevic B., Musgrove E.A. et Sutherland R.L. (1996) Differential effects of retinoids and antioestrogens on cell cycle progression and cell cycle regulatory genes in human breast cancer cells. *Cell growth Diff.*, 7 : 65-74.
- Williams G. T. et Smith C.A. (1993) Molecular regulation of apoptosis : genetic controls on cell death. *Cell*, 74 : 777-779.
- Wolbach SB, Howe P.R. (1925) Tissue changes following deprivation of fat-soluble vitamin A. *J. Exp. Med.*, 42 : 753.
- Woronicz J.D., Cainan B., Ngo W. et Winoto A. (1994) Requirement for the orphan steroid receptor nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature*, 367 : 277-281.
- Wu M., Lee H., Bellas R.E., Schauer S.L., Arsuria M., Katz D., Fitzgerald M.J., Rothstein T.L., Sherr D.H. et Sonenshein G.E. (1996) Inhibition of NF- κ B/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.*, 15/17 : 4682-4690.
- Wyllie A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284 : 555-556.
- Yang E et Korsmeyer S.J. (1996) Molecular thanatopsis : a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*, 88/2 : 386-401.
- Yang Y., Mercep M., Ware C.F. et Ashwell J.D. (1995) Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J. Exp. Med.*, 181 : 1673-1682.
- Yang Y., Vacchio M.S. et Ashwell (1993) 9-cis retinoic acid inhibits activation-driven T-cell apoptosis: Implications for retinoid X receptor involvement in thymocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 6170-6174.

- Yang Y., Minucci S., Ozato K., Heyman R.A. et Ashwell J.D. (1995) Efficient inhibition of activation-induced Fas ligand up-regulation and T cell apoptosis by retinoids requires occupancy of both retinoid X receptors and retinoic acid receptors. *J. Biol. Chem.*, 270/31 : 18672-18677.
- Yonish-Rouach E., Resnitsky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A., Oren M (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukine-6. *Nature*, 352 : 345-347.
- Yoshida A., Ueda T., Wano Y., and Nakamura T. (1993) *Jpn. J. Cancer Res.* 84 : 566-573.
- Zacharchuk C.M., Mercep M., Chakraborti P., Simons S.S. Jr. et Ashwell J.D. (1990) Programmed T cell death :cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J. Immunol.*, 145 : 4037-4045.
- Zakeri Z.F., Quaglino D, Latham T et Lockhin R.A. (1993) Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *Faseb J.*, 7 : 470-478.
- Zauli G., Visani G., Bassani A., Caramelli E., Ottaviani A., Bertolaso L., Bertagnolo V., Borgatti P. Et Capitani S. (1996) Nuclear translocation of protein kinase C- α and ζ isoforms in HL-60 cells induced to differentiate along the granulocytic lineage by all-trans retinoic acid. *Brit. J. Haematol.*, 93 : ?- ?.
- Zha H., Aimé-Sempé C., Sato T., Reed J.C. (1996) Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.*, 271 : 7440-7444.
- Zhang J. et Jacob S.T. (1990) Purification and characterization of a novel factor which stimulates rat ribosomal gene transcription in vitro by interacting with enhancer and core promoters elements. *Mol. Cell. Biol.*, 10 : 5177-5186.
- Zhivotovsky B., Burgess D.H. et Orrenius S. (1996). Proteases in apoptosis. *Experientia* 52: 968-978.
- Zhang L.X., Mills K.J., Dawson M.I., Collins S.J. et Jetten A.M. (1995) Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR α -dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J. Bol. Chem.*, 270/11 : 6022-6029.

LISTE DES FIGURES

REVUE GENERALE :

Figure 1 : Fonctions de la mort cellulaire programmée dans le développement animal

Figure 2 : Changements morphologiques essentiels dans l'apoptose, à droite et dans la nécrose, à gauche

Figure 3 : Différentes voies possibles de dégradation observées pendant le processus apoptotique

Figure 4A : Réponses cellulaires à des signaux externes et internes

Figure 4B : Modèle hypothétique pour la régulation de la mort par apoptose

Figure 5 : Modèle de signalisation de l'apoptose induite par Fas

Figure 6 : Une cascade hypothétique d'activation de protéases dans l'apoptose

Figure 7A : Comparaison de la structure des protéines de la famille Bcl-2

Figure 7B : Bad est un régulateur négatif de l'apoptose

Figure 8A : Structures de ligands connus pour les récepteurs d'hormones nucléaires

Figure 8B : Membres connus de la superfamille des récepteurs nucléaires

Figure 9A : Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires

Figure 9B : Homologies de séquence des différents domaines de hRAR α et ceux des autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires.

Figure 10 : Trois groupes de récepteurs suivant leur configuration sur l'ADN

Figure 11 : Mécanisme d'action des rétinoïdes dans la cellule

Figure 12A : Structure des principaux rétinoïdes naturels

Figure 12B : Structure de quelques rétinoïdes synthétiques

RESULTATS :

Figure 1 : Croissance d'une population de cellules RPMI 8226 cultivées en présence ou non d'ATRA (1 μ M) ou du 9-cis RA (1 μ M).

Figure 2 : Prolifération des cellules RPMI 8226 étudiée par incorporation de thymidine tritiée après 48h de traitement par l'ATRA (1 μ M) et l'AR 9-cis (1 μ M).

Figure 3 : Prolifération des cellules RPMI 8226 mesurée par immunocytochimie de l'antigène Ki-67 après 3 jours de traitement en présence (B) ou non (A) d'ATRA (1 μ M).

Figure 4 : Morphologie des cellules RPMI 8226 en coloration May-Grünwald Giemsa (MGG, I), ou au Hoechst (II), ou à l'annexine V (III).

Figure 5 : Morphologie des cellules RPMI 8226 après six jours de traitement en présence d'ATRA (1 μ M) ou non, observée en microscopie électronique

Figure 6 : Evolution du nombre de cellules vivantes, de cellules Ki-67+ et de cellules apoptotiques (caractérisées par la coloration MGG, de Hoechst ou par la méthode TUNEL) après 6 jours de traitement en présence (B) ou non (A) d'ATRA (1 μ M).

Figure 7 : Marqueurs biochimiques de l'apoptose

Figure 8 : Mesure de l'activité enzymatique de la TGt après 48h de traitement par l'ATRA (1 μ M) ou du 9-cis RA (1 μ M).

Figure 9 : Evolution de l'activité enzymatique de la TGt dans les cellules RPMI 8226 après traitement ou non par l'ATRA (1 μ M) pendant 6 jours.

Figure 10 : Morphologie des cellules RPMI 8226 en coloration MGG après 6 jours de traitement par l'ATRA (1 μ M) et sélection avec des billes magnétiques marquées à l'annexine V.

Figure 11 : Effet de l'ATRA (1 μ M) sur la PKC δ :

Figure 12 : Effet de l'ATRA (1 μ M) sur la lamine B.

Figure 13 : Effet de l'ATRA (1 μ M) sur la dégradation de la lamine B détectée par Western blot dans les cellules RPMI 8226, après 6 jours de traitement (cf tableau).

Figure 14 : Effet de l'ATRA (1 μ M) sur l'expression de Bcl-2 détectée par IFI après 2 jours de traitement.

Figure 15 : Croissance d'une population de cellules U266 cultivées en présence ou non d'ATRA (1 μ M) ou du 9-cis RA (1 μ M). Les cellules excluant le bleu trypan sont comptées chaque jour.

Figure 16 : Prolifération des cellules U266 étudiée par incorporation de thymidine tritiée après 48h de traitement par les agents indiqués.

Figure 17 : Quantification des effets de l'ATRA sur l'apoptose des cellules U266 appréciée par coloration au MGG, Hoechst et TUNEL, après 6 jours de traitement .

- Figure 18** : Mesure de l'activité enzymatique de la TGt dans les cellules U266 après 48h de traitement par les agents indiqués.
- Figure 19** : Schéma récapitulatif des différents événements étudiés au cours de l'apoptose cellules RPMI 8226 induites par l'ATRA.
- Figure 20** : Mise en évidence par Northern blot des transcrits RAR α,β et γ et RXR α,β et γ dans les cellules RPMI 8226.
- Figure 21** : Croissance d'une population de cellules RPMI 8226 cultivées en présence ou non d'ATRA, de CD367 (spécifique des RARs) et de CD2425 (spécifique des RXRs).
- Figure 22** : Prolifération des cellules RPMI 8226 testée par incorporation de thymidine tritiée après 48h de traitement par les agents indiqués.
- Figure 23** : Quantification des effets de l'ATRA, du CD367, du CD2425 sur l'apoptose des cellules RPMI 8226 appréciée par coloration au MGG, Hoechst et TUNEL, après 6 jours de traitement .
- Figure 24** : Mesure de l'activité enzymatique de la TGt après 48h de traitement par les agents indiqués.
- Figure 25** : Morphologie des cellules RPMI 8226, marquées par la méthode TUNEL, après 6 jours de traitement par l'ATRA ou le CD367 et/ou le CD2425.
- Figure 26** : Croissance d'une population de cellules RPMI 8226 cultivées en présence d'ATRA et/ou CD367 et/ou CD 2425. Les cellules excluant le bleu trypan sont comptées chaque jour.
- Figure 27** : Prolifération des cellules RPMI 8226 étudiée par incorporation de thymidine tritiée après 48h de traitement par les agents indiqués.
- Figure 28** : Mesure de l'activité enzymatique de la TGt après 48h de traitement par les agents indiqués (utilisés seuls ou en association).
- Figure 29** : Quantification des effets de l'ATRA et/ou de rétinoïdes de synthèse sur l'apoptose des cellules appréciée par coloration au MGG, Hoechst, TUNEL, après 6 jours de traitement.
- Figure 30** : Morphologie des cellules RPMI 8226 appréciée par la coloration MGG, après traitement par différents rétinoïdes utilisés seuls ou associés.
- Figure 31** : Morphologie des cellules RPMI 8226, appréciée par la coloration de Hoechst (I), la méthode TUNEL (II) et la détection de la TGt (III), après 6 jours de traitements avec des rétinoïdes.
- Figure 32** : Mise en évidence de la lamine B détectée par IFI, dans les cellules RPMI 8226, après 6 jours de traitement par les rétinoïdes, utilisés seuls ou en association.
- Figure 33** : Morphologie des cellules RPMI 8226 après six jours de traitement par l'ATRA (1 μ M) ou l'association ATRA (1 μ M) + CD367 (1 μ M), observée en microscopie électronique

- Figure 34** : Morphologie des cellules RPMI 8226, appréciée après coloration par le MGG, après 6 jours de traitement par l'association ATRA (0,1 μ M)+CD2425 (1 μ M)
- Figure 35** : Mise en évidence des lamines par IFI, dans les cellules RPMI 8226, traitées par l'ATRA (0,1 μ M)+CD2425 (1 μ M).
- Figure 36** : Croissance d'une population de cellules RPMI 8226 cultivées en présence d'ATRA (0,1 μ M, A), ou de rétinoïdes sélectifs des RAR γ : CD437 (10^{-9} M, B) et CD666 (10^{-9} M, C), utilisés seuls ou en association avec un rétinoïde sélectif des RXRs (CD2425, 10^{-8} M) et/ou un antagoniste RAR $\beta\gamma$ (CD2665, 10^{-7} M).
- Figure 37** : Caractérisation de l'apoptose induite par le CD 437 (10^{-9} M) dans les cellules RPMI 8226 après 7h de traitement.
- Figure 38** : Quantification des effets de l'ATRA, du CD437 et du CD666, utilisés seuls ou en associations à différents rétinoïdes (voir légende) sur l'apoptose dans les cellules RPMI 8226 (A), U266 (B) et L363 (C), appréciée par coloration MGG, Hoechst et TUNEL, après 7h de traitements.
- Figure 39** : Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'induction de l'apoptose dans les cellules RPMI 8226 après 7h de traitement par le CD437 10^{-9} M.
- Figure 40** : Effets du CD437 (10^{-9} M) sur le remaniement et la dégradation de la lamine B dans les cellules RPMI 8226 après 7h de traitement :
- Figure 41** : Effets des rétinoïdes RAR γ sélectifs, seuls ou associés avec un RXR sélectif et/ou un antagoniste RAR β,γ sur l'activité enzymatique de la TGt dans les cellules RPMI 8226.
- Figure 42** : Prolifération des cellules RPMI 8226 étudiée par incorporation de thymidine tritiée après 48h de traitement par les agents indiqués.
- Figure 43** : Croissance d'une population de cellules RPMI 8226 cultivées en présence d'ATRA et/ou d'interféron α (IFN α). Les cellules excluant le bleu trypan sont comptées chaque jour.
- Figure 44** : Quantification des effets de l'ATRA et de l'IFN α sur l'apoptose des cellules RPMI 8226 appréciée par coloration au MGG, Hoechst et TUNEL, après 6 jours de traitement .
- Figure 45** : Mesure de l'activité enzymatique de la TGt après 48h de traitement par les agents indiqués.

ARTICLE :

Fig. 1 : Effects of RA, Dex and RU486, an antiglucocorticoid, on RPMI 8226 cells growth.

Fig. 2 : Effects of RA, Dex, and RU486 on the rate of DNA synthesis.

Fig. 3 : Morphologic aspect of RPMI 8226 after treatment with RA.

Fig. 4 : Hoechst 33258 staining of RPMI 8226 cells nuclei.

Fig. 5 : Quantification of apoptotic cells after treatment with RA and/or Dex and RU486.

Fig. 6 : DNA fragmentation analysis by gel electrophoresis.

Fig. 7 : In situ labeling of DNA strand breaks.

Fig. 8 : Tissue transglutaminase activity in RPMI 8226 cells treated with RA, Dex or RU486.

Fig. 9 : Indirect immunofluorescence detection of tissue transglutaminase in RPMI 8226.

Figure 46 : Morphologie des cellules RPMI 8226 après six jours de traitement par l'ATRA ($1\mu\text{M}$) ou l'association ATRA ($1\mu\text{M}$) + Dex ($0,5\mu\text{M}$), observée en microscopie électronique

Figure 47 : Détection de la lamine B par IFI dans les cellules RPMI 8226 traitées pendant 6 jours.

LISTE DES TABLEAUX

REVUE GENERALE :

Tableau I : Physiologie de l'apoptose

Tableau II : Caractéristiques de la nécrose et de l'apoptose

Tableau III : Endonucléases impliquées dans la fragmentation de l'ADN

Tableau IV : Signaux activateurs et inhibiteurs d'apoptose

Tableau V : Résumé des caractéristiques des isoformes de PKC

Tableau VII : Protéases de la famille ICE/CED-3

Tableau VIII : Cibles des protéases apoptotiques

Tableau VIII: Principales cibles des protéases apoptotiques

Tableau IX : Présentation des membres de la famille Bcl-2

Tableau X : Apoptose et pathologie

Tableau XI : Inhibition de la croissance de cellules tumorales humaines par l'acide rétinoïque

Tableau XII : Rétinoïdes et apoptose

RESULTATS

Tableau I : Apoptose induite par l'ATRA et des rétinoïdes de synthèse RAR et RXR spécifiques (CD367 et CD2425).

Tableau II : Apoptose induite par l'ATRA et par des associations de rétinoïdes avec un excès de ligand RAR (CD367).

Tableau III : Apoptose induite par l'ATRA et par des associations de rétinoïdes avec un excès de ligand RXR (CD2425).

Tableau IV : Rétinoïdes de synthèse utilisé dans cette étude.

Tableau V : Semi-quantification de l'apoptose versus la nécrose dans les cellules RPMI 8226.

Tableau VI : Effets de l'actinomycine D et de la cycloheximide sur l'induction par le CD437 10^{-9} M de l'apoptose versus nécrose dans les cellules RPMI 8226 après 7h de traitement.

Tableau VII : Apoptose induite par l'ATRA et par l'association ATRA + Dex.

RESUME

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne très grave qui reste incurable. L'acide rétinoïque tout trans (ATRA) suscite actuellement un intérêt considérable en chimiothérapie anticancéreuse.

Dans cette étude nous avons démontré l'effet inhibiteur de la prolifération et inducteur de l'apoptose de l'ATRA dans un modèle expérimental d'origine humaine : les cellules myélomateuses de la lignée RPMI 8226. Différents marqueurs de l'apoptose ont été analysés : des marqueurs classiques tels que l'activation d'endonucléases et l'induction de la TGt, et des événements concernant des protéines qui seraient des cibles directes (PKC δ , lamine B) ou indirectes (phosphatidyl-sérines) de l'action des caspases apoptotiques.

Nous avons ensuite montré que les RARs et les RXRs étaient tous deux impliqués dans les effets biologiques de l'ATRA mais qu'un certain équilibre entre leur activation respective était nécessaire pour produire ces effets. Pour étayer ces résultats, les associations de l'ATRA avec des rétinoïdes sélectifs de chaque sous-classes de récepteurs (le CD367, sélectif des RARs et le CD2425, sélectif des RXRs) ont été testés. L'association ATRA+CD367 a révélé un cas surprenant de modification du programme apoptotique induit par l'ATRA. En testant un rétinoïde sélectif des RAR γ , le CD437, nous avons eu la surprise de voir, qu'utilisé seul, à 10⁻⁹M, il provoquait rapidement (8h) et de façon massive (85 % des cellules) une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose.

Enfin, différentes associations de l'ATRA avec des agents tels que la dexaméthasone (Dex) ou l'IFN α , qui font partie du traitement de la maladie, ont été testés en raison de l'incidence que prennent les traitements combinés dans le MM. Un des résultats le plus marquant est la modulation significative des effets de l'ATRA par la Dex : en effet, elle inhibe le pourcentage d'apoptose induite par l'ATRA et en plus en modifie le programme. De manière surprenante, ces résultats suggèrent un possible antagonisme entre l'ATRA et la Dex.

MOTS-CLES : apoptose, acide rétinoïque, rétinoïdes de synthèse, myélome multiple, dexaméthasone, transglutaminase tissulaire.

