N° d'ordre :

55 206. Baol 229

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Option : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

DES C. FI TECHN DES C. FI TECHN STAIND & TILLE

Robert-Alain TOILLON

CARACTERISATION DES EFFETS APOPTOTIQUES DES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES NORMALES SUR LES CELLULES CANCEREUSES DE SEIN.

Soutenue le 2 octobre 2001 devant la commission d'examen :

Président :	Pr. Hubert HONDERMARCK
Rapporteurs :	Pr. Guy LECLERC
	Pr. Eric SOLARY
Examinateurs :	Pr. Fabien CALVO
	Pr. Jean-Philippe PEYRAT
Directeur de thèse :	Pr. Xuefen LE BOURHIS

A mes parents, A Blandine

Avant-propos

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biologie du Développement (USTL), je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à :

Messieurs les Professeurs Bénoni Boilly et Xavier Desbiens, qui se sont succédés en tant que directeur du laboratoire pour l'accueil et le soutien qu'ils m'ont apportés lors de la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck qui m'a permis de réaliser ce travail au sein de son équipe et qui me fait aujourd'hui l'honneur de présider le jury de cette thèse. Hubert, merci pour les discussions sur l'apoptose et les facteurs de croissance, ton aide et ton humour...

Madame le Professeur Xuefen Le Bourhis qui a dirigé, soutenu et encadré mon travail depuis le DEA. Sa pugnacité, sa disponibilité et sa gentillesse m'ont permis de mener à bien ce travail. Sois assurée, Xue, de ma plus profonde reconnaissance et de toute mon amitié.

Je remercie également les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail : Messieurs les rapporteurs,

Le Professeur Guy Leclercq (Institut Jules Bordet, Bruxelles, Belgique),

Le Professeur Eric Solary (INSERM U517, Dijon, France),

Messieurs les examinateurs,

Monsieur le Professeur Fabien Calvo (Hôpital Saint-Louis, Paris, France),

Monsieur le Professeur Jean-Philippe Peyrat (Centre Oscar Lambret, Lille, France).

Je remercie également toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail : le Pr. Pellerin (CHRU, Lille) ; le Dr. D. Wooters (INSERM U459, Lille), le Dr. X. Ronot (UJF, Grenoble), N. Jouy (IFR 22, Lille), le Dr. P.E. Sautière (UPRES-A 8017, Villeneuve d'Ascq) ; le Dr. J. Lemoine et X. Czesack (CNRS UMR 8576, Villeneuve d'Ascq) ; le Pr. Y. Le Bouc, le Dr. S. Babajko et le Dr. J.M. Ricort (INSERM U 515, Paris) et enfin D. Bernard (EP 560, IBL, Lille).

Enfin, je ne voudrais pas oublier toutes les personnes du Laboratoire de Biologie du Développement et du bâtiment SN3 qui ont apporté leurs connaissances scientifiques mais aussi leur sympathie et leur amitié.

Et en particulier :

Valérie, la marmotte du SN3, merci pour tous les petits et gros coups de main, pour ta gentillesse, ne change rien à part les horaires de réveil...

David pour les coups de pouce, les prestations scéniques et les résultats du dernier grand prix de Formule 1,

Sylvain, l'ancien parmi les jeunes, qui nous a tout appris sur la biologie moderne, de ses concepts à la façon de les appliquer,

Séverine, qui me supporte depuis le DEA ; encore un peu de courage c'est la dernière ligne droite,

Fabien, roi du patch clamp et veilleur de nuit, pour sa sympathie et sa gentillesse,

Eric et Simon pour leur aide scientifique,

Et enfin, Laurent et Franck pour les réunions de laboratoire animées,

Merci à tous...

Résumé

La glande mammaire est l'objet d'une pathologie tumorale épithéliale fréquente. Cependant, l'évolution de la tumeur est extrêmement longue (6-8 ans) ; elle est soumise à des interactions complexes entre les cellules tumorales et le tissu normal environnant. Ainsi, nous avons démontré que les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) inhibent la croissance des cellules cancéreuses de sein. De plus, pour les lignées MCF-7 et T47-D qui sont hormono-sensibles et possèdent une protéine P53 fonctionnelle, l'inhibition de la croissance est due à une induction de l'apoptose. Cette induction de l'apoptose est sous contrôle de P53 et elle est médiée par Fas. En revanche, les CEMN ralentissent la prolifération des cellules MDA-MB-231 sans induire l'apoptose. Cette lignée représente un stade plus avancé du développement tumoral et possède une activition constitutive de NF-kB. L'inhibition de NF-kB restaure la sensibilité de ces cellules vis-à-vis de l'apoptose induite par les CEMN via Fas. D'autre part, nous avons tenté d'identifier les facteurs pro-apoptogènes produits par les CEMN. La caractérisation préliminaire indique que les facteurs proapoptogènes sont des protéines thermolabiles, présentant pour la plupart une masse moléculaire de 30 à 50 kDa. Nous avons discriminé six fractions actives issues d'HPLC préparative. L'analyse en spectrométrie de masse d'une quantité suffisante de ces fractions devrait permettre leur identification.

L'ensemble de ces travaux montre que les CEMN produisent des facteurs qui induisent l'apoptose des cellules cancéreuses de sein *via* Fas. Notre travail contribue à une meilleure compréhension des processus de rétrocontrôle exercés par les CEMN sur le développement mammaire tumoral. L'identification des facteurs pro-apoptogènes produits par les CEMN permettrait d'ouvrir une voie importante dans les stratégies thérapeutiques contre le cancer du sein.

Sommaire

Sommaire

Introduction	1
I- Développement normal de la glande mammaire	1
I.1- Développement de la glande mammaire	1
1) Etape prénatale	1
2) Etape pubertaire	2
3) Gestation et lactation	2
I.2- Anatomie et histologie de la glande mammaire	3
I.3- Variations de la glande mammaire durant la vie génitale	4
II- Développement cancéreux de la glande mammaire	5
II.1- Principaux types histologiques de cancer du sein	5
II.2- Oncogènes et anti-oncogènes	5
II.3- Interactions cellulaires dans le développement cancéreux	8
1) Facteurs stimulant la croissance des cellules cancéreuses de sein	8
a) Protéines de la matrice extracellulaire et protéases	9
b) IGFs (Insulin Growth Factors)	9
c) FGFs (Fibroblast Growth Factors)	10
d) HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor)	11
2) Facteurs inhibant la croissance des cellules cancéreuses de sein	11
Article 1 :	13
III- Rôles et contrôles de l'apoptose	22
III.1- Rôles physiologique et pathologique de l'apoptose	22
1) Rôle physiologique	22
2) Rôle pathologique	23
III.2- Caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose	24
III.3- Voies biochimiques de l'apoptose	25
1) Caspases	25
2) Récepteurs de mort	27
a) Fas	29
b) TNFR-1	30

3) Contrôle de la libération des facteurs mitochondriaux par la famille Bcl-2	
a) Relation structure/fonction des membres de la famille Bcl-2	
b) Localisation cellulaire des membres de la famille Bcl-2	
c) Rôle de la famille Bcl-2 dans la libération des facteurs mitochondriaux	32
IV- Inhibition de l'apoptose dans les cancers	35
IV.1- Diminution de l'interaction ligand/récepteur de mort	35
IV.2- Surexpression des FLIPs	
IV.3- Expression de SODD	
IV.4- Surexpression des IAPs	
IV.5- Surexpression des HSPs	

Matériels et méthodes
I- Cellules mammaires humaines
I.1- Lignées cancéreuses de sein
I.2- Cellules mammaires humaines normales
II- Culture cellulaire
II.1- Culture des lignées cancéreuses de sein 41
II.2- Cultures primaires des cellules normales de sein42
II.3- Production de milieu conditionné par les cellules épithéliales mammaires normales 42
II.4- Transfections
1) Transformation des bactéries 43
2) Extraction de l'ADN plasmidique 43
3) Transfections transitoires
III- Mesure de la croissance cellulaire
III.1- Croissance en monocouche 44
III.2- Croissance en gel de collagène45
III.3- Croissance en agar-mou
III.4- Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux
III.5- Détection de l'apoptose
1) Marquage au Hoechst
2) Technique TUNEL
3) Visualisation des échelles d'ADN 47
4) Marquage à l'annexine V

IV- Immunodétection des protéines	48
IV.1- Fractionnement cellulaire	48
IV.2- Western blot	49
IV.3- Détermination des marqueurs épithéliaux	50
V- Retard sur gel et super-shift	50
V.1- Préparation des extraits nucléaires	50
V.2- Préparation de la sonde	51
V.3- Hybridation et révélation	51
VI- Mesure d'activité de la PI3 kinase	52
VII- Caractérisation des protéines par spectrométrie de masse	52
VII.1- Concentration et purification des protéines pro-apoptogènes du MC-CEMN	52
VII.2- Electrophorèse et détection des protéines	54
VII.3- Digestion enzymatique et caractérisation par spectrométrie de masse	54
1) Préparation des protéines	54
2) Digestion des protéines	55
3) Extraction des fragments trypsiques du gel	55
4) Analyse en spectrométrie de masse	56
VIII- Western ligand blots.	56
Démarche expérimentale	57
Résultats	59

PARTIE 1 : Effets des CEMN sur la croissance des cellules cancéreuses de		
sein		
Article 2 :	60	
Article 3 :	68	
Article 4 :	101	

PARTIE 2 : Purification et caractérisation des facteurs	pro-apoptogènes
produits par les CEMN	129
I- Implications de facteurs pro-apoptogènes connus	

II- Purification et caractérisation des facteurs pro-apoptogènes produ	uits par les
CEMN.	132
II.1- Pré-caractérisation des facteurs pro-apoptogènes	132
II.2- Purification des facteurs pro-apoptogènes produits par les CEMN	135
II.3- Caractérisation des fractions obtenues par HPLC.	138
II.4- Discussion	

Discussion	générale		
------------	----------	--	--

Bibliographie	
---------------	--

Introduction

I- Développement normal de la glande mammaire

I.1- Développement de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire est lent et se poursuit jusqu'à l'âge adulte. Il se déroule essentiellement avant la naissance et ne s'achève réellement que pendant la grossesse et l'allaitement (Fig. 1).



Figure 1 : Les différentes phases de la croissance et du fonctionnement de la glande mammaire (d'après Espie et Gorins, 1995).

1) Etape prénatale

Au cours de la 4^{ième} semaine du développement embryonnaire, apparaissent les bourgeons mammaires primitifs le long de la crête mammaire (ou ligne lactéale) (Fig. 2). Dès la 6^{ième} semaine, la crête mammaire disparaît et seuls les bourgeons mammaires subsistent ; c'est la fin de l'étape embryonnaire (7^{ième} semaine). Au cours du 5^{ième} mois, les bourgeons mammaires vont émettre, dans le mésoderme sous-jacent, 15 à 20 prolongements cylindriques qui vont se ramifier, se dilater et se creuser pour former une lumière (futurs canaux galactophores) vers le 7-8^{ième} mois. A la naissance, la glande mammaire est restreinte à ce système de tubules très courts au sommet duquel affleure l'ébauche du futur mamelon. A la naissance, le mamelon fait saillie et l'aréole se pigmente légèrement. Le développement de la glande mammaire s'arrête alors chez le garçon.



Figure 2: Développement prénatal de la glande mammaire (d'après Espie et Gorins, 1995).

2) Etape pubertaire

De la naissance jusqu'à la puberté, la croissance de la glande mammaire est minime et isométrique. A la puberté, on note surtout une augmentation du volume due à l'augmentation de la masse graisseuse. Le développement des canaux galactophores et des acini reste modéré. D'autres modifications sont observées telles que la saillie du mamelon, la pigmentation et la saillie de l'aréole. Les lobules ne se forment que lors de la première ovulation (14-15 ans) et le sein prend alors sa forme normale de nullipare.

3) Gestation et lactation

Au cours de la gestation, on note l'extension des canaux galactophores et la différenciation des acini glandulaires. Cette différenciation des acini s'achève lors de la lactation ; les acini sont alors capables de produire du lait.





I.2- Anatomie et histologie de la glande mammaire

Le sein est constitué de la glande mammaire proprement dite qui débouche au niveau du mamelon (ou papille) et s'enfonce dans un tissu adipeux (Fig. 3). La glande mammaire est une structure ramifiée, organisée en 15 à 20 lobes. Chacun des lobes s'organise autour d'un canal galactophore apportant le lait au mamelon. A l'autre extrémité, le canal galactophore se ramifie au niveau des lobules mammaires en petits canalicules pour former les unités terminales ducto-lobulaires.

Le système lobulo-canalaire de la glande mammaire est constitué d'une assise continue de cellules épithéliales, doublée d'une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales. Ces deux couches cellulaires reposent sur une lame basale recouverte d'un manchon fibroblastique plus ou moins développé (Fig. 4 A).

Les acini ou alvéoles sont composés de cellules épithéliales, qui sécrètent le lait, et de cellules myoépithéliales. Celles-ci sont entourées d'une lame basale et d'un tissu mésenchymateux (ou tissu palléal), composé de fibroblastes et d'adipocytes, fortement irrigué par les vaisseaux sanguins (Fig. 4 B).



Figure 4: Histologie de la glande mammaire. A) Lobule mammaire. CI: canal intralobulaire; EC: extremités canalaires; TI: tissu de soutien intralobulaire; TE: tissu de soutien extralobulaire. B) Canal terminal intralobulaire. La couche interne de l'épithélium a un aspect cubique (C), tandis que la couche externe est constituée de cellules myoépithéliales (M) (d'après Stevens et Lowe, 1992).



<u>Figure 5</u> : Rôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire dans le contrôle du développement et de l'activité de la glande mammaire (d'après Houdebine, 1997).

ACTH : adrenocorticotropic hormone ; FSH : follicule stimulating hormone ; LH : luteinizing hormone ; hCS : human chorionic somatotropin ; TSH : thyroid stimulating hormone ; GH : growth hormone.

I.3- Variations de la glande mammaire durant la vie génitale

La prolifération et la différenciation des cellules épithéliales mammaires sont sous contrôle hormonal. Les hormones d'origines hypothalamo-hypophysaire, ovarienne, surrénalienne, placentaire et thyroïdienne jouent un rôle complexe dans ce développement (Fig. 5). Ainsi, les oestrogènes sont essentiels dans le contrôle de la croissance. Lors du cycle menstruel, la glande mammaire subit de légères modifications en fonction des phases du cycle. Ces variations morphologiques ont été divisées en cinq phases par Vogel *et al* (1981) correspondant aux stades du cycle menstruel :

-phase proliférative (j3 à j7). Les cellules épithéliales se multiplient, le stroma est très dense.

-phase folliculaire (j8 à j14). Les lobules sont de petite taille, peu de mitose dans les cellules épithéliales.

-phase lutéale (j15 à j20).

-phase sécrétoire (j21 à j27). Les cellules présentent une faible activité sécrétoire.

-phase menstruelle (j28 à j2). Elle est caractérisée par la résorption de l'hypertrophie par apoptose des cellules épithéliales.

Lors de la grossesse, l'activité proliférative est importante pendant les vingt premières semaines. Au cours du dernier trimestre, on constate l'accumulation de granules de sécrétion dans les cellules épithéliales lobulaires. Le mésenchyme s'amenuise au fur et à mesure du développement de l'appareil sécrétoire. Après l'accouchement, sous l'action de la prolactine, les cellules épithéliales secrètent le lait. Les acini sont distendus par l'accumulation des sécrétions dans la lumière des canaux galactophores et dans les cellules épithéliales. L'arrêt de la lactation entraîne, par une accumulation du matériel sécrétoire, la régression de la glande mammaire et son retour à un aspect "normal" de glande non gestante. Les cellules épithéliales sécrétrices sont éliminées par apoptose et phagocytose.

Lors de la ménopause, le sein va également subir des phénomènes d'involution caractérisés par une atrophie des structures galactophoriques et une hyalinisation du tissu palléal. Seuls 3 à 4 lobules subsistent.

II- Développement cancéreux de la glande mammaire

II.1- Principaux types histologiques de cancer du sein

Plus de 98% des cancers du sein sont des adénocarcinomes qui se développent à partir de l'épithélium glandulaire (carcinomes lobulaires) ou de l'épithélium des canaux galactophores (carcinomes canalaires). Dans de rares cas (environ 5-6%), les cellules cancéreuses prolifèrent à l'intérieur des lobules mammaires ou des épithéliums, sans rupture de la lame basale donc sans infiltration du tissu conjonctif. Ces carcinomes sont appelés respectivement carcinome lobulaire *in situ* (CLIS) et carcinome canalaire *in situ* (CCIS). Dans la majorité des cas, la lame basale est altérée ou détruite et les cellules cancéreuses infiltrent le tissu conjonctif ; ce sont des carcinomes lobulaires invasifs (CLI) (5 à 15% des cas) et des carcinomes canalaires invasifs (CCI) (75% des cas).

Les carcinomes *in situ* et invasifs sont parfois associés (0,7 à 4% des cas) à un adénocarcinome intraépidermique de la région de l'aréole, connu sous le nom de maladie de Paget.

II.2- Oncogènes et anti-oncogènes

La cancérogenèse est le résultat d'une succession d'étapes faisant évoluer une cellule normale en cellule cancéreuse. Ce processus est permis par l'altération progressive de l'expression de gènes favorisant (oncogènes) ou au contraire empêchant (anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs) le développement cancéreux (Macleod, 2000). Ces altérations confèrent aux cellules cancéreuses les capacités (Hanahan et Weinberg, 2000) :



<u>Figure 6</u> : Implication des oncogènes et anti-oncogènes dans les cascades de transduction des facteurs de croissance (adaptée de Hunter, 1997).

Les oncogènes sont indiqués en blanc sur fond noir et les anti-oncogènes sont indiqués en noir sur fond blanc .

-de se répliquer de façon indéfinie (immortalisation des cellules),

-de croître en l'absence de stimulations externes,

-d'être insensibles aux rétrocontrôles visant à modérer la prolifération cellulaire,

-d'échapper à la mort par apoptose,

-de favoriser l'angiogenèse de la tumeur,

-d'envahir les tissus adjacents et de métastaser.

Le nombre d'oncogènes et d'anti-oncogènes recensés ne cesse de s'accroître ; ils codent des protéines impliquées dans de nombreuses cascades de transduction telles que des récepteurs, des facteurs de transcription ou des protéines régulatrices du cycle cellulaire (Fig. 6). Parmi les oncogènes, la surexpression d'*erb-B2*, de *myc* ou du gène de la cycline D1 est fréquemment reportée.

Le gène *erb-B2* code un récepteur de type I des facteurs de croissance. Les ligands d'Erb-B2 ne sont pas encore clairement définis ; cependant, il semble qu'Erb-B2 forme des hétérodimères avec d'autres récepteurs de cette famille pour permettre la transduction du signal. Ainsi Erb-B2 peut se lier à Erb-B3 ; Erb-B3 se lie à de nombreux ligands mais ne possède pas de domaine tyrosine kinase fonctionnel. L'hétérodimérisation Erb-B3/Erb-B2 permettrait l'activation des signaux intracellulaires par l'engagement des domaines tyrosine kinases d'Erb-B2 (Klapper *et al*, 1999).

Dans les cancers du sein, on note une amplification génique ou une surexpression d'erb-B2. Dans la majorité des cas, cette surexpression est associée à une augmentation de la chimiorésistance des tumeurs et à un mauvais pronostic (Hynes et Stern, 1994; Klapper *et al*, 2000). Un anticorps neutralisant anti-Erb-B2 est aujourd'hui utilisé dans le traitement de certains cancers du sein.

c-myc est l'homologue cellulaire d'un oncogène viral, *v-myc*. Il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaires ainsi que l'apoptose. Bien que l'on sache que Myc agit comme facteur de transcription en



Figure 7 : Rôle de P53 dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (adaptée de Choisy-Rossi *et al*, 1998).

 \bigstar : induction ; \checkmark : inhibition.

association avec Max, son rôle exact dans les régulations cellulaires reste à éclaircir (Prendergast, 1999).

Une amplification de *c-myc* est retrouvée dans environ 15% des cancers du sein et cette augmentation est corrélée à un mauvais pronostic (Deming *et al*, 2000).

ccnd (ou *prad1*) code la cycline D1. Les protéines de cette famille contrôlent le cycle cellulaire en régulant l'activité des kinases cycline-dépendantes, avec pour conséquence la progression des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Les cancers du sein peuvent présenter une amplification génique mais également une surexpression de cette protéine (Hosokawa et Arnold, 1998). La présence d'une amplification associant le gène de la cycline D1 et les gènes *int2* (FGF-3) et *hst* (FGF-4) semble plus fréquente dans les tumeurs mammaires exprimant les récepteurs aux oestrogènes (environ 15% des cas) (Frierson *et al*, 1996).

En ce qui concerne les anti-oncogènes, l'expression de *p53* et *brca* est souvent altérée dans les cancers du sein.

p53 code une phosphoprotéine, le gène est porté par le bras court du chromosome 17 (17p13). P53 est un facteur de transcription intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose (Sheikh et Fornace, 2000a). L'activation de P53 permet la réparation de l'ADN par arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2. L'arrêt des cellules en phase G1 est induit par P21^{waf1} tandis que l'arrêt en phase G2 dépend de l'activation de la protéine 14-3-3 σ et/ou de GADD45. De nombreux gènes intervenant dans l'apoptose et la survie sont sous le contrôle de P53, notamment des gènes codant les récepteurs de mort (Sheikh et Fornace, 2000b), des membres de la famille Bcl-2 et des éléments intervenant dans la survie induite par les IGFs (IGF-I, IGF-R1, IGFBP-3) (Burns et El-Deiry, 1999) (Fig. 7). L'activation ou l'inhibition de l'expression de ces gènes conduisent à une majeure partie des effets pro-apoptogènes de P53. Cependant, les mécanismes dictant le choix entre arrêt du cycle et/ou



Figure 8 : Rôle des interactions cellulaires dans le contrôle de la croissance des cellules cancéreuses de sein.

induction de l'apoptose dépendent du contexte cellulaire et restent hypothétiques (Momand et al, 2000).

Dans les cancers du sein, les mutations de p53 sont retrouvées à des fréquences variables selon les études (de 15% à 60%) (Bautista et Theillet, 1997).

Les gènes *brca 1* et 2 codent des protéines nucléaires contribuant, entre autre, à la recombinaison homologue, à la réparation de l'ADN et à l'expression de certains gènes (Wang *et al*, 2000 ; Welcsh *et al*, 2000).

L'existence de cancers familiaux du sein et de l'ovaire ont permis de mettre en évidence sur le bras long du chromosome 17, le gène *brca1* (Miki *et al*, 1994). Un deuxième gène de prédisposition (*brca 2*) a été identifié sur le bras long du chromosome 13 (Wooster *et al*, 1995). Depuis, la perte du gène *brca1* a été trouvée dans des cancers du sein sporadiques dans plus de 50% des cas (Van Golen *et al*, 1999).

II.3- Interactions cellulaires dans le développement tumoral

Le développement tumoral ne dépend pas uniquement des cellules cancéreuses, il est également sous l'influence des cellules normales environnantes. En effet, il a été démontré que les interactions entre cellules tumorales et cellules normales influencent la croissance, l'invasion et la métastase des cellules tumorales (Fig. 8) (Hanahan et Weinberg, 2000).

1) Facteurs stimulant la croissance des cellules cancéreuses de sein

Le mésenchyme mammaire est constitué de divers types cellulaires et notamment des cellules endothéliales, des adipocytes et des fibroblastes. Dans les cancers du sein, les cellules tumorales induisent une activation des fibroblastes ; ces fibroblastes, en retour, secrètent de nombreux facteurs tels que des protéines de la matrice extracellulaire, des protéases et des facteurs de croissance qui favorisent le développement cancéreux (Tlsty et Hein, 2001 ; Elenbaas et Weinberg, 2001).

- 8 -

a) Protéines de la matrice extracellulaire et protéases

Les fibroblastes produisent de nombreux composants de la matrice extracellulaire tels que la laminine, du collagène de type IV et des protéoglycanes héparanes sulfatés (Elenbaas et Weinberg, 2001). Les composants de la matrice extracellulaire activent, *via* leur fixation à des récepteurs membranaires, des signaux de survie et de prolifération dans les cellules cancéreuses. De plus, la matrice extracellulaire contrôle la biodisponibilité des facteurs de croissance tels que les FGFs (Fibroblast Growth Factors) et le TGF (Transforming Growth factor).

Les fibroblastes produisent également de nombreuses protéases dont les stromélysines-1 et -3, les MMP-2 et -9 (Matrix Metallo-Protease) ou encore la MMP-1 (Heppner *et al*, 1996). Ces protéases induisent la libération par la matrice extracellulaire et la maturation de nombreux facteurs de croissance tels que le FGF-2, le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor) favorisant le développement cancéreux.

b) IGFs (Insulin Growth Factors)

L'IGF-I et l'IGF-II sont deux polypeptides de 7,6 et 7,4 kDa respectivement. Ils se lient à un récepteur de haute affinité de type tyrosine kinase : le récepteur de type I des IGFs (IGF-R1). Ils sont aussi capables d'activer le récepteur de l'insuline mais leur affinité est 100 fois moins forte pour ce récepteur. Il existe également un récepteur de type II des IGFs (IGF-R2) liant préférentiellement l'IGF-II. Ce récepteur ne possède pas d'activité tyrosine kinase et présente de fortes homologies avec le récepteur du mannose-6-phosphate. L'IGF-R2 ne semble pas intervenir dans la transduction des signaux mitogènes de l'IGF-II, son rôle reste donc à définir.

Les IGFs sont des facteurs de croissance qui jouent un rôle majeur dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses de sein (Peyrat *et al*, 1993; Resnicoff *et al*, 1995). Les

analyses de biopsies tumorales montrent que les fibroblastes en contact avec les cellules épithéliales mammaires normales expriment de l'IGF-I tandis que ceux environnants les cellules cancéreuses expriment de l'IGF-II (Yee *et al*, 1989; Paik, 1992; Rasmussen et Cullen, 1998). L'IGF-R1 est, quant à lui, surexprimé dans les cellules cancéreuses de sein (jusqu'à 14 fois plus d'IGF-R1 dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales) (Resnik *et al*, 1998). Cette surexpression du récepteur de type I est dépendante des oestrogènes (Stewart *et al*, 1990) et de P53 (Webster *et al*, 1996; Werner *et al*, 1996). Outre l'augmentation du nombre de récepteurs, l'activité kinasique de ces récepteurs est également accrue dans les cellules cancéreuses de sein (Resnik *et al*, 1998).

c) FGFs (Fibroblast Growth Factors)

Les FGFs forment actuellement une famille de 20 membres. Les FGFs sont des facteurs de croissance ayant des récepteurs de basse et de haute affinités. Les récepteurs de basse affinité sont des protéoglycanes de type héparane sulfaté (ou HSPG). Ils protégent les FGFs de la dégradation et contrôlent la biodisponibilité des FGFs. Il existe 4 types de récepteurs de haute affinité : FGF-R1, FGF-R2, FGF-R3 et FGF-R4. Ces récepteurs sont des récepteurs de type tyrosine kinase et sont caractérisés par la présence de 2 ou 3 boucles de type immunoglobuline sur leurs domaines extracellulaires.

Le FGF-2 et le FGF-7 ou KGF (Keratinocyte Growth Factor) ont été décrits comme des facteurs paracrines agissant sur la croissance des cellules épithéliales mammaires. Ainsi, les études *in vivo* démontrent que le FGF-7 est produit par les fibroblastes mammaires alors que le récepteur du FGF-7 (KGF-R, FGF-R2-IIIb) est exprimé par les cellules épithéliales mammaires (Imagawa *et al*, 1994 ; Bansal *et al*, 1997). Malgré ces constatations, il n'a pas été établi de relation certaine entre l'expression du FGF-7 ou de ses récepteurs et le pronostic des cancers du sein. Les études réalisées sur des explants mammaires ont montré que le FGF-2 est, quant à lui, essentiellement produit par les cellules myoépithéliales mammaires (Gomm *et*

al, 1991). Le FGF-2 est secrété et piégé par la matrice extracellulaire (Gomm *et al*, 1997) d'où il pourra être capté par les cellules épithéliales cancéreuses. Dans les cancers du sein, la valeur pronostique du FGF-2 est encore contestée (Eppenberger *et al*, 1998) mais il semble que la présence de ce facteur de croissance dans les tumeurs soit associée à une augmentation de la survie globale des patientes (Colomer *et al*, 1997 ; Smith *et al*, 1999).

d) HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor)

L'HGF/SF est un facteur de croissance formé de deux chaînes polypeptidiques glycosylées de 62 kDa et 30-32 kDa, il se lie à un récepteur de type tyrosine kinase composé de deux sous unités formant un hétérodimère.

L'HGF/SF est un facteur angiogène, motogène, mitogène et de survie. Ainsi, il a été reporté que les cellules cancéreuses de poumon sécrètent du FGF-2 et du PDGF qui entraînent une augmentation de la synthèse d'HGF/SF par les fibroblastes. L'HGF/SF sécrété par les fibroblastes stimule alors la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses ainsi que l'angiogenèse en agissant sur les cellules endothéliales (Nakamura *et al*, 1997).

Dans les cancers du sein, la quantité d'HGF/SF est plus importante dans la tumeur que dans le tissu adjacent et le taux d'HGF/SF circulant est augmenté chez 60% des patientes présentant des métastases (Yamashita *et al*, 1994). L'augmentation de l'HGF/SF est par ailleurs corrélée à un mauvais pronostic (Toi *et al*, 1998).

2) Facteurs inhibant la croissance des cellules cancéreuses de sein

De nombreux signaux inhibiteurs sont produits par les cellules normales pour maintenir l'homéostasie tissulaire et inhiber le développement tumoral. Ainsi, les cellules myoépithéliales produisent des facteurs inhibant la croissance et la migration des cellules cancéreuses de sein mais aussi l'angiogenèse (Xiao *et al*, 1999 ; Nguyen *et al*, 2000 ; Alpaugh *et al*, 2000). Les cellules épithéliales mammaires synthétisent quant à elles de nombreux facteurs inhibiteurs de croissance tels que le TGF- β 1, le MDGI, le TNF α , des interleukines et des IGFBPs. Le TGF- β 1 induit l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose des cellules dans les stades précoces de cancer du sein. Le MDGI (Mammary Derived Growth Inhibitor) est une protéine de la famille des FABP (Fatty Acid Binding Proteins), il inhibe la prolifération des cellules cancéreuses de sein. Le TNF α (Tumor Necrosis Factor) est une cytokine induisant un arrêt de la prolifération et/ou la mort des cellules cancéreuses de sein. Les interleukines-4, et -6 induisent l'apoptose des cellules cancéreuses de sein. Les IGFBPs (IGF Binding Proteins) sont des protéines s'associant aux IGFs, ils contrôlent la biodisponibilité et l'action des IGFs vis-à-vis des IGF-Rs. Les IGFBPs pourraient également agir indépendamment des IGFs sur des récepteurs spécifiques pour induire l'apoptose. Les protéoglycanes de type héparane sulfaté (HSPGs) sont des composants de la matrice extracellulaire nécessaires à l'action de certains facteurs de croissance. Les HSPGs peuvent également réguler de façon négative la croissance des cellules cancéreuses de sein.

Le rôle de ces inhibiteurs produits par les cellules épithéliales mammaires normales sur la prolifération des cellules cancéreuses de sein est discuté dans l'article 1.

Article 1 :

"Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells"

Cet article a été publié dans la revue :

"Breast Cancer Research and Treatment" (vol. 60, p: 251-258; 2000).



Breast Cancer Research and Treatment 60: 251-258, 2000. © 2000 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Report

Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells

Xuefen Le Bourhis, Robert-Alain Toillon, Benoni Boilly, and Hubert Hondermarck Equipe Facteurs de Croissance, Laboratoire de Biologie du Développement (UPRES 1033), Université des Sciences et Technologies de Lille, France

Key words: breast epithelial cells, cancer, growth inhibitors

Summary

Breast epithelial cells produce both mitogens and growth inhibitors which are involved in the control of mammary gland development through autocrine and paracrine pathways. While the mechanisms of action of several growth factors have been well established and related strategies proposed for breast cancer therapy, little is known concerning growth inhibitors. In this review, we present an overview of current information about major autocrine and paracrine growth inhibitors of breast epithelial cells, and we discuss their potential functions in the control of breast cancer development.

Introduction

Breast cancer is one of the most common cancers of women. The current methods of treatment which are based on local surgery with or without radiotherapy, and/or chemotherapy, have not improved the long term survival of patients. However, mammary tumor pathology progresses slowly, since it is estimated that the development of a tumor of 2 cm from one tumorcell requires 6-8 years. On the other hand, improving knowledge on mammary gland development, especially during post-lactational involution suggest that autocrine and paracrine factors controlling mammary tissue homeostasis might be potentially useful for breast cancer prevention and treatment. Elucidation of the mechanisms by which these growth inhibitors regulate normal and tumoral cell proliferation should contribute to the development of novel strategies for the prevention and therapy of breast cancer. This paper summarizes new information concerning major growth inhibitors of mammary epithelial cells and reviews their potentiel functions in the control of breast cancer development.

Mammary derived growth inhibitor (MDGI)

Mammary derived growth inhibitor (MDGI) was first purified from lactating bovine mammary gland and

biologically characterized in a mouse Ehrlich ascites mammary tumor suspension culture [1]. In monolayer culture, MDGI inhibits growth of normal human mammary epithelial cells-and is more important for cells at higher passage. MDGI also inhibits growth of the mouse mammary tumor cell line mMaCa 20177 and human breast tumor cell lines such as MaTu and T47-D. However, the inhibitory effect of MDGI requires serum starvation to trigger cells into quiescence [2]. Amino acid sequence analysis of the 14.5-kDa MDGI initially described revealed that it belongs to a familly of fatty acid-binding proteins (FABP) [3] involved in lipid metabolism by binding and intracellular transporting of long-chain fatty acids. However, presently, it is believed that MDGI does not exist as a distinct protein, it rather represents a mixture of adipocyte-type FABP (A-FABP) and heart-type FABP (H-FABP) [4, 5]. Moreover, the growth inhibitory activity can be exerted by H-FABP [6]. H-FABP from bovine heart and bovine mammary gland, recombinant MDGI act as growth inhibitors on primary mouse mammary epithelial cells. In mammary gland organ culture, growth inhibition is associated with functional differentiation (milk protein synthesis). Selective inhibition of endogenous MDGI expression by antisense oligonucleotides suppresses the appearance of alveolar end buds and lowers the casein level in organ culture. The inhibitory function of H-FABP does not

require binding of fatty acids, because a 11-amino acid sequence, represented in the COOH terminus of H-FABP, which does not bind fatty acid, can also mimic the activity of H-FABP [6]. It remains to be established whether A-FABP can also act as a growth inhibitor.

In addition, MDGI has been considered as a tumor suppressor, because immunostaining of sections of human breast tumors showed loss of immunoreactive MDGI protein in the neoplastic cells compared to its presence in adjacent normal epithelial cells [7]. Moreover, several breast cancer cell lines fail to express the MDGI gene: transfection of a MDGI expressing construct into breast cancer cell line MCF-7 results in reduced proliferation, enhanced cell differentiation in vitro and decreased tumor formation in nude mice [7]. Loss of MDGI expression in breast cancer cell lines and in primary breast tumors is associated frequently with hypermethylation of Hpall and Hkal sites upstream of the first exon, and a SacII site in the first intron of the MDGI gene. The importance of hypermethylation in repressing of MDGI transcription is reinforced by the use of 5-aza-deoxycytidine in breast cancer cell lines: demethylation of Hpall and Hkal sites upstream of the first exon, and a Sacll site in the first intron by 5-aza-deoxycytidine leads to expression of MDGI transcript mice [8]. The mechanism by which MDGI inhibits cell growth and induces cell differentiation is not clear. Although exogenous MDGI is able to elicit biological responses, the nature of its receptor is unknown.

Transforming growth factor-β (TGFβ)

TGFB isoforms are multifunctional polypeptides, each encoded by a different gene. TGFB1 is the best studied and is a disulfied-linked homodimer of 25 kDa. derived from a 390-amino-acid precursor. The precursor is cleaved to yield an N-terminal latency-associated peptide (LAP) and a C-terminal mature TGFB1 peptide which remain complexed with each other as a latent TGFB1; the latent TGFB1 is secreted and must then be activated by thrombospondin and plasmin to release the mature bioactive TGFB1 peptide. Active TGFB1 elicits its effects by binding to three surface receptors termed type I (RI). type II (RII) and type III (RIII). RI and RII are serine/threonine kinase receptors of 55 and 75 kDa, while RIII (β -glycan) is a proteoglycan of about 300 kDa. It has been suggested that RIII enhances TGFB1 binding to RII by directly presenting the ligands to RII. The TGF^{β1}-RII complex recognizes and binds to RI, forming an hetero-oligometic complex and phosphorylating RI. The activated RI phosphorylates Smad proteins which then move into the nucleus and associate with DNA- binding proteins. resulting in activation of transcription [9].

TGFB1 is a potent inhibitor of the growth of cells derived from epithelium. During mouse mammary gland development. TGFB1 selectively inhibits ductal elongation by causing the disappearance of the stem cells and rapid involution of ductal end buds [10]. Transgenic expression of TGFB1 targeted to the mammary epithelium inhibits the normal development of the ductal and lobular epithelium [11]. In the mouse mammary gland, TGFB1 induces apoptosis of epithelial cells during involution after lactation [12]. In vitro. TGFB1 arrests human mammary epithelial cells at the G1/S boundary [13]. However, most cell lines derived from invasive human breast carcinoma are much less sensitive or are resistant to the antiproliferative effects of TGFB1 [14, 15]. One of the mechanisms is the inactivation of one of the three receptors in tumor cells. It has been reported that several TGFB1-resistant human breast cancer cell lines fail to express RII mRNA [16, 17]. Transfection with a RII expression vector restores TGFB1 function in vitro [17]. Moreover, human breast cancer cell lines express reduced amounts of RIII when compared with untransformed human mammary epithelial cells. Transfection of human breast cancer cell line MDA-MB-231 with RIII reduces tumor incidence and growth rate when cells are inoculated in athymic nude mice [18]: similarly, RIII is capable of restoring autocrine inhibitory activity of TGFB1 in MCF-7 cells [19]. Moreover. Smad protein mutations can also result in TGFB1 resistance: in the MDA-MB-468, a cell line resistant to TGFB1. Smad 4 is deleted: transfection of Smad 4 restores both TGFB1-induced growth inhibition and transcriptional response [20]. Although TGFB1 is produced by both normal and transformed breast epithelial cells, production of TGFB1 by primary breast cancer appears to increase with advancing stages of tumor progression [21]. Moreover, most of TGFB1 is localised at the advancing edges of the tumors in areas of active growth, suggesting a possible role of $TGF\beta I$ in tumor promotion. Several pathways may contribute to tumor progression by TGFB1: tumor-derived TGFB1 may act as immune suppressor and allow tumor cells to escape from immune surveillance: TGFB1 may stimulate neighbouring fibroblasts to produce collagenases, uPA (urokinase plasminogen activator) and

stromelysin [22–24]; TGF β 1 can also enhance tumorigenicity via effects on tumor cells themselves which acquire resistance to the growth-inhibitory effect of TGF β 1. For example, TGF β 1 stimulates collagenase and uPA production by mammary tumor cells and thereby stimulates tumor cell invasion and metastasis [25, 26]. Therefore, TGF β 1 acts as an inhibitor of breast cancer promotion by its growth inhibitory effect on normal epithelial cells and epithelial cells of early breast cancer stages. It may promote tumor development by enhancing invasion and/or metastatic potential of tumor cells that are resistant to growth inhibition. The challenge now is to understand how cancer cells can become resistant to growth inhibition by TGF β 1 and yet retain other responses to it.

Tumor necrosis factor (TNFa)

TNF α is a multifunctional cytokine which affects the growth, differentiation, and/or function of virtually all cell types by acting alone or in concert with a variety of other cytokines, hormones, or growth factors [27]. TNF α is first synthesized as a 26-kDa transmembrane precursor, which is then proteolytically cleaved to release the 17-kDa soluble cytokine. Two distinct cell surface TNF receptors 55-60 kDa and 75-80 kDa (TNFR I and TNFR2, respectively) have been identified on the membrane of virtually all examined cells [28].

TNF α and its receptors are expressed during the various stages of rat mammary gland development: the transmembrane 26 kDa TNFa protein, undetectable in virgin rats, increases throughout pregnancy and lactation, and disappears during involution. TNFR1 mRNA peaks in early lactation and declines thereafter. whereas TNFR2 mRNA rises steadily through lactation [29]. Moreover, TNFa stimulates growth of mammarv epithelial cells solely through TNFR1, whereas the two receptors work in opposition to each other to regulate functional differentiation (casein accumulation), with inhibition occuring through the TNFR1 and stimulation through the TNFR2 [29]. TNFa is cytotoxic for most human breast carcinoma in short-term culture system while sparing normal cells [30]; it is also capable of inhibiting the growth of human breast cancer cell line MCF-7 by inducing arrest in G1/G0. This arrest in G1/G0 is p53-dependent which induces p21^{WAF1} to decrease Rb protein expression [31].

The balance between destructive and protective effects of TNF α may determine the ability of TNF α

to destroy selectively cancerous cells, while hardly affecting the viability of normal cells. The pathway leading to cell death is due to direct recruitment of caspase-8: the intracellular domain of TNFR1 contains an approximately 80 amino acid protein-protein interaction motif termed 'death domain' (DD). Binding of TNFa to TNFR1 induces aggregation of TNFR1 which recuit DD-containing adapter proteins such as TNFRI associated DD (TRADD) and Fas associated DD (FADD). The death effector domain (DED) of FADD is then associated with pro-caspase-8, which is activated by autocatalysis, the caspase 8 activates other caspases including caspase-3, which ultimately induce apoptosis. Survival or mitogenic signal generated by TNFa involves de novo synthesis of some protective proteins via activation of the transcription factor NF-kB [32]. Nevertheless, many questions have yet to be answered: what are the exact mechanisms of cytotoxic effect and the cellular resistance to TNFa? How the balance between the oppositing effects is regulated?

Interleukins

Normal and neoplastic human breast tissues express mRNAs for IL-1, 4, 6, 8 with increased levels of IL-8 in turnour tissues [33, 34]. Although the exact role of interleukins in normal development of mammary gland is unknown, some reports have described their anti-proliferative effects in tumour cells. IL-4 and IL-13 reduce clonal growth of some breast cancer cell lines [35]. Moreover, IL-4 inhibits serumstimulated growth of the breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 by induction of apoptosis [36]. IL-6 inhibits only the growth of estrogen receptorpositive human breast cancer cell lines although estrogen receptor-negative cell lines also express intact IL-6 receptor [37]. The precise role of IL-6 in tumour growth has not been elucidated: nevertheless, it has been reported that the estrogen receptor-negative and highly invasive breast cancer cell line MDA-MB-231 presents detectable constitutive levels of IL-6 mRNA and protein which are dramatically enhanced by TNFa [38]. Moreover, in the MDA-MB-231 cells, IL-6 induces the production of GP 96. a glucose regulated stress protein that is related to drug resistance in tumor cells [39]. One may speculate that elevated IL-6 in breast tumours would induce GP 96 expression. conferring a survival advantage by making them resistant to cytotoxic therapy and other forms of stress. So, like

254 X Le Bourhis et al.

TGF- β 1, IL-6 may be a negative regulator for early stage breast cancer but favors the survival of late-stage and/or metastatic cancer cells.

Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs)

The insulin-like growth factors (IGFs) are potent mitogens for human breast cancer cells. The biological effects of both IGF-I and IGF-II appear to be mediated through the type I IGF receptor, which has a high affinity for both ligands. Their bioavailability is regulated by at least seven IGF binding proteins. *In vitro*, all breast cancer cells secrete some IGFBPs, but the pattern of expression varies widely between cell lines. Breast tumors express all IGFBPs with IGFBP-1 and IGFBP-7 the least common [40, 41].

The function of IGFBPs on the regulation of cell growth is not completely understood. IGFBP-3 is the principal IGFBP in adult serum and the best characterized; its essential role has been postulated to be transporting and protecting IGFs [42]. IGFBP-3 can inhibit the biological action of IGFs by sequestration since the binding affinity of IGFBP-3 for IGFs is stronger than that of IGF receptors [43]. Alternatively, IGFBP-3 may interact directly with type I IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand [44]. In addition, It has been demonstrated that IGFBP-3 can inhibit growth of the ER-negative breast cancer cell line Hs578T via its specific cell membrane receptor [45, 46] In another approach. Lalou et al. [47] have reported that IGFBP-3 fragments generated from limited plasmin digestion inhibit the mitogenic effects of IGF-I and insulin, despite the significantly reduced affinity or the lack of affinity for IGF-I, suggesting also an IGF-independent action.

In comparaison with IGFBP-3, IGFBP-7 shows 5– 6 fold lower affinity for IGF-I and 20–25 fold lower affinity for IGF-II [48]. However, IGFBP-7 inhibits cell proliferation in human breast cancer cell lines in the absence of IGFs [49]. Other IGFBPs have also been shown to present growth inhibitory activities: IGFBP-1 can inhibit IGF-I, serum, and estrogen-dependent growth of MCF-7 human breast cancer cells [50, 51]. Polyethylene glycol conjugated IGFBP-1 also inhibits growth of MDA-MB-231 cells in athymic mice [52]. IGFBP-5 has been reported to be involved in the induction of apoptosis during the involution of mammary gland in the rat [53]. Therefore, IGFBPs can inhibit breast cancer cell proliferation in an IGFdependent and -independent manner. However, further studies are needed to understand how the growth of cancer cells is regulated by the IGF/IGFBP system, and how other growth factors or pharmalogical agents can interact with this system.

Proteoglycans

Proteoglycans (PG) are macromolecules composed of polysaccharide chains of glycosaminoglycans (GAG) linked to a core protein [54]. The GAG chains of PG can consist of heparan sulfate, chondroitin sulfate. dermatan sulfate or keratan sulfate and share in common the property of bearing sulfate groups at various positions, giving them a high density of negative charges. Morphogenesis, differentiation and tumorigenesis of mammary gland have been shown to be associated with changes in the composition and quantity of PG produced [55]. Several breast cancer studies showed large variations in the nature and distribution of PG. Increased chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) production has been observed in the stromal compartment of mammary biopsies, and the increase of heparan sulfate proteoglycans (HSPG) in the epithelial compartment correlates directly with malignancy and invasiveness of breast cancer [56]. A crucial physiological consequence of these modifications in GAG derived from the ability of these molecules to interact with various extracellular proteins such as collagens, laminin, fibronectin and growth factors. then affecting cellular proliferation. This is particularly well illustrated for HSPG which have the ability to bind and regulate the biological activity of fibroblast growth factors (FGFs) and hepatocyte gowth factor (HGF). For example, modification of GAG sulfation can control positively or negatively the mitogenic activity of FGF-2 on breast cancer cells [57. 58]. Treatment of breast cancer cells by TGFB1 and sodium butyrate leads to an increase in HSPG sulfation, resulting in reduction of the FGF mitogenic effect [59]. The structural basis for HSPG inhibition of proliferation is not fully elucidated but seems to be related to the kinetics of the interaction between HSPG and growth factors [60]. Elucidation of mechanisms by which HSPG can inhibit cell growth would open the way for HS derivatives as anti-cancer agents.

Other growth inhibitors

Apart from the above described growth inhibitors, the following factors have been reported to present growth inhibitory activity for breast cancer cells.

Growth inhibitors	Molecular weight (kDa)	Producing cells	Action on normal cells	Action on tumor cells	Mode of action
MDGI	14	Normal	Inhibition of proliferation. induction of differentiation	Inhibition of proliferation, induction of differentiation	Unknown
TGFβI	25	Normal and tumoral	Inhibition of proliferation. induction of apoptosis	Inhibition of proliferation. induction of apoptosis	ser/thr Kinase receptor
TNFa	17	Normal	Stimulation of proliferation induction of differentiation	Inhibition of proliferation. induction of apoptosis	Cytokine receptor
ΠLs	8-72	Normal and tumoral	Unknown	Inhibition of proliferation, induction of apoptosis	Cytokine receptor
IGFBPs	24-49	Normal and tumoral	Induction of apoptosis	Inhibition of proliferation. induction of apoptosis	IGF dependent and independent
PGs	50-100 × 10 ³	Normal and tumoral	Unknown	Inhibition of proliferation	Interaction with growth factors

Table 1. Major growth inhibitors of mammary epithelial cells

Mammastatin was isolated from cell culture medium of normal breast epithelial cells. Two molecular mass species, 47 and 65 kDa, appeared to be biologically active. Mammastatin induces inhibition of mammary carcinoma cell proliferation, but has no inhibitory effect on the proliferation of lung, colon, bladder, cervical or squamous cell carcinomas [61].

Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein synthesized by epithelial cells and polymorphonuclear cell precursors. Lactoferrin is mainly found in external secretions such as breast milk and in neutrophil secondary granules [62]. Recently, Damiens et al. [63, 64] have showed that human transferrin is capable of inhibiting growth of breast cancer cell lines by blocking cells in G1 phase of the cell cycle.

Oncostatin M is a cytokine produced by activated T lymphocytes and macrophages, and is also found in breast cyst fluid [65]. Oncostatin M inhibits growth in both normal and tumor breast epithelial cells [66, 67].

Role of endogenous growth inhibitors in chemopreventive agents-induced growth inhibition

Currently, the triphenylthylene anti-estrogens and retinoids constitute very promissing agents for chemoprevention or treatment of breast cancer. A common feature of these compounds is that they affect the synthesis and secretion of some endogenous growth factors *in vitro*. Huynh and Pollak have described that anti-estrogens 4-hydroxytamoxifen and ICI 182780 stabilize MDGI mRNA without affecting the transcription rate of the MDGI gene [68]. The upregulation of MDGI mRNA in normal breast tissue

by anti-estrogens may thus contribute to the protective activity of these compounds that is observed in mammary gland carcinogenesis experimental systems. Moreover, tamoxifen strongly induces the production of TGFB and IGFBP-3 in hormone responsive breast cancer cells MCF-7 [69, 70]. Further studies have demonstrated that IGFBP-3 mediates both antiestrogen-induced growth inhibition of MCF-7 cells [71] and TGFB-induced growth inhibition of hormone unresponsive cells Hs578T and MDA-MB-231 [72]. These data together suggest that in a heterogenous population of breast cancer cells in vivo, all cells could be inhibited by tamoxifen: the induced TGFB and IGFBP-3 can inhibit cell growth in an autocrine pathway for estrogen sensitive cells, while any estrogen unresponsive cells could be growth-inhibited by IGFBP-3, secreted by adjacent estrogen sensitive cells. Similar to tamoxifen, retinoids have been reported to regulate endogenous growth inhibitors in both normal and cancerous mammary epithelial cells. Swisshelem and coworkers have shown that all trans-retinoic acid and the synthetic retinoid fenretinide increase IGFBP-7 mRNA expression in normal, growing human breast epithelial cells [73]. Given that IGFBP-7 is preferentially expressed in senescent human breast epithelial cells and down-regulated in breast cancer cells [73] and that baculovirus-expressed IGFBP-7 inhibits cell proliferation of breast cancer cells [49], it is possible that retinoid agents inhibit breast cancer development through IGFBP-7. Moreover, IGFBP-3 has been reported to mediate the growth inhibitory effect of retinoic acid in estrogen unresponsive breast cancer cells Hs578T and MDA-MB-231 [72].

256 X Le Bourhis et al.

In summary, in vitro studies have demonstrated the implication of endogenous growth inhibitors, such as MDGI, TGF β and IGFBPs, in the anti-proliferative effects of anti-estrogens and retinoids. However, in vivo experiments are needed to confirm in vitro findings.

Conclusion and perspectives

Normal development of the mammary gland is constituted of three distinct phases: mammogenesis, lactogenesis and galactopoiesis followed by the involution of the mammary gland. Although the above described growth inhibitors (excepted TNFa) inhibit growth of normal mammary epithelial cells in vitro, differential expressions of TGFB, TNFa, IGFBP-5 and MDGI [12, 29. 53, 74] during normal mammary gland development suggest that they may be specific regulators of the temporal and spatial patterns of epithelial cell proliferation and regression that take place during lactogenesis and post-lactational involution. Indeed, MDGI is proposed to arrest growth of mammary epithelial cells when they become committent to differentiation in the lactional mammary gland [5, 6, 74]; TGFB appears to control apoptosis during post-lactational involution of the mammary gland [12]; IGFBP-5 has also been proposed to induce apoptosis during involution of the mammary gland [53]. Finally, TNFa seems to induce lactogenesis by stimulating growth of normal epithelial cells and inducing casein production [29]. However, during breast cancer development, cancer cells lost the capacity of producing some growth inhibitors including MDGI and TNFa. Nevertheless, they are still growth-inhibited by the majority of growth inhibitors. Therefore, it will be important to elucidate how and to what extent the production of growth inhibitors is controlled by events crucial for normal development of the mammary gland. Agents which either cause a localised induction of growth inhibitors by tumor cells themselves or by the surrounding normal epithelial cells may offer a sensible pharmacological approach for breast cancer prevention and therapy. On the other hand, although the intracellular pathways of TGFB-mediated growth inhibition and TNFa-induced apoptosis are well documented [9, 32, 75], mechanisms of action of other growth inhibitors remain poorly understood. Thus, the need to better understand their mechanisms of action is also crucial for the direct use of growth inhibitors and for the development of pharmacological agonists in breast cancer prevention and therapy.

Acknowledgement

We thank Prof. Dinsmore C (Department of Anatomy, Rush Medical College, Chicago) for critical reading of the manuscript.

References

- Böchmer FD, Kraft R, Otto A, Wernstedt C, Hellmann U, Kurtz A, Mueller T, Rohde K, Etzold G, Lehmann W, Langen P, Heldin CH, Grosse R: Identification of a polypeptide growth inhibitor from bovine mammary gland. J Biol Chem 262: 15137-15143, 1987
- Lehmann W. Widmaire R. Langen P: Response of different epithelial cell lines to a mammary derived growth inhibitor (MDGI): Biomed Biochim Acta 48: 143-151, 1989
- Spener F. Unterberg C. Borchers T. Grosse R: Characteristics of fatty acid-binding proteins and their relation to mammaryderived growth inhibitor. Mol Cell Biochem 98: 57-68, 1990
- Specht B, Bartetzko N, Hohoff C, Kuhl H, Franke R, Börchers T, Spener F: Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but a mix of heart-type and adipocyte-type fatty acid-binding protein. J Biol Chem 271: 19943-19949, 1996
- Börchers T, Hohoff C, Buhlmann C. Spener F: Heart-type fatty acid binding protein-involvement in growth inhibition and differentiation. ProstagaIndins Leukot Essent Fatty Acids 57: 77-84, 1997
- Yang Y. Spitter E. Kenney N. Zschiesche W. Li M. Kromminga A. Muller T. Spener F. Lezius A. Veerkamp J. Smith G. Salomon D. Grosse R: Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland. J Cell Biol 124: 1097-1109, 1994
- Huynh H. Larsson C, Narod S. Pollak M: Tumour supressor activity of the gene encoding mammary-derived growth inhibitor. Cancer Res 55: 2225-2231, 1995
- Huynh H. Alpert L. Pollak M: Silencing of mammary-derived growth inhibitor (MDGI) gene in breast neoplasms is associated with epigenetic changes. Cancer Res 56: 4865-4870, 1996
- Massague J: TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 67: 753-791, 1998
- Silberstein GB. Flanders KC. Roberts AB. Daniel CW: Regulation of mammary morphogenesis: Evidence for extracellular matrix-mediated inhibition of ductal budding by transforming growth factor-beta 1. Dev Biol 152: 354-362, 1992
- Pierce DJ, Johnson MD, Matsui Y, Robinson SD, Gold LI, Purchio AF, Daniel CW, Hogan BL, Moses HL: Inhibition of mammary duct development but not alveolar out-growth during pregnancy in transgenic mouse expressing active TGF31. Genes Dev 7: 2308-2317, 1993
- Strange R. Li F. Saurer S. Burkhardt A. Friis RR: Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. Development 115: 49-58, 1992
- Valverius EM, Walker-Jones D, Bates SE, Stampfer MR, Clark R, Mc Cormick F, Dickson RB, Lippman ME: Production of and responsiveness to transforming growth factor-β in normal and oncogene-transformed human mammary epithelial cells. Cancer Res 49: 6269-6274, 1989
- Arteaga CL, Randon AK, Von Hoff DD, Osborne CK: Transforming growth factor-β: potencial autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. Cancer Res 48: 3898-3904, 1988

- Zugmaler G. Ennis BW. Deschauer B. Katz D. Knabbe C. Wilding G. Daly P. Lippman ME. Dickson RB: Transforming growth factor type β1 and β2 are equipotent growth inhibitors of human breast cancer cell lines. J Cell Physiol 141: 353-361, 1989
- Lin HY, Wang X-F. Ng-Eaton E. Weinberg RA. Lodish HF: Expression cloning of the TGFB type II receptor. a functional transmembrane serine/threonine kinase. Cell 68: 775-785, 1992
- Kalkhoven E, Roelen BAJ, De Winter JP, Mummery CL, Van Den Eijnden-van Raaij AJM, Van Der Saag PT, Van Der Burg B: Resistance to transforming growth factor β and activin due to reduced receptor expression in human breast tumor cell lines. Cell Growth Differ 6: 1151-1161, 1995
- Sun L. Chen C: Expression of transforming growth factor β type III receptor suppresses tumorigenicity of human breast cancer MDA-MB-231 cells. J Biol Chem 272: 25367-25372, 1997
- Chen C, Wang XF, Sun L: Expression of transforming growth factor-β (TGFβ) type III receptor restores autocrine TGFβ1 activity in human breast cancer MCF-7 cells. J Biol Chem 272: 12862-12867, 1997
- De Winter JP, Roelen B, Ten Dijke P, Van Der burg B, Van Den Eijnden-Van Raaij A: DPC4 (SMAD4) mediates transforming growth factor-β1 (TGF-β1) induced growth inhibition and transcriptional response in breast tumour cells. Oncogene 14: 1891-1899, 1997
- Gorsch SM, Memoli VA. Stukel TA. Gold L. Arrick BA: Immunohistochemical staining for transforming growth factor-81 associates with disease progression in human breast cancer. Cancer Res 52: 6949–6952, 1992
- Chua CC, Geiman DE, Keller GH, Ladda RL: Induction of collagenase secretion in human fibroblast cultures by growth promoting factors. J Biol Chem 260: 5213-5216. 1985
- Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P: A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. Nature 348: 699-704, 1990
- Wolf C, Rouyer N, Lutz Y, Adida C, Loriot M, Bellocq JP, Chambon P, Basset P: Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression. Proc Natl Acad Sci USA 90: 1843-1847, 1993
- Welch DR, Fabra A, Nakajima M: Transforming growth factor β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. Proc Natl Acad Sci USA 87: 7678–7682, 1990
- Dong-Le Bourhis X. Lambrecht V. Boilly B: Transforming growth factor-beta 1 and sodium butyrate differentially modulate urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human breast normal and cancer cells. Br J Cancer 77: 396-403, 1998
- Larrick JW, Wright SC: Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-α. FASEB J 4: 3215-3223, 1990
- Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H: Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 87: 3127-3131, 1990
- Varela LM, Ip MM: Tumor necrosis factor-a: A multifunctional regulator of mammary gland development. Endocrinology 137: 4915-4924, 1996
- Dollbaum C, Creasey AA, Dairkee SH, Hiller AJ, Rudolph AR, Lin L, Vitt C, Smith HS: Specificity of tumor necrosis factor toxity for human mammary carcinomas relative

to normal mammary epithelium and correlation with response to doxorubicin. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4740-4744, 1988

- Jeoung D. Tang B, Sonenberg M: Effects of tumor necrosis factor-α on antimitogenicity and cell cycle-related proteins in MCF-7 cells. J Biol Chem 270: 18367-18373, 1995
- Liston P. Young SS. Mackenzie AE. Korneluk RG: Life and death decisions: the role of the LAPs in modulating programmed cell death. Apoptosis 2: 423-441, 1997
- Basolo F. Conaldi PG. Fiore L. Calvo S. Toniolo A: Normal breast epithelial cells produce interleukins 6 and 8 together with tumor-necrosis factor: defective IL6 expression in mammary carcinoma. Int J Cancer 55: 926-930. 1993
- 34. Green AR, Green VR, White MC. Speirs V: Expression of cytokine messenger RNA in normal and neoplastic human breast tissue: identification of interleukin-8 as a potential regulatory factor in breast rumours. Int J Cancer 72: 937-941, 1997
- Serve H. Oelmann E. Herweg A. Oberberg D. Serve S. Reufi B. Mucke C. Minty A. Thiel E. Berdel WE: Inhibition of proliferation and clonal growth of human breast cancer cells by interleukin 13. Cancer Res 56: 3583-3588, 1996
- Gooch JL, Lee AV, Yee D: Interleukin 4 inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. Cancer Res 58: 4199-4205. 1998
- Chiu JJ, Kgagias MK, Cowan KH: Interleukin-6 acts as a paractine growth factor in human mammary carcinoma cell lines. Clin Cancer Res 2: 215-221. 1996
- 38. Faggioli L. Costanzo C. Merola M. Bianchini E, Furia A. Carsana A. Palmieri M: Nuclear factor kappa B (NF-kappa B), nuclear factor interleukin-6 (NFIL-6 or C/EBP beta) and nuclear factor interleukin-6 beta (NFIL6-beta or C/EBP delta) are not sufficient to activate the endogenous interleukin-6 gene in human breast carcinoma cell line MCF-7. Comparative analysis with MDA-MB-231 cells. an interleukin-6-expressing human breast carcinoma cell line. Eur J Biochem 239: 624-631, 1996
- Haverty A.A. Harmey JH. Redmond HP. Bouchier-Hayes DJ: Interleukin-6 upregulates GP96 expression in breast cancer. J Surg Res 69: 145-149, 1997
- Figueroa JA, Yec D: The insulin-like growth factor binding proteins (IGFB Ps) in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 22: 381-390,4992
- Burger AM, Zhang X, Li H, Ostrowski JL, Beatty B, Venanzoni M, Papas T, Seth A: Down-regulation of TlAl2/mac25. a novel insulin-like growth factor binding protein related gene, is associated with disease progression in breast carcinomas. Oncogene 16: 2459-2467, 1998
- Baxter RC. Martin JL: Binding proteins for insulin-like growth factors: Structure, regulation, and function. Prog Growth Factor Res 1: 49-56, 1989
- Nickerson T. Huynh H. Pollak M: Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 237: 690-693, 1997
- 44. Mohseni-Zadeh S. Binoux M: Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand: an alternative mechanism in the regulation of IGF action. Endocrinology 138: 5645-5648, 1997
- Oh Y, Muller HL, Lamson G, Rosenfeld RG: Insulinlike growth factor (IGF)-independent action of IOF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. J Biol Chem 268: 14964-14971, 1993
- Oh Y, Muller HL, Pham HM. Rosenfeld RG: Demonstration of receptors for insulin-like growth factor binding protein-3 on
Hs578T human breast cancer cells, J Biol Chem 268: 26045-26048, 1993

- Lafou C, Lassarre C, Binoux M: A proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 that fails to bind IGFs inhibits the mitogenic effects of IGF-1 and insulin. Endocrinology 137: 3206-3212, 1996
- Oh Y, Nagalla SN, Yamanaka Y, Kim H, Wilson L, Rosenfeld RG: Identification and characterization of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-7: Recombinant human mac25 protein specially binds IGF-I and IGF-II. J Biol Chem 271: 30322-30325, 1996
- Wilson EM, Oh Y, Rosenfeld RO: Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: identification of 31-kDa IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. J Clin Endocrinol Metab 82: 1301-1303, 1997
- Figueroa JA, Sharma J, Jackson JG, McDermott MJ, Hilsenbeck SG, Yee D: Recombinant insulin-like growth factor binding protein-1 inhibits IGF-1, serum, and oestrogen-dependent growth of MCF-7 human breast cancer cells. J Cell Physiol 157: 229-236, 1993
- 51. Yee D. Jackson JG, Kozelsky TW, Figueroa JA: Insulin-like growth factor binding protein 1 expression inhibits insulinlike growth factor I action in MCF-7 breast cancer cells. Cell Growth Differ 5: 73-77, 1994
- 52. Van Den Berg CL, Cox GN, Stroh CA, Hilsenbeck SG, Weng CN, McDermott MJ, Pratt D, Osborne CK, Coronado-Heinsohn EB, Yee D: Polyethylene glycol conjugated insulinlike growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) inhibits growth of breast cancer in athymic mouse. Eur 5 Cancer 33: (108-1113, 1997)
- Toner E. Barber MC. Travers MT. Logan A. Flint DJ: Hormonal control of insulin-like growth factor-binding protein 5 production in the involuting mammary gland of the rat. Endocrinology 138: 5101-5107, 1997
- Kjetlen L and Lindahi U: Proteogltcans: structure and interactions. Annu Rev Biochem 60: 443-475, 1991
- Rudland PS, Barraclough R, Fernig DG, Smith JA: Mammary stem cells in normal development and cancer. In: Porton C (ed) Stem Cells and Cancer. Churchill Livingstone, London, 1996, pp 147-232
- Jozzo RV: Proteoglycans and neoplasia. Cancer Metast Res 7: 39-50, 1988
- Delehedde M. Deudon E. Boilly B. Hondermarck H: Heparan sulfate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor-2 mitogenic activity. Exp Cell Res 229: 398– 406, 1996
- Zhou FY, Owens RT, Hermoenen J, Hook M: Is the sensitivity of cells for FGF-1 and FGF-2 regulated by cell surface heparan sulfate proteoglycans? Eur Cell Biol 73: 166–174, 1996
- 59. Lambrecht V, Le Bourhis X, Toillon RA, Boilly B, Hondermarck H: Alterations in both heparan sulfate proteoglycans and mitogenic activity of fibroblast growth factor-2 are triggered by inhibitors of proliferation in normal and breast cancer epithelial cells. Exp Cell Res 245: 239-244, 1998
- Rahmoune H, Rudland PS, Gallagher JT, Fernig DG: Hepatocyte growth factor/scatter factor has distinct classes of binding site in heparan sulfate from mammary cells. Biochemistry 37: 6003-6008, 1998
- Ervin PR, Kaminsky JMS, Cody RL, Wicha MS: Production of mammastatin, a tissue-specific growth inhibitor, by normal human mammary cells. Science 244: 1585-1587, 1989

- Masson PL, Heremans JF, Schonne E: Lactofermin an iron binding protein in neutrophilic leukocytes. J Exp Med 130: 643-658, 1969
- Damiens E. Mazurier J. El Yazidi I. Masson M. Duthille I. Spik G. Boilly-Marer Y: Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoletic and epithelial tumor cells. Biochim Biophys Acta 1402: 277-287, 1998
- 64. Damiens E. El Yazidi I, Mazurier J. Duthille I, Spik G. Boilly-Marer Y: Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells. J Cell Biochem 74: 486-498, 1999
- Lai LC, Kadory S, Siraj AK, Lennard TW: Oncostatin M, interleukin 2, interleukin 6 and interleukin 3 in breast cyst fluid. Int J Cancer 59: 369-372, 1994
- Liu J, Spence MJ, Wallace PM, Forcier K, Hellstrom I, Vestal RE: Oncostatin M-specific receptor mediates inhibition of breast cancer cell growth and down-regulation of the c-myc proto-oncogene. Cell Growth Differ 3: 667-676, 1997
- Liu J. Hadjokas N. Mosley B. Estrov Z. Spence MJ. Vestal RE: Oncostatin M-specific receptor expression and function in regulating cell proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells. Cytokine 10: 295–302, 1998
- Huynh H. Pollak M: Stabilization of mammary-derived growth inhibitor messenger RNA by antiestrogens. Clin Cancer Res 3: 2151-2156, 1997
- Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, Flanders KC, Kasid A, Derynck R, Dickson RB: Evidence that TGFB is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. Cell 48: 417-428, 1987
- Pratt SE, Pollak MN: Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) inhibits estrogen stimulated breast cancer cell proliferation. Biochem Biophy Res Commun 198: 292-297, 1994
- Huynh H. Yang X. Pollak M: Estradiol and anti-estrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loup in human breast cancer cells. J Biol Chem 271: 1016-1021, 1996
- Gucev ZS, Kelley KM, Rosenfeld RG. Oh Y: Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) mediates retinoicacid (RA)- and transforming growth factor-32 (TGF-32)induced growth inhibition in human breast cancer cells. Cancer Res 36: 1545-1550, 1996
- Swisshelm K, Ryan K, Tsuchiya K, Sager R: Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid. Proc Natl Acad Sci USA 92: 4472-4476, 1995
- Kurtz A, Vogel F, Funa K, Heldin CH, Grosse R: Developmental regulation of mammary-derived growth inhibitor expression in bovine mammary tissue. J Cell Biol 110: 1779– 1789, 1990.
- Wallach D. Kovalenko AV. Varrolomeev EE. Boldin MP: Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor familly: a Sanhedrin verdict. Curr Opinion Immunol 10: 279-288, 1998

Address for offprints and correspondence: Xueten Le Bourhis. Equipe Facteurs de Croissance, Laboratoire de Biologie du Développement, Bât, SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; Tel.: (33) 3 20 43 45 81; Fatt: (33) 3 20 43 40 38; E-mail: Xueten, Lebourhis@univtille1.fr

III- Rôles et contrôles de l'apoptose

C'est en 1972 que le terme apoptose fût employé pour la première fois par Kerr, Willye et Currie (Kerr *et al*, 1972). Le terme apoptose est issu du grec et signifie "chute des feuilles en automne". L'apoptose désigne une forme particulière de mort cellulaire dont la morphologie diffère de celle observée lors de la nécrose. Outre les considérations morphologiques, l'apoptose se distingue de la nécrose sur un plan plus conceptuel : contrairement à la nécrose, l'apoptose est un processus sous contrôle moléculaire, d'où son autre appellation de mort cellulaire programmée. Bien que les deux termes soient souvent employés comme synonymes, la mort cellulaire programmée n'implique pas forcément l'apoptose. Par exemple, la différenciation terminale des kératinocytes ou des érythrocytes sont des formes de mort cellulaire programmée mais ne sont pas caractérisées par l'apoptose (Vaux et Korsmeyer, 1999).

III.1- Rôles physiologique et pathologique de l'apoptose

1) Rôle physiologique

L'apoptose joue un rôle important dans le développement embryonnaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire. Lors du développement embryonnaire, l'apoptose est impliquée dans les processus suivants (Jacobson *et al*, 1997) :

-la sculpture des organes et des tissus. L'élimination par apoptose des tissus interdigitaux permet la sculpture et l'individualisation des doigts.

-l'élimination des ébauches embryonnaires des gonades mâles ou femelles lors de la différenciation sexuelle de l'individu.

-l'ajustement du nombre de cellules. Dans le système nerveux, l'apoptose participe à l'élimination des neurones produits en excès qui n'ont pas trouvé leur cible de l'innervation ou ceux qui ont établi de mauvaises connexions.

	Pathologies	Exemples
Diminution de l'apoptose	Cancer	Lymphome folliculaire Carcinomes (sein, prostate)
	Maladies auto- immunes	Lupus érythémateux Diabète de type I
	Infections virales	Herpès, variole, infection à adénovirus
Augmentation de l'apoptose	Maladies neurodégénératives	Maladie d'Alzheimer Maladie de Parkinson Maladie de Creuzfeld-Jakob Rétinite pigmentaire Atrophie musculaire spinale
	Lésions ischémiques	Infarctus du myocarde Accident vasculaire cérébral
	Infections virales	SIDA, herpès virus

Tableau 1 : Implications de l'apoptose dans les processus pathologiques.

-l'élimination des cellules dangereuses ou endommagées. Lors du développement du système immunitaire, l'apoptose joue un rôle dans la sélection thymique des lymphocytes. L'apoptose contribue également à différents phénomènes de métamorphose rencontrés dans certaines espèces animales.

A l'age adulte, l'apoptose est requise pour le maintien de l'homéostasie tissulaire et permet :

-l'élimination des cellules indésirables ou lésées.

-la régression des hyperplasies tissulaires physiologiques. Ainsi, après l'allaitement, la glande mammaire régresse par une entrée massive des cellules épithéliales en apoptose.

-la défense de l'organisme vis-à-vis des agressions. Par exemple, dans le cas d'une infection virale, les cellules infectées s'autodétruisent par apoptose pour freiner la réplication et la propagation virales.

2) Rôle pathologique

Le développement embryonnaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire impliquent l'élimination de cellules par apoptose, il n'est donc pas étonnant que des dérégulations de l'apoptose aboutissent à l'émergence de pathologies (tableau 1).

Une diminution de l'apoptose est observée notamment dans les cancers et les infections virales. Dans les cancers, la diminution de l'apoptose résulte d'altérations héritées ou acquises de l'expression de gènes régulant l'apoptose. Lors des infections virales, ce sont les virus qui produisent des analogues viraux de protéines inhibitrices de l'apoptose (Alcami et Koszinowski, 2000) permettant aux virus de se multiplier.

Une augmentation de l'apoptose peut être observée dans certaines pathologies telles que (Rudin et Thompson, 1997) :

-des lésions ischémiques cardiaques ou cérébrales,

-certaines maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer...),

<u>Tableau 2</u> : Caractéristiques de la nécrose et de l'apoptose.

Caractéristiques		Nécrose	Apoptose	
Nucléaire	Condensation de la chromatine	Aléatoire	Marginalisation en amas peri-	
			nucléaires	
	Fragmentation de l'ADN	Aléatoire	Fragmentations en 300 et 50 kpb puis	
			fragmentations internucléosomiques	
			(multiples de 180-200 pb)	
Cytoplasmique	Organites	Lyse	Maintien de l'intégrité	
	Libération des enzymes	Oui	Non	
	lysosomiales			
Membranaire	Membrane plasmique	Rurture	Maintien de l'intégrité	
Cellulaire	Volume	Augmentation	Diminution	
	Densité	Diminution	Augmentation	
	Intégrité	Eclatement de la	Condensation et/ou fragmentation en	
		cellule	corps apoptotiques	
Organisme	Phagocytose	Non	Oui	
	Réaction inflammatoire	Oui	Non	

-l'atrophie musculaire spinale. Les motoneurones sont détruits par apoptose du fait de la mutation d'un gène codant une protéine inhibitrice de l'apoptose,

-des infections virales. Dans le cas du SIDA, le virus VIH induit l'apoptose des cellules T qu'il infecte, provoquant une immunodéficience caractéristique de cette pathologie.

III.2- Caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose

Les événements qui se succèdent lors de l'apoptose ont été établis par opposition à ceux observés lors de la nécrose (tableau 2) (Wyllie *et al*, 1980). La nécrose est un phénomène passif caractérisé par une cinétique rapide. Lors de la nécrose, on observe un gonflement de la cellule. L'intégrité des organites intracellulaires est affectée : les mitochondries se dilatent et les autres organites sont lysés. Les enzymes lysosomales sont libérées dans le cytoplasme, la chromatine est détruite de façon aléatoire. Très rapidement l'intégrité de la membrane plasmique est altérée et le matériel cytoplasmique est libéré, ce qui entraîne une réaction inflammatoire. Contrairement à la nécrose, pendant la quasi-totalité du processus apoptotique, l'intégrité de la cellule et de ses organites intracellulaires est conservée (Fig. 9). L'apoptose peut être décrite comme la succession de plusieurs étapes qui se chevauchent plus ou moins dans le temps (Arends et Wyllie, 1991) :

-altérations nucléaire et cytoplasmique. Les mitochondries sont condensées et les organites cellulaires sont relocalisés et s'agrégent en périphérie du noyau. La chromatine est condensée en amas périnucléaires puis fragmentée de façon régulière. La membrane cytoplasmique subit des remaniements comme l'externalisation de la phosphatidyl-sérine.

-formation des corps apoptotiques. Le cytoplasme se rétracte et la cellule se fragmente en corps apoptotiques.

-phagocytose des cellules apoptotiques. *In vivo*, les corps apoptotiques sont reconnus et éliminés par les cellules phagocytaires sans déclencher de réaction inflammatoire. *In vitro*,



Figure 9 : Changements morphologiques lors de la nécrose et de l'apoptose (adaptée de Wyllie *et al*, 1980).

1- cellule vivante ; 2- condensation de la chromatine et du cytoplasme en début d'apoptose ;
3- fragmentation en corps apoptotiques ; 4- phagocytose ; 5- phagocytose d'un corps apoptotique ; 6- résidus apoptotiques ; 7- gonflement d'une cellule en nécrose ; 8- éclatement de la cellule.

les corps apoptotiques peuvent être phagocytés par les cellules voisines, mais en général on observe une nécrose secondaire avec une lyse de ces corps apoptotiques.

III.3- Voies biochimiques de l'apoptose

L'exécution de l'apoptose requière, dans une grande majorité des cas, l'activation de cystéine protéases particulières : les caspases. Celles-ci sont principalement activées par les récepteurs de mort et/ou la mitochondrie qui intègre les signaux anti- et pro-apoptogènes.

1) Caspases

Cette famille de protéases est extrêmement conservée au cours de l'évolution et des analogues des caspases sont trouvés chez les insectes, les hydres et les nématodes (Budihardjo *et al*, 1999 ; Cikala *et al*, 1999).

Les caspases sont des cystéine-aspartases, elles possèdent dans leur site actif un résidu cystéinyl qui reconnaît un résidu aspartyl du substrat et clive après celui-ci. La spécificité de chacune des caspases est déterminée par la séquence du substrat constituée de 4 résidus d'acides aminés et se terminant par le résidu aspartyl. Suivant le substrat, on distingue 3 groupes de caspases : le groupe I reconnaissant le consensus Trp-Glu-His-Asp (caspases-1, -4, -5 et -13), le groupe II reconnaissant Asp-Glu-X-Asp (caspases-2, -3, -7 et -14) et le groupe III ayant comme consensus (Ile ou Val ou Leu)-Glu-X-Asp (caspases-6, -8, -9 et -10).

Les protéines substrats de ces caspases sont nombreuses, actuellement plus de 100 d'entreelles sont connues (Nicholson, 1999). Leur clivage par les caspases peut avoir pour conséquence la perte de fonction biologique par inactivation (clivage de PARP) ou par désassemblage de structures multimériques (réseau des lamines dans le noyau). Au contraire, il peut y avoir un gain de fonction par clivage de la protéine cible. Ainsi, le fragment cterminal de Bid (tBid) résultant du clivage de Bid par la caspase-8 présente une activité pro-



Figure 10 : Schématisation de l'activation d'une caspase (d'après Salvesen et Dixit, 1999).

apoptotique accrue par rapport à Bid. Les caspases peuvent cliver également des inhibiteurs auxquels les protéines sont associées (clivage de ICAD libère CAD) (Hengartner, 2000).

Comme la plupart des enzymes, les caspases sont produites sous une forme inactive dite forme pro-enzyme ou zymogène. Les pro-caspases sont des monomères constitués d'un prodomaine N-terminal et de deux autres domaines correspondant aux sous-unités de la caspase active (Fig. 10) : une grande sous-unité d'environ 20 kDa (p20) et une petite sous-unité d'environ 10 kDa (p10). Cette nomenclature a été établie par analogie avec la description de la pro-caspase-1. L'activation des caspases est réalisée par deux clivages : l'un entre le prodomaine N_T et la sous-unité p20 et l'autre entre les sous-unités p20 et p10. Pour certaines procaspases, un domaine de liaison entre les sous-unités p20 et p10 nécessite un deuxième site de clivage entre ces deux sous-unités. Une fois clivées, les deux sous-unités s'associent à deux autres sous-unités provenant du clivage d'un autre monomère pour former une structure tétramérique (Fig. 10). Les tétramères forment la caspase active et présentent 2 sites enzymatiques potentiellement actifs.

Les caspases peuvent être activées par auto-activation, par association à une sous-unité régulatrice ou par transactivation (Fig. 11). L'auto-activation par le modèle de proximité est une notion introduite par Salvensen et Dixit (1999) pour expliquer l'activation de la caspase-8 sous les récepteurs de mort. La liaison d'un ligand de mort (TNF, Fas L ou TRAIL) à son récepteur entraîne le recrutement d'adaptateurs qui vont à leur tour recruter les pro-caspases-8. La concentration de pro-caspases-8 sous les récepteurs permettrait leur activation mutuelle. Cela suppose que les pro-caspases possèdent une activité de clivage intrinsèque suffisante pour leur activation mutuelle. Récemment, de nouvelles molécules (FLASH et SADS) intervenant dans la liaison entre les adaptateurs et les caspases ont été découvertes comme potentialisant l'activation des caspases (Imai *et al*, 1999 ; Suzuki *et al*, 2001). Le second mode d'activation s'effectue par l'association à une sous-unité régulatrice. Les études *in vitro* sur des caspases isolées montrent que les caspases possèdent une capacité plus ou moins forte de

a) Auto-activation



Caspase-8 active

b) Association à une sous-unité régulatrice



c) Transactivation



Figure 11 : Modes d'activation des caspases.

clivage de leur substrat et, dans le cas de la caspase-9, cette capacité est quasi-nulle (Salvesen et Dixit, 1999). Pour être active, la caspase-9 doit être associée à un co-facteur, APAF-1 (Apoptosis Protease-Activating Factor-1) (Rodriguez et Lazebnik, 1999); cette association nécessite de l'ATP et la participation du cytochrome-c (Li *et al*, 1997). Le complexe actif est appelé apoptosome et il associe APAF-1, la caspase-9, le cytochrome c et d'autres protéines pour former un complexe de 700 à 1400 kDa (Cain *et al*, 1999 et 2000). Contrairement aux autres caspases, la forme active de la caspase-9 ainsi formée ne résulterait pas du clivage de la pro-caspase-9 (Stennicke *et al*, 1999).

Enfin, les caspases peuvent être transactivées. Les caspases-8 et -9 ont pour cible d'autres procaspases qui présentent des séquences consensus de clivage. Une fois clivées, ces caspases actives clivent de nombreux substrats cellulaires conduisant à la mort de la cellule par apoptose (Cohen, 1997).

2) Récepteurs de mort

Les récepteurs de mort appartiennent à la super-famille des récepteurs du TNF. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires caractérisées par la présence de domaines extracellulaires riches en cystéines (CRD). Les domaines CRD sont responsables de la liaison du récepteur avec le ligand. Les récepteurs de mort possèdent, dans leurs parties intracellulaires, des domaines de mort. Actuellement, on dénombre 8 récepteurs de mort dont 5 sont capables d'induire l'apoptose (Fig. 12) :

-Fas (ou CD95, Apo1),

-TNFR-1 (ou CD120a, p55TNF-R),

-DR3 (Death Receptor 3) (ou Apo3, WSL1, TRAMP, LARD),

-DR4 (Death Receptor 4) (ou TRAIL-R1),

-DR5 (Death Receptor 5) (ou Apo2, TRAIL-R2, TRICK-2, KILLER).

- 27 -

Les 3 autres membres sont des récepteurs de leurre puisqu'ils piégent les ligands sans déclencher l'apoptose. Il existe deux récepteurs de leurre pour TRAIL : DcR1 (ou TRID, TRAIL-R3, LIT) qui est une protéine de surface ancrée dans la membrane par un groupement GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) ne possédant pas de partie cytoplasmique donc ne transmettant aucun signal ; DcR2 (ou TRAIL-R4, TRUNDD) qui ressemble à DR4 et DR5 mais comporte une partie cytoplasmique tronquée n'ayant plus la capacité de transmettre le signal apoptotique. Le troisième récepteur de leurre, DcR3, est un protéine soluble ; il se lie à Fas L avec la même affinité que Fas (Ashkenazi et Dixit, 1999 ; Locksley *et al*, 2001).



Figure 12 : Récepteurs de mort et leurs ligands (d'après Schmitz et al, 2000).

Les récepteurs de mort capables d'induire l'apoptose sont encadrés.



Figure 13 : Induction de l'apoptose par les récepteurs de mort.

Le ligand de Fas, Fas L, est une molécule de surface ancrée dans la membrane plasmique. Il existe également une forme soluble de Fas L (Tanaka *et al*, 1996 et 1998). La fixation de Fas L sur les domaines CRD-2 et -3 induit la trimérisation et l'activation de Fas. Fas activé recrute la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain protein) (ou MORT-1) *via* les domaines de mort (Fig. 13) (Chinnaiyan *et al*, 1996 ; Scaffidi *et al*, 1998). A son tour, FADD recrute la pro-caspase-8 *via* les domaines DED (Death Effector Domain) qui s'auto-active (Enari *et al*, 1995, ; Muzio *et al*, 1996; Boldin *et al*, 1996). Pour certains types cellulaires, l'activation de la caspase-8 est augmentée par la liaison de FLASH (FLice Associated Huge protein) et/ou de SADS (Small Accelerator for Death Signalling) (Imai *et al*, 1999 ; Suzuki *et al*, 2001). La caspase-8 active alors directement d'autres caspases (caspase-3 ou -7) et induit l'apoptose indépendamment de la mitochondrie. Pour d'autres types cellulaires, l'activation de la caspase-8 reste faible mais cette activation suffit pour induire le clivage de Bid. Le fragment C_T de Bid (tBid) s'insère dans la mitochondrie, provoquant la libération des facteurs mitochondriaux, qui induisent l'activation des caspases en cascade (Li *et al*, 1998, Luo *et al*, 1998).

Fas peut induire l'apoptose indépendamment de la liaison de FADD au domaine de mort *via* JNK ou les céramides. Fas active JNK (Jun N-terminal Kinase) par l'intermédiaire de deux adaptateurs Daxx (Fas death-domain associated protein) et Ask1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) (Fig. 13) (Yang *et al*, 1997). Daxx recrute Ask1 qui à son tour active une MAP-Kinase-Kinase qui phosphoryle JNK. JNK phosphorylée peut alors activer c-jun, ce qui pourrait conduire à l'expression de gènes pro-apoptotiques. Par ailleurs, JNK phosphoryle Bcl-2. Cette phosphorylation inhibe l'effet anti-apoptogène de Bcl-2 et d'autres membres anti-apoptogènes de la famille Bcl-2 tel que BclX_L (Basu et Kolesnick, 1998). D'autre part, Fas active la sphingomyélinase acide par l'intermédiaire d'une phospholipiase C spécifique des phospholipides ou de la sphingomyélinase neutre par interaction directe (Fig. 14) (Malisan et



APOPTOSE

Figure 14 : Activation de la voie des céramides par le récepteur Fas.

 $\label{eq:pc-PLC} PC-PLC: phosphatidylcholine-specific phospholipase C ; DAG : Diacylglycérol ; NSM : sphingomyélinase neutre ; ASM : sphingomyélinase acide ; ST8 : α-2,8-syalyltransférase ; GD3 : disyaloganglioside.$

o et 1. springen (* 1997) sonde pår (* næmændate aller aller allera). Og skala jar og s Testi, 1999). L'activation de ces sphingomyélinases aboutit à la synthèse de céramides qui activent l' α -2,8-sialyltransférase. Cette dernière transforme un monosialoglanglioside (GM3) en disialoglanglioside, le GD3 (Van Echten et Sandhoff, 1993) qui induirait, au niveau mitochondrial, l'activation de l'apoptosome et/ou le relargage d'AIF (Apoptosis Inducing Factor) (De Maria *et al*, 1997).

b) TNFR-1

La fixation du TNF α sur TNFR-1 entraîne la trimérisation et l'activation du TNFR-1 (Fig. 13). Les récepteurs activés recrutent alors TRADD (TNFR-Associated Death Domain) qui, à son tour, active FADD *via* les domaines de mort. FADD se lie à la pro-caspase-8 *via* les domaines DED et induit son activation. La caspase-8 induit l'activation des caspases-3 et -7 qui conduisent la cellule à la mort par apoptose. TRADD peut aussi *via* le domaine de mort active: une protéine serine-thréonine kinase RIP (Receptor Interacting Protein). RIP se lie à TRAF-2 (TNFR Associated Factor-2) qui active Ask1 puis JNK pour induire l'apoptose. RIP par son domaine de mort peut également engager RAIDD (RIP Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain) aussi appelé CRADD (Caspase and RIP Adaptater with Death Domain). RAIDD active la caspase-2 par l'intermédiaire d'un domaine de type CARD (Caspase Associated Recruitment Domain). Le rôle de la caspase-2 dans l'activation de caspases en aval reste à démontrer. De façon similaire à Fas, le TNFR-1 peut engager en dehors de ces domaines de mort des sphingomyélinases induisant l'apoptose par l'intermédiaire de la mitochondrie (Peter *et al*, 1998).

Les DR4 et DR5 sont aussi capables d'induire l'apoptose après liaison de TRAIL (Fig. 13). Il semblerait que l'association de FADD soit nécessaire à l'activation de la caspase-8 qui induirait alors les effets pro-apoptotiques de ces récepteurs (Peter *et al*, 1998).



Figure 15 : Structure schématique des protéines de la famille Bcl-2 (adaptée de Tsujimoto et Shimizu, 2000).

Le domaine d'ancrage membranaire représenté n'est pas présent chez tous les membres de la famille Bcl-2.

3) Contrôle de la libération des facteurs mitochondriaux par la famille Bcl-2

De nombreux stimuli pro-apoptogènes impliquent la libération du cytochrome c, d'AIF et de caspases par la mitochondrie. La libération de ces différentes molécules est sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2.

a) Relation structure/fonction des membres de la famille Bcl-2

Cette famille comporte actuellement 18 membres chez les mammifères. Toutes ces protéines possèdent des domaines d'homologies à Bcl-2 (BH) nommés BH1, BH2, BH3 et BH4 (Fig. 15). Les membres anti-apoptotiques (Bcl-2, BclX_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl-1) et Boo (NR-13)) comportent les 4 domaines d'homologies, à l'exception de Bfl1 auquel il manque le BH4. Certains membres pro-apoptotiques ne possèdent qu'un domaine BH3 (Bid, Bad, Bik, Blk, Hrk (DP5), Bim, Bnip et Bnip3L); et les autres possèdent en plus du domaine BH3, un domaine BH1, BH2 ou BH4 (Bax, Bak, Bok et BclX_s). Les domaines BH1 et BH2 des membres anti-apoptotiques sont responsables de la formation des canaux et l'hétérodimèrisation avec les autres membres de la famille Bcl-2. Ainsi, les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-2 forment une poche hydrophobe essentielle à la liaison du domaine BH3 d'un membre pro-apoptotique. Pour les membres pro-apoptotiques, le domaine BH3 est également responsable de la fonction pro-apoptotique. Ainsi, les études de mutagenèse dirigée ont montré que le domaine BH3 des membres pro-apoptotiques est nécessaire et suffisant pour induire l'apoptose. Le domaine BH4 en position NT est essentiel pour l'action antiapoptotique de Bcl-2, il permet également les interactions de Bcl-2 avec diverses protéines telles que APAF-1, la calcineurine, Raf-1 et Bag-1 (Neiman, 1998; Adams et Cory, 1998; Antonsson et Martinou, 2000a).

b) Localisation cellulaire des membres de la famille Bcl-2

De façon générale, les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont déjà insérés dans les membranes (du noyau, du réticulum endoplasmique et essentiellement de la mitochondrie), alors que les membres pro-apoptotiques ne le sont pas ou faiblement. Dès lors, l'apoptose nécessite la relocalisation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 du cytoplasme vers les membranes (Porter, 1999). Les mécanismes à l'origine de la relocalisation de ces protéines sont divers et plus ou moins bien élucidés. Ainsi, Bad est séquestré sous une forme phosphorylée dans le cytosol par la protéine 14-3-3 (Pastorino *et al*, 1999 ; Muslin et Xing, 2000). Lors d'un stimulus apoptotique, Bad est déphosphorylé par des protéines phosphatases telle que la calcineurine (Wang *et al*, 1999) ; Bad déphosphorylé se dissocie de la protéine 14-3-3 et s'insert dans la membrane de la mitochondrie (Zha *et al*, 1996). D'autre part, suite à l'activation de Fas, la caspase-8 clive Bid, tBid s'insert plus facilement dans la membrane de la mitochondrie. Enfin, d'autres mécanismes ont été évoqués : des changements de conformation de Bax pourraient être responsables de sa relocalisation du cytoplasme vers la mitochondrie lors de l'induction de l'apoptose (Gross *et al*, 1998).

c) Rôle de la famille Bcl-2 dans la libération des facteurs mitochondriaux

La libération des facteurs mitochondriaux tels que le cytochrome c et l'APAF-1 entraîne l'activation en cascade des caspases (Zou *et al*, 1999 ; Cain *et al*, 2000). Cette libération est déterminée par le *ratio* entre membres anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 présents au niveau de la mitochondrie. Ainsi, la présence des membres pro-apoptotiques en quantité plus importante provoque la libération des facteurs mitochondriaux.

Seuls Bax et Bak sont capables d'induire la libération de ces facteurs mitochondriaux, les autres membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 agissent pour faciliter l'action de Bax ou Bak. Ainsi, l'activité de Bax ou Bak est accrue par la formation d'hétérodimères avec Bid ou Bik (Gross *et al*, 1998 ; Eskes *et al*, 2000).





(i et ii) : rupture de la membrane externe de la mitochondrie ; (iii à v) : formation de canaux dans la membrane externe de la mitochondrie.

Les membres pro-apoptotiques peuvent également lever l'inhibition de Bax induite par les protéines anti-apoptotiques : l'action de Bax est inhibée par la formation d'hétérodimères avec Bcl-2 ou BclX_L, Bad déplace Bax de ce complexe du fait de son affinité plus importante pour Bcl-2 ou BclX_L (Gross *et al*, 1998 ; Wang *et al*, 1999).

Outre la régulation des facteurs mitochondriaux, les protéines de la famille Bcl-2 peuvent également contrôler directement la formation de l'apoptosome. En effet, Bcl-2 ou BclX_L séquestrent APAF-1, la liaison de Bik à Bcl-2 ou BclX_L permet la libération d'APAF-1 et la formation de l'apoptosome (Pan *et al*, 1998).

Les mécanismes de la libération des facteurs mitochondriaux ne sont pas encore totalement élucidés. Les travaux effectués sur la libération de cytochrome c par la mitochondrie ont permis d'élaborer 5 hypothèses (Fig. 16).

i) Rupture de la membrane externe par hyperpolarisation de la membrane interne de la mitochondrie (Vander Heiden *et al*, 1999 et 2000). La fermeture du VDAC (Voltage Dependant Activated Channel) et de l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator) inhiberait la F_1F_0 ATPase et la recapture des H⁺, ce qui entraînerait une hyperpolarisation de la membrane interne et une augmentation du potentiel transmembranaire, induisant la rupture de la membrane externe de la mitochondrie. Le rôle des membres de la famille Bcl-2 dans ce phénomène n'est pas encore déterminé.

ii) Rupture de la membrane externe par ouverture du PTP (Permeability Transition Pore). Le PTP (aussi appelé mégacanal mitochondrial) est constitué du VDAC, de l'ANT, de la cyclophiline D et d'autres protéines (Loeffler et Kroemer, 2000). L'ouverture du PTP entraînerait une entrée de molécules du cytoplasme dans la mitochondrie. Il en résulterait une chute du potentiel mitochondrial et une disparition du gradient de proton entre la matrice et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie ; ce qui entraînerait la rupture de la membrane externe de la mitochondrie et la libération du cytochrome c dans le cytoplasme (Crompton, 1999).

Les membres de la famille Bcl-2 réguleraient l'ouverture du PTP (Marzo *et al*, 1998). Ainsi, Bcl-2 prévient l'ouverture du PTP dans des cellules et sur des mitochondries isolées (Shimizu *et al*, 2000). De plus, il a été démontré que la libération de cytochrome c, induite par Bax, dans les cellules et des mitochondries isolées, est inhibée par des inhibiteurs pharmacologiques de la cyclophiline D. Bax et Bak interagiraient également avec l'ANT pour ouvrir le PTP (Narita *et al*, 1998 ; Marzo *et al*, 1998)

iii) Formation de canaux ioniques par les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. 2. Plusieurs travaux suggèrent que les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 forment des canaux dans la membrane de la mitochondrie permettant la libération du cytochrome c (Schendel *et al*, 1998). Ainsi, Bax peut induire la libération de cytochrome c sans qu'il y ait de chute du potentiel mitochondrial ni rupture de la membrane mitochondriale (Jurgensmeier *et al*,1998 ; Martinou *et al*, 1999). D'autre part, les membres de la famille Bcl-2 présentent une structure tertiaire leur permettant de former des pores dans les bicouches lipidiques. Bcl-X_L, par exemple, présente deux hélices α centrales hydrophobes entourées de 5 hélices α amphiphiles rappelant la structure des pores formés par les toxines bactériennes (Muchmore *et al*, 1996). De plus, Bcl-X_L, Bcl-2, Bax et la forme tronquée de Bid (tBid) sont capables de former des canaux ioniques dans des vésicules et bicouches lipidiques synthétiques (Schendel *et al*, 1999). Par ailleurs, il a été démontré que Bcl-2 prévient la formation des canaux par Bax dans les liposomes (Antonsson *et al*, 2000b). Enfin, les canaux formés par Bax et Bad permettraient la libération du cytochrome c.

iv) Formation de canaux ioniques par les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et le VDAC (Shimizu *et al*, 2000). Dans les liposomes, Bak et Bax induisent l'ouverture du VDAC tandis que Bcl-X_L permet sa fermeture. De plus, l'introduction de Bax, Bak ou du VDAC seuls dans les liposomes ne permet pas la sortie de cytochrome c. D'où l'hypothèse de la - 34 -



Figure 17 : Mécanismes de l'inhibition de l'apoptose dans les cellules cancéreuses (adaptée de Schmitz *et al*, 2000).

Les intervenants de la cascade de transduction sont en bleu et les protéines modulatrices en noir.

samms que bal-Milipermen en tecnomica. De provi l'introducion du Max, Bak za da VOAC techs datos les hiperennes un neuron pris fai entre de estecemente. El Dioà Elippatiter e de la formation de mégacanaux associant Bax ou Bak et le VDAC pour induire la libération de cytochrome c de la mitochondrie.

v) Formation de pore par dérégulation de l'assemblage des lipides dans la membrane (Basanez *et al*, 1999 et 2001). Bax et tBid sont capables de désorganiser les membranes lipidiques synthétiques. Cette désorganisation membranaire serait à l'origine de la formation de complexe protéine-lipide permettant la sortie du cytochrome c.

IV- Inhibition de l'apoptose dans les cancers

Le développement tumoral est lié, entre autre, à une diminution de l'apoptose. Cette diminution résulte de la dérégulation de nombreuses protéines régulatrices (Fig. 17).

IV.1- Diminution de l'interaction ligand/récepteur de mort

La diminution de la liaison du ligand avec son récepteur permet l'extinction des signaux apoptotiques induits par les récepteurs de mort. Dans de nombreux cancers, l'expression des récepteurs de mort est diminuée ou abolie. Cette diminution est sous le contrôle de l'oncogène *p53* qui diminue l'expression des récepteurs et/ou leurs translocations sur la membrane de la cellule (Sheikh et Fornace, 2000b ; Bennett *et al*, 1998). La diminution de ces récepteurs de mort peut contribuer à l'échappement des tumeurs aux contrôles du système immunitaire ou à l'action des drogues anticancéreuses. Par ailleurs, il a été reporté qu'une hyperglycosylation de Fas diminue son affinité pour Fas L (Peter *et al*, 1995) dans les lymphomes de type B (Keppler *et al*, 1999). Enfin, l'expression de récepteurs de leurre permet de diminuer la biodisponibilité du ligand pour le récepteur de mort. Les études *in vitro* montrent qu'une diminution de l'expression de l'oncogène *p53* entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs de leurre (Sheikh et Fornace, 2000b). *In vivo*, les tumeurs du colon et du poumon surexpriment l'ARNm de leurre de Fas, DcR3 (Pitti *et al*, 1998 ; Yu *et al*, 1999) ; l'expression de DcR3 est également retrouvée dans les gliomes (Roth *et al*, 2001). Enfin, des études reportent l'expression des récepteurs de leurre de TRAIL, DcR1 et DcR2, dans des cellules cancéreuses du colon ou de l'utérus (Meng *et al*, 2000 ; Bernard *et al*, 2001).

IV.2- Surexpression des FLIPs

Les protéines FLIPs (Fas-associated death-domain-like IL-1 β -coverting enzyme-Inhibitory Protein; c-FLIP, CASPER, I-FLICE, Flame, CASH, CLARP, MRIT, Usurpine) sont des protéines issues d'un seul gène et résultent d'un épissage alternatif. Elles sont caractérisées par la présence de deux domaines DED. Les c-FLIP $_{\alpha}$, c-FLIP $_{\beta}$ et c-FLIP $_{\gamma}$ sont également caractérisées par la présence d'un domaine homologue aux sites actifs des caspases-8 et -10. Contrairement à la caspase-8, ces variants de c-FLIPs ne possèdent pas de site actif de clivage fonctionnel. La liaison des FLIPs à FADD empêche le recrutement des pro-caspases-8 en aval des récepteurs de mort (Scaffidi *et al*, 1999).

Les c-FLIPs sont augmentées dans les cancers (Kim *et al*, 2000 ; Ryu *et al*, 2001), cependant les mécanismes de régulation de l'expression des c-FLIP ne sont pas totalement éclaircis. Ainsi, l'activation des MAP-kinases augmenterait l'expression des c-FLIP (Yeh *et al*, 1998). Récemment Panka *et al* (2001) ont décrit que la synthèse des c-FLIP pourrait être augmentée par la voie de survie PI3 kinase/Akt.

IV.3- Expression de SODD

SODD (Silencer Of Death Domains) est une protéine de 457 acides aminés qui interagit avec le TNFR-1 et le DR3 *via* les domaines de mort de ces récepteurs pour empêcher leur trimérisation et le recrutement des autres adaptateurs (Jiang *et al*, 1999). Les relations entre la protéine SODD et les récepteurs de mort ou d'autres protéines sont encore mal connues. L'analyse de la structure primaire de la protéine SODD montre que cette protéine ne contient pas de domaine de mort mais présente des homologies avec les protéines BAG (Tschopp et al, 1999).

In vitro, les expériences réalisées montrent qu'une surexpression de la protéine SODD dans des cellules de mélanome inhibe la liaison de TRADD aux récepteurs de mort et supprime ainsi l'induction de l'apoptose. Au contraire, l'expression d'un ARNm anti-sens de SODD décroît la viabilité des cellules transfectées (Jiang *et al*, 1999). Les conséquences de ces modifications de l'expression de SODD dans les cancers n'ont pas encore été étudiées.

IV.4- Surexpression des IAPs

Les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein) constituent une famille qui comporte à ce jour 8 membres : XIAP ("X chromosome linked IAP" ou MIHA, ILP), c-IAP1 (ou MIHC, HIAP2), cIAP2 (ou MIHB, HIAP1), NIAP, la Survivine, BRUCE, ML-IAP (ou la livine) et KIAP. Cette famille est caractérisée par la présence d'un à trois domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat"). Les domaines BIR sont responsables des interactions avec les caspases. Ainsi, le domaine BIR-2 du XIAP se lie à la caspase-3 et le domaine BIR-3 se lie à la caspase-9 (Roy et al, 1997 ; Deveraux et al, 1999). Certains IAPs possèdent en plus un domaine RING (Really Interesting New Gene) ou des domaines CARD (LaCasse et al, 1998; Deveraux et Reed, 1999). Les IAPs inhibent l'apoptose en inhibant les caspases ou en activant NF-KB (Nuclear Factor-kappa B). Ainsi, les IAPs inhibent l'activation des caspases (Deveraux et al, 1998), l'action des caspases en bloquant le site actif de la caspase (Sun et al, 2000) et augmentent la dégradation des caspases en permettant l'ubiquitinisation du complexe IAP/Caspase (Yang et al, 2000). D'autre part, les IAPs activent la kinase IKK2 (IKB kinase), IKK2 phosphorylant IκB (Inhibitor of NF-κB) (Karin, 1999). Cette phosphorylation permet la libération de NF-kB qui passe dans le noyau pour exercer son rôle de facteur de transcription (Mercurio et Manning, 1999).

Bien que les mécanismes d'action des IAPs soient largement étudiés ; in vivo, les études se sont surtout portées sur la survivine qui a la particularité d'être exprimée uniquement pendant l'embryogenèse ; après la naissance, son expression n'est plus détectée que dans les cancers. Ainsi, une diminution de l'expression de la survivine a été reporté dans plus de 60 lignées cancéreuses et particulièrement dans les cancers du sein et du poumon (Tamm *et al*, 1998). D'autre part, l'activité des IAPs peut être renforcée par la diminution de l'expression de leurs inhibiteurs. En effet, il a été reporté que l'expression de XAF1 (XIAP Associated Factor 1) est diminuée dans les cancers du foie (Fong *et al*, 2000).

IV.5- Surexpression des HSPs

Les HSPs (Heat Shock Proteins) sont des protéines chaperones. Elles se lient à d'autres protéines pour augmenter la demi-vie et/ou permettre une conformation optimale de ces protéines (Lindquist et Graig, 1988). HSP 70 se lie à BAG-1 par son domaine ATPase entraînant une inhibition de l'apoptose par l'activation de SODD, de Ras/Raf ou de Bcl-2 et par inhibition de JNK/SAPKinase ou de la caspase-3 (Jäättelä, 1999 ; Schmitz *et al*, 2000). HSP 27 a été également reportée comme inhibant l'activation de la caspase-9 (Garrido *et al*, 1999). D'autre part, l'HSP 27 interagit ave Daxx pour bloquer l'apoptose induite par Fas (Charrette *et al*, 2000).

La surexpression des HSPs 27 et 70 augmentent la tumorigénicité des cellules cancéreuses chez le rat et la souris (Jäättela, 1995; Garrido *et al*, 1998). Chez l'humain, l'expression d'HSP 70 est un mauvais facteur pronostic dans les cancers du sein, elle est corrélée à une diminution de la survie sans récidive, une augmentation de la prolifération et de l'envahissement ganglionnaire (Vargas-Roig *et al*, 1997; Lazaris *et al*, 1997). De plus, la

réponse aux traitements chimiothérapiques et radiothérapiques des cancers du sein est inversement corrélée à la présence d'HSP 70 (Vargas-Roig et al, 1998; Liu et al, 1996).

.

Matériels et méthodes

I- Cellules mammaires humaines

I.1- Lignées cancéreuses de sein

La lignée MCF-7 a été établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome du sein de type canalaire invasif. Le nombre de chromosomes varie entre les formules hypertriploïdes et hypotétraploïdes. Cette lignée a conservé certaines caractéristiques d'un épithélium mammaire différencié. Ainsi, les cellules MCF-7 présentent des récepteurs pour les hormones stéroïdiennes telles que les oestrogènes, la progestérone et les glucocorticoïdes.

La lignée T47-D a été établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome de type canalaire invasif. Elle est triploïde, forme un épithélium différencié et possède des récepteurs pour les hormones stéroïdiennes.

La lignée MDA-MB-231 a été établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome métastatique du sein. Cette lignée est caractérisée par un phénotype fibroblastoïde et possède un nombre de chromosomes hypotriploïde (en moyenne 67). Les cellules MDA-MB-231 n'expriment pas de récepteurs pour les oestrogènes et la progestérone. Elles sont tumorigènes et forment des métastases chez la souris *nude*.

La lignée BT-20 a été établie par isolement et culture de cellules échappées d'une tumeur en culture primaire. Elle est hyperdiploïde avec des chromosomes fragmentés et forme des adénocarcinomes de grade II dans les souris *nude*.

I.2- Cellules mammaires humaines normales

Les cellules épithéliales et fibroblastiques mammaires humaines normales sont issues de mammoplasties réalisées, chez des patientes saines âgées de 18 à 30 ans, dans le département de chirurgie plastique et reconstitutrice du Pr. Pellerin (Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille).

II- Culture cellulaire

II.1- Culture des lignées cancéreuses de sein

Les cellules cancéreuses de sein (MCF-7, T47-D, MDA-MB-231 et BT-20) sont cultivées en flasques 75 cm² (NUNC) dans du milieu EMEM-5% SVF composé d'EMEM (Milieu Essentiel Minimum de Eagle avec sels de Earle ; Biowhittaker) complémenté avec : 5% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVF) (Life Technologies), 1% d'acides aminés non essentiels (Biowhittaker), 2 mM de L-glutamine, 5 μ g/ml d'insuline (endopancrine, Organon), 40 UI/ml pénicilline et 40 μ g/ml streptomycine (Life Technologies). Le pH du milieu est ajusté à 7,4 avec 25 mM d'HEPES et 0,22% de bicarbonate de sodium.

Lorsque les cellules sont à pré-confluence, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées avec du PBS stérile pH 7,4 pour éliminer les traces de sérum. Les cellules sont ensuite incubées en présence de 1 ml de trypsine/EDTA (Versène, Biowhittaker). Lorsqu'elles sont décollées, l'action de la trypsine est inhibée en ajoutant 5 ml de milieu EMEM-5% SVF. Les cellules sont ensuite réensemencées au $1/10^{ième}$ dans de nouvelles flasques de culture en présence de milieu riche. En sevrage, les cellules sont incubées dans un milieu DME/HAM F12 (Sigma) auquel sont ajoutés 30 µg/ml de transferrine, 2 µg/ml de fibronectine et les mêmes quantités d'acides aminés non essentiels, de glutamine et d'antibiotiques que pour le milieu EMEM-5% SVF.

II.2- Cultures primaires des cellules normales de sein

Les cellules épithéliales mammaires normales humaines (CEMN) sont obtenues à partir de réduction mammaires et préparées selon la technique décrite par Soule et Mc Grath (1986). Après avoir été dégraissé, l'échantillon mammaire est dilacéré en petits fragments à l'aide de ciseaux stériles dans du SVF. Les fragments sont ensuite digérés, à 37° C sous agitation, avec de la collagènase de type XI (500 UI/ml) et de la hyaluronidase (150 UI/ml) pendant 4 à 5 h en milieu dépourvu de sérum. Les organoïdes issus de cette digestion sont séparés par centrifugation sur ficoll (300 x g, 30 min). Les organoïdes situés à l'interface sont rincés deux fois par centrifugation (300 x g, 15 min) dans du milieu pré-B1 constitué de DME/HAM F12, 10 mM Hepes, 20 mM NaOH, 0,22% bicarbonate de sodium, 2 mM glutamine, 100 UI/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine. Le culot est repris dans un milieu de culture B1 constitué de milieu pré-B1 complémenté avec 10 µg/ml d'insuline, 2 ng/ml d'EGF, 100 ng/ml de toxine cholérique, 5.10⁻⁶ M de cortisol, 10% de SVF et 1,05 mM de CaCl₂. Le surnageant contient les cellules fibroblastiques qui sont mises en culture dans le même milieu B1 exempt de toxine cholérique.

Après 7 à 10 jours, les cellules épithéliales essaiment à partir des organoïdes et se dispersent au fond de la boîte de culture. Lorsqu'elles atteignent la confluence, les cellules sont mises en présence d'un milieu B1 contenant seulement 40 μ M de Ca²⁺. La faible teneur en Ca²⁺ facilite la division cellulaire et permet aux cellules de rester en suspension dans le milieu de culture. Les cellules en suspension sont récupérées par centrifugation puis réparties dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre et cultivées en milieu B1.

II.3- Production de milieu conditionné par les cellules mammaires normales

Les cellules sont cultivées en boîte de Pétri de 100 mm de diamètre en milieu B1. A préconfluence, les cellules sont rincées 2 fois avec du milieu pré-B1 puis incubées 2 heures dans ce milieu avant de subir deux nouveaux rinçages de pré-B1. Les cellules sont alors cultivées dans 10 ml de pré-B1 et le milieu est récupéré à 24 et 48 h. Tous les milieux conditionnés sont rassemblés et filtrés de façon stérile sur membranes de porosité 0,22 μm. Les milieux sont conservés à -20°C pour des périodes de 6 mois maximum.

II.4- Transfections

1) Transformation des bactéries

Le produit de ligation (plasmide + insert) (2 μ l) et les bactéries compétentes (*E. coli*, JM109) sont placés 20 min dans la glace, 40 s à 42°C puis 2 min dans la glace. Les bactéries sont alors incubées dans 250 μ l de milieu SOC (Promega) (15 min, 37°C; puis 75 min, 37°C, sous agitation douce). Le produit de la transformation est étalé en boîte de Pétri sur gélose LB (10 g de bactotryptone ; 5 g extrait de levure ; 10 g NaCl ; 15 g agar ; 50 mg d'ampicilline ; H₂O qsp 1 litre ; pH 7).

2) Extraction de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait grâce au kit QIAGEN Plasmid purification selon les recommandations du fabricant (QIAFilter Plasmid Maxi Kit, QIAGEN). La culture bactérienne est centrifugée (5500 x g, 20 min, 4°C). Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 10 ml de tampon P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8 ; 10 mM EDTA ; 100 µg/ml RNAse A). On ajoute ensuite 10 ml de tampon P2 (200 mM NaOH ; 1% SDS) (5 min, température ambiante). Après l'incubation, 10 ml de tampon P3 (3 mM acétate de potassium ; pH 5,5) sont ajoutés et l'ensemble est transféré immédiatement sur la colonne QIAFilter puis incubé 10 min à température ambiante. Le filtrat est ensuite passé sur la colonne QIAGEN-tip et lavé 2 fois avec 30 ml de tampon QC (1 M NaCl ; 50 mM MOPS ; pH 7 ; 15% isopropanol). L'ADN est élué avec 15 ml de tampon QF (1,25 M NaCl ; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 ; 15% isopropanol), précipité avec 10,5 ml d'isopropanol à température ambiante et centrifugé

(15000 x g, 30 min, 4°C). Le culot est lavé avec 5 ml d'éthanol 70% et centrifugé (15000 x g, 10 min, 4°C), puis séché (10 min, à l'air) avant d'être repris dans 500 μl de tampon TE (10 mM Tris-HCl ; pH 8 ; 1 mM EDTA).

3) Transfections transitoires

Les transfections transitoires ont été réalisées en utilisant la lipofectine (Life technologies) pour les cellules MCF-7 et T47-D et la lipofectamine (Life technologies) pour les cellules MDA-MB-231.

Les cellules sont ensemencées à la densité de 2.10^5 cellules par boîte de Pétri de 35 mm de diamètre dans du milieu EMEM-5% SVF. Après 24 h, les cellules sont rincées puis incubées 5 à 6 h dans 1 ml de milieu OptiMEM (Life Technologies) contenant 8 µl de lipofectine ou de lipofectamine, 0,5 µg de vecteur contenant la green fluorescent protein (EGFP-C1) (Clontech) et 0,5 à 1 µg du vecteur d'intérêt. Les cellules sont alorz cultivees 24 h dans de l'EMEM-5% SVF avant traitement.

III- Mesure de la croissance cellulaire

III.1- Croissance en monocouche

L'ensemencement est réalisé à la densité de 50000 cellules par boîte de Pétri de 35 mm de diamètre dans du milieu EMEM-5% SVF. Après 24 h, les cellules sont rincées deux fois 10 min puis incubées pendant 24 h dans du milieu pré-B1. A ce moment, le milieu est renouvelé et les cellules sont traitées en présence ou en absence de milieu conditionné par les cellules normales. A la fin du traitement les cellules sont décollées grâce à la trypsine. Les cellules sont ensuite incubées dans une solution de bleu trypan (0.04 % en concentration finale) puis les cellules viables sont comptées à la cellule de Malassez.

III.2- Croissance en gel de collagène

L'ensemencement est réalisé à la concentration de 2.10^5 cellules par puits dans une plaque de culture 12 puits (diamètre : 17 mm). Un volume de suspension cellulaire est mélangé à un volume de solution de collagène. La solution de collagène est préparée extemporanément et est conservée dans la glace. Cette solution est constituée d'un volume de bicarbonate de sodium à 22,2 g/l, un volume d'EMEM 10X et de 8 volumes de collagène de queues de rat dialysé à 1,5 mg/l. Lorsque le gel est pris, 1 ml d'EMEM-3% SVF supplémenté par 2 µg/ml de fibronectine est ajouté dans le puits. Le lendemain, le milieu est renouvelé et les cellules sont traitées en présence ou en absence de milieu conditionné par les CEMN. A la fin du traitement, les gels de collagène sont digérés par une solution de collagènase XI à 2 UI/µl. Les cellules sont incubées dans une solution de bleu trypan (0,04 % en concentration finale) et les cellules viables sont comptées à la cellule de Malassez.

ĝ

III.3- Croissance en agar-mou

L'ensemencement est réalisé à 50000 cellules par puits dans une plaque de culture 6 puits (diamètre : 35 mm). Une première couche d'agar ne contenant pas de cellule est coulée dans les boîtes. Elle est constituée d'un mélange de 55% de EMEM-5% SVF 2X et 45% d'agar à 1,25% maintenu à 45°C. Après solidification de cette couche inférieure, les cellules sont ensemencées dans un volume de suspension cellulaire dilué dans deux volumes du mélange EMEM/agar. Après solidification de la couche supérieure, les cellules sont traitées ou non en ajoutant 2 ml de milieu EMEM-5% SVF en présence ou absence de milieu conditionné par les CEMN. Les milieux de culture sont changés tous les 2 jours. A la fin du traitement (7 à 13 jours), on dénombre les colonies/champ dans chaque puits. Une colonie est prise en compte si elle comporte un minimum de 20 cellules.
III.4- Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules sont ensemencées à 1.10⁶ cellules par boîte de Pétri de 100 mm de diamètre dans un milieu EMEM-5% SVF. Après 24 h, les cellules sont rincées 2 x 10 min puis incubées pendant 24 h dans du milieu pré-B1. A ce moment, le milieu est renouvelé et les cellules sont traitées en présence ou en absence de milieu conditionné par les cellules normales. A la fin du traitement, les cellules sont décollées par la trypsine et rincées 2 fois par centrifugation dans du PBS (300 x g, 15 min) puis comptées à la cellule de Malassez. 1 x 10⁶ cellules sont reprises dans 200 µl de PBS et fixées en ajoutant lentement 1 ml d'éthanol glacial (-80°C), tout en vortexant. Après cette fixation (10 min, -20°C), les cellules sont rincées par centrifugation (300 x g, 15 min) dans du PBS. Le culot est alors repris dans 200 µl de solution de PBS contenant de la RNAse A (0,25 µg/ml, 15 min, température ambiante) et les cellules sont marquées par 1 ml de solution d'iodure de propidium (25 µg/ml iodure de propidium ; 0,05% Triton-X100) (35 min, température ambiante). Juste avant l'analyse, les cellules sont séparées par filtration à travers une membrane de nylon (Scrynel NYHC NYLON, porosité 60 µM, Polylabo). L'analyse de la répartition des cellules dans le cycle est réalisée par cytométrie en flux (Coulter Epics XL/XL-MCL, λexc.=488 nm, λemission= 620 nm, programme Expo cytometer Software V.2 de Beckman Coulter).

III.5- Détection de l'apoptose

1) Marquage au Hoechst

Les cellules sont ensemencées à la densité de 1.10⁵ cellules par boîte de Pétri de 35 mm de diamètre sur des lamelles en verre traitées au collagène de queue de rat. A la fin du traitement, les cellules sont fixées au méthanol (10 min, -20°C). Après 3 rinçages au PBS, elles sont incubées à l'obscurité avec la solution de Hoechst 33258 (1 mg/l, 30 min, température ambiante). Après 2 rinçages au PBS, les lamelles sont montées au glycergel. Les noyaux des

cellules apoptotiques sont repérés au microscope à fluorescence Olympus BH2. Ils sont caractérisés par leur morphologie : condensation périnucléaire de la chromatine, hypercondensation de la chromatine et formation de vésicules apoptotiques.

2) Technique TUNEL

Les cellules sont ensemencées à la densité de 1.10^5 cellules par boîte de Pétri de 35 mm de diamètre sur des lamelles en verre traitées au collagène de queues de rat. Après traitement, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (PAF) (4%, 30 min, 4°C). Après élimination du fixateur, les cellules sont incubées dans une solution de blocage (3% H₂O₂; méthanol) (15 min, température ambiante) puis perméabilisées (1% Triton X100; 1% citrate de sodium dans PBS) (3 min, 4°C). Les cellules sont incubées dans la solution de marquage contenant la transférase terminale et les dUTP marqués au FITC (60 min, 37°C). Le marquage est visualisé directement au microscope à fluorescence Olympus BH2 ou amplifié par incubation (30 min, 37°C) dans une solution contenant un anticorps anti-FITC couplé à la peroxydase. La révélation est alors effectuée au DAB (Fast-DAB, Sigma) et le marquage est visualisé, après montage au glycergel, en microscopie optique. Entre chaque étape, 3 rinçages au PBS sont effectués.

3) Visualisation des échelles d'ADN

Les cellules sont ensemencées à la densité de 5.10^5 cellules par boîte de Pétri de 60 mm de diamètre. Après traitement, l'extraction de l'ADN est réalisée en lysant les cellules dans 2 ml d'hypochloride de guanidium (7 M, 30 min, 4°C) ; puis le lysat est mélangé à 1 ml de résine échangeuse d'anions (Wizard Minipreps DNA Purification Resin, Promega). Après centrifugation (2000 x g, 3 min, température ambiante), les billes de résine sont reprises dans 3 ml de solution de rinçage et déposées sur une mini-colonne (Wizard Minicolumn, Promega). L'ADN est élué par centrifugation (5000 x g, 5 min, température ambiante) dans du tampon

TE. L'ARN résiduel est éliminé par digestion enzymatique (RNAse A, 1 μ g/ml, 30 min, 37°C).

Les fragments internucléosomiques générés lors de l'apoptose sont amplifiés par la technique de LM-PCR (Clontech Laboratories). L'ADN est visualisé après électrophorèse (50 V, 4 h) en gel d'agarose (1,2%) contenant du bromure d'éthidium.

4) Marquage à l'annexine V

Les cellules sont ensemencées à la densité de 1.10⁵ cellules par boîte de Pétri de 35 mm de diamètre sur des lamelles en verre traitées au collagène de queues de rat. Les cellules sont fixées au PAF (4%, 30 min, 4°C). Après 2 rinçages au PBS, elles sont incubées (10 min, température ambiante) en présence d'Annexine V couplée au FITC (Kit Roche Diagnostic). Après rinçage, les lamelles sont immédiatement analysées au microscope à fluorescence Olympus BH2.

IV-Immunodétection des protéines

IV.1- Fractionnement cellulaire

Après traitement, les cellules sont raclées dans le tampon d'extraction (50 mM HEPES pH 7,0 ; 50 mM KCl ; 1 mM NaVO₃ ; 5 mM MgCl₂ ; 5 mM EGTA ; 10 μ g/ml leupeptine ; 1 mM PMSF). Puis les cellules sont éclatées par 5 cycles de congélation/décongélation en passant les cellules de –196°C à 37°C. Après centrifugation (1.10⁵ x g, 1 h, 4°C), le culot (membranes et organelles) est repris dans 1 ml de tampon d'extraction et le surnageant (cytosol) est concentré par ultra-filtration sur membrane de type Amicon (seuil de coupure de 3 kDa, Pal Gelman Science).

IV.2- Western blot

Après traitement, les cellules sont lysées (150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1% NP40; 0,1% SDS; 1 mM orthovanadate; 1 mM PMSF; 1 mM Na₄P₂O₇; 10 μ g/m leupeptine; 10 μ g/ml aprotinine; 1 μ g/ml pepstatine A), chauffées (10 min, 100°C) et le lysat est clarifié par centrifugation (10000 x g, 5 min). La concentration en protéines des échantillons est estimée par dosage Biorad (Biorad Protein Assay, Amersham).

Les lysats protéiques sont chauffés (10 min, 65°C) dans du tampon de Laemmli (1% SDS ; 1% β -mercaptoéthanol ; 20% glycérol ; 10mM Tris pH 6,8 ; 30 μ l/5 ml bleu de bromophénol). Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont réalisées sur plaques (80 x 60 x 1,5 mm) dans un MiniSystem Biorad (mini Protean II). La migration est réalisée dans du tampon Tris/Glycine (20 mM Tris ; 200 mM glycine ; 0,1% SDS) en gel de 10, 12 ou 15% d'acrylamide. Les protéines migrent 45 min à 100 V et les poids moléculaires sont déterminés par rapport à des témoins de masse standard (Pharmacia Biotech).

Après la migration, le gel est équilibré quelques minutes dans le tampon de transfert (25 mM Tris ; 200 mM glycine ; 20% méthanol) puis les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (200 mA, 1 h) (Schleisser et Schüll). L'homogénéité du transfert est vérifié par coloration au rouge Ponceau (Sigma).

La membrane est saturée (3 h, température ambiante) dans une solution de TBS pH 7,6 (150 mM NaCl ; 10 mM Tris ; 0,1% Tween 20) contenant 3% de Sérum Albumine Bovine (SAB). Après trois lavages au TBS, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dans une solution de TBS-3% SAB (16 h, 4°C). Elle est ensuite lavée 6 fois dans du TBS puis incubée avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (2 h, température ambiante). La membrane est lavée 4 fois au TBS et le complexe antigène-anticorps est révélé par chimioluminescence à l'aide d'un kit Pierce.

IV.3- Détermination des marqueurs épithéliaux

Les cellules épithéliales expriment, dans la majorité des cas, les cytokératines-18 et -19 ; les cellules myoépithéliales expriment la cytokératine-14 et l' α -actine lisse ; les cellules fibroblastiques expriment la vimentine. La détection de ces marqueurs est effectuée par immuno-cytochimie.

Les cellules sont ensemencées à la densité de 50000 cellules par boîte de Pétri de 35 mm de diamètre sur des lamelles en verre traitées au collagène de queues de rat. Après deux jours de culture, les cellules sont rincées 2 fois au PBS puis fixées au méthanol (10 min, -20°C). Après 2 rinçages au PBS, les sites non spécifiques sont bloqués par une solution de saturation (30% de méthanol ; 0,3 % H₂O₂; 1% SAB) (30 min, température ambiante). Après 2 rinçages au PBS, les cellules sont incubées dans 50 µl d'anticorps primaire (1/200^{ième} dans du PBS ; 0,5% Tween 20 ; 0,5% SAB) (2 h, 37°C). Les cellules sont alors rincées dans du PBS et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (1/500^{ième} dans du PBS ; 0,5% Tween 20 ; 0,5% SAB) (1h, 37°C). L'excès d'anticorps est eliminé par 2 rinçages au PBS et la révélation est effectuée par le système Fast-DAB (Sigma) (10 min, température ambiante). Après 2 rinçages à l'eau courante les cellules sont contre-colorées en trempant les lames dans une solution d'hématoxyline de Harris (30 s, température ambiante) et sont rincées à l'eau courante. Le montage est effectué au glycergel (Dako) et les lamelles sont observées au microscope pour déterminer la proportion de cellules marquées.

V- Retard sur gel et super-shift

V.1- Préparation des extraits nucléaires

Les extraits nucléaires sont préparés selon la méthode décrite par Lin *et al* (1995). Brièvement, les extraits sont préparés à partir de cultures cellulaires effectuées en boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre. Après traitement ou transfection, les cellules sont raclées dans 2

- 50 -

x 1 ml de PBS froid. Après centrifugation (300 x g, 15 min), les cellules sont éclatées par 400 μ l tampon hypotonique (10 mM HEPES, pH 7,8 ; 10 mM KCl ; 2 mM MgCl₂ ; 0,1 mM EDTA ; 3 mM DTT) (17 min, 4°C, sur un agitateur de type soleil). Les membranes lipidiques sont alors désorganisées par ajout de 3 μ l de NP40 immédiatement suivi d'une centrifugation (12000 x g, 5 min, 4°C). Le culot correspondant à la fraction nucléaire est alors repris dans un tampon hypertonique (50 mM HEPES ; 50 mM KCl ; 300 mM NaCl ; 0,1 mM EDTA ; 3 mM DTT ; 10% glycérol (vol/vol)) (30 min, 4°C, sur un agitateur de type soleil). Après centrifugation (12000 x g, 10 min, 4°C), le surnageant correspondant à la fraction nucléaire est récupéré et la concentration en protéines est estimée en utilisant le dosage Biorad (Biorad Protein Assay, Amersham).

V.2- Préparation de la sonde

La sonde contenant la séquence consensus kB (Promega) est préparée selon les recommandations du fabricant avec un kit QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen). Séquence de la sonde : 5' AgTTgAggggACTTTCCCAggC 3'

3' TCAACTCCCCTgAAAgggTCCg 5'

V.3- Hybridation et révélation

Cinq µg de protéines des extraits nucléaires sont pré-incubés dans une solution d'hybridation qsp 18 µl (10 min, température ambiante) puis 1 µl de poly-d-IdC à 0,5 mg/ml est ajouté (20 min, température ambiante) avant l'hybridation avec 1 µl de sonde marquée (20 min, température ambiante). Les échantillons sont alors déposés sur un gel d'acrylamide à 4% ayant subit un "pré-run" (15 min, 200 V). La migration est effectuée à voltage constant (200 V, 2 h). Après migration, les gels sont séchés (1 h, 80°C) avant leur mise en exposition. Dans les expériences de super-shift, 2 μ l d'anticorps sont ajoutés lors de la pré-incubation dans la solution d'hybridation.

VI- Mesure d'activité de la PI3 kinase

Les cellules sont cultivées pendant 2 heures avec ou sans milieu conditionné de CEMN en présence ou absence de wortmannine (100 nM). Les cellules sont ensuite stimulées ou non par le des(1-3)IGF-I (analogue de l'IGFI ne se liant pas ou faiblement aux IGFBPs) (20 nM, 6 min, 37°C), avant d'être lysées dans un tampon A (20 mM Tris, pH 7,4 ; 137 mM NaCl ; 100 mM NaF; 10 mM EDTA; 2 mM Na₃VO₄; 10 mM pyrophosphate; 1 mM PMSF; 100 UI/ml aprotinine ; 1% NP40). Les lysats sont ensuite incubés avec l'anticorps anti-IRS-1 couplé à des billes de protéine-A-sépharose (2 h, 4°C, sous agitation). Après centrifugation (12000 x g, 5 min, 4°C), les culots sont lavés deux fois de suite et successivement par les tampons suivants : tampon B (1% NP40; 200 µM Na₃VO₄ dans PBS); tampon C (100 mM Tris, pH 7,4; 0,5 mM LiCl; 200 µM Na₃VO₄); tampon D (10 mM Tris, pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 200 µM Na₃VO₄). L'activité de la PI3 kinase est alors mesurée par la phosphorylation in vitro des phosphatidyl-inositols (PI). Les produits de la réaction sont séparés par chromatographie sur couche mince dans un tampon méthanol/chloroforme/ammoniaque/H₂O (60/47/4,4/8,8) (vol). Après séparation, les spots correspondants au PI-P3 sont visualisés par autoradiographie, découpés et analysés au compteur gamma.

VII- Caractérisation des protéines par spectrométrie de masse

<u>VII.1- Concentration et purification des protéines pro-apoptogènes du MC-CEMN</u> Dix litres de milieu conditionné de CEMN (MC-CEMN) sont concentrés par ultra-filtration sur une cartouche de type Ultrassette Filtron (Pal Gelman Science) (seuil de coupure 30 kDa).

Le MC-CEMN est ensuite passé sur trois cartouches Sep-Pak de 1 cm³ montées en série et préalablement réhydratées par 10 ml de méthanol. Après deux rinçages par 10 ml d'eau acidifiée (0,05% acide trifluoroacétique dans H₂O), les protéines retenues sont éluées successivement par des solutions à 50, 80 et 100% d'acétonitrile (ACN) dans de l'eau acidifiée. Les fractions recueillies sont lyophilisées et reprises dans l'eau acidifiée avant passage en HPLC (chromatographie haute pression en phase liquide). Les HPLC ont été réalisées sur un système Beckmann Gold 126 équipé d'un détecteur à l'iode. L'absorption des protéines est mesurée en sortie de colonne dans l'UV à deux longueurs d'onde ($\lambda = 214$ nm et 225 nm). Les fractions sont collectées manuellement et leur activité apoptogène est mesurée sur les cellules MCF-7. La quantité utilisée est déterminée par le facteur de dilution par rapport au milieu conditionné non concentré.

Les fractions 50, 80 et 100% ACN issues de Sep-Pak sont tout d'abord analysées en HPLC préparative sur colonne Sephasil C4 Vydac (214TP53, 250 x 3,2 mm, 5 μ m), puis les fractions biologiquement actives sont analysées en HPLC analytique sur colonne Sephasil C4 Vydac (214TP510, 250 x 10 mm, 5 μ m). Pour éviter toute saturation, une colonne de garde est adaptée en amont de la colonne d'HPLC (Sephasil C4 Vydac, 214GD54, 10 x 2,1 mm, 5 μ m).

En HPLC préparative, l'élution est effectuée selon un gradient d'acétonitrile/eau acidifiée linéaire de 15 à 80% avec un débit constant (2 ml/min). Les fractions correspondantes aux pics d'absorption sont collectées dans des tubes en polypropylène (Nalgène), lyophilisées et reprises dans l'eau acidifiée pour leur passage en HPLC analytique. Les élutions des HPLC analytiques sont effectuées selon des gradients d'acétonitrile/eau acidifiée différents selon les fractions obtenues en HPLC préparative, au débit de 0,5 ml/min.

VII.2- Electrophorèse et détection des protéines

Après HPLC, les échantillons sont lyophilisés. Les protéines sont alors reprises dans 100 μ l de tampon de Laemmli et chauffées (5 min, 100°C). L'électrophorèse en gel (10 x 12 cm) de 15% d'acrylamide est réalisée en ampérage constant (15 mA, 3 h). Après migration, les protéines sont colorées au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent. Pour la coloration au bleu de Coomassie, les gels sont placés 2 à 12 heures dans la solution de coloration (0,25% bleu de Coomassie R-250, 50% méthanol, 10% acide acétique dans H₂O) ; puis ils sont incubés dans 4 bains de solution de décoloration (25% méthanol, 7% acide acétique dans H₂O) (15 min, température ambiante).

Pour la coloration au nitrate d'argent, les gels sont fixés dans une solution de fixation (50% méthanol/10% acide acétique/H₂O, 2 h minimum, température ambiante). Après 3 rinçages à l'eau, ils sont incubés dans une solution de sensibilisation (2,5 mg/l DTT/H₂O, 30 min, température ambiante) et mis en présence de la solution de coloration (3 g/l nitrate d'argent/H₂O, 90 min, 4°C, à l'obscurité). Après deux rinçages à l'eau, un rinçage très bref est effectué par la solution de révélation (34,72 g de carbonate de calcium ; 2,25 ml de formaldéhyde, qsp 1L H₂O). Les gels sont alors replacés dans cette solution de révélation, l'évolution de la réaction est stoppée au bout de quelques minutes par une solution d'arrêt (3% acide acétique/H₂O). Après rinçages, les gels sont conservés à 4°C dans l'eau.

VII.3- Digestion enzymatique et caractérisation par spectrométrie de masse

1) Préparation des protéines

Pour les gels colorés au nitrate d'argent, une étape de réduction/alkylation est effectuée avant la digestion selon la méthode décrite par Shevchenko *et al* (1996). Brièvement, les bandes contenant les protéines sont découpées et déshydratées par 2 bains dans une solution d'ACN (50% ACN/50% H₂O, 20 min, température ambiante) et un bain d'ACN (20 min, température ambiante). L'ACN est ensuite évaporé dans un speed-vac et les échantillons sont recouverts -54d'une solution de réduction (10 mM DTT ; 100 mM NH_4HCO_3 ; H_2O) (1 h, 56°C). Après complet refroidissement, la solution de réduction est remplacée par une solution d'alkylation (55 mM iodoacétamide ; 100 mM NH_4HCO_3 ; H_2O) (45 min, température ambiante, sous agitation à l'obscurité). Les échantillons sont ensuite lavés 2 fois par 100 mM NH_4HCO_3 dans l'eau (10 min, température ambiante, sous agitation) suivie d'un bain d'ACN (10 min, température ambiante, sous agitation).

Pour les bandes colorées au bleu de Coomassie, elles sont déshydratées et décolorées par 3 bains (20 min, température ambiante, sous agitation) dans une solution de décoloration (50% ACN ; 100 mM NH₄HCO₃ ; H₂O).

2) Digestion des protéines

Les échantillons séchés au speed-vac sont disposées sur un parafilm[®] et réhydratés par 2 μ l de solution de carbonate d'ammonium (100 mM NH₄HCO₃, H₂O) et 4 μ l de tampon enzymatique (fourni par le fabricant avec la trypsine). Les protéines sont alors digérées par 5 μ l de trypsine (0,1 μ g/ μ l, "sequencing grade modified trypsin", Promega) (16 h, 37°C).

3) Extraction des fragments trypsiques du gel

Après digestion, les échantillons sont centrifugés (13000 x g, 5 min) et le surnageant contenant les peptides hydrophiles sont rassemblés dans un même tube. Les peptides digérés *in situ* sont extraits du culot par 2 incubations dans un premier tampon d'extraction (45% ACN; 10% acide formique; 45% H₂O) (20 min, température ambiante, sous agitation). Après chaque incubation, les échantillons sont centrifugés (13000 x g, 5 min) et les peptides récupérés dans le surnageant sont rassemblés dans le tube de départ. Les peptides les plus hydrophobes sont extraits, par la même méthode, dans un second tampon d'extraction (95%

ACN, 5% acide formique) et rassemblés dans le tube de départ. Les peptides sont alors séchés dans un speed-vac et conservés à -80°C avant analyse en spectrométrie de masse.

4) Analyse en spectrométrie de masse

Les échantillons ont été confiés au Dr. Jérôme Lemoine et Xavier Czeszak du Laboratoire de Chimie Biologie (UMR 8576, CNRS, USTL) pour l'analyse en spectrométrie de masse. Les échantillons sont analysés par MALDI-MS (spectromètre de masse à temps de vol de type Vision 2000, Finnigan, Bremen).

VIII- Western ligand blot.

Après 2 rinçages d'une heure dans du milieu pré-B1, 2.10^6 cellules sont cultivées pendant 24 h dans 10 ml de milieu. Les milieux conditionnés sont alors récupérés, filtrés (sur membrane de 0,22 µm) et congelés à -80°C avant l'expérience. Deux millilitres de milieu conditionné sont passés sur colonne Sephadex G-25 et élués par 1,25 ml d'acétate d'ammonium (0,03 M) avant d'être lyophylisés. Les extraits sont alors soumis à une électrophorèse en gel à 12,5 % d'acrylamide en conditions non réductrices. Après électrophorèse, les membranes sont rincées (3 x 1 min) dans une solution de TBS pH 7,6 (150 mM NaCl; 10 mM Tris; 0,1% Tween 20) puis sont bloquées dans une solution de TBS contenant 0,3% SAB (2 h, température ambiante). Les membranes sont alors incubées avec un mélange de ¹²⁵I-IGF-I et ¹²⁵I-IGF-II (2.10⁵ cpm pour chaque ligand) (12 h, 4°C). Après rinçages au TBS, les membranes sont séchées et mises en autoradiographie pendant 24 à 48 h.

Démarche expérimentale

Le développement des cancers du sein est extrêmement lent ; 8 à 10 ans peuvent s'écouler pour qu'une tumeur dépasse le seuil de détection infra-clinique. En effet, le développement tumoral résulte d'une succession d'altérations génétiques qui permettent à la cellule cancéreuse de croître de façon indéfinie puis de s'affranchir progressivement de leur environnement (Hanahan et Weinberg, 2000). On distingue différents stades dans le développement tumoral qui reflètent l'agressivité des cellules cancéreuses en fonction des mutations d'oncogènes et d'anti-oncogènes acquises par les cellules. Ainsi, les lignées de cancer du sein utilisées sont représentatives de certains stades du développement cancéreux : les lignées MCF-7 et T47-D sont des cellules encore bien différenciées, possédant une protéine P53 fonctionnelle, exprimant les récepteurs aux hormones stéroïdiennes ; elles représentent des stades précoces du développement tumoral. En revanche, les lignées MDA-MB-231 et BT-20 sont des cellules beaucoup moins différenciées, ne possédant plus de P53 fonctionnelle et sont insensibles aux hormones stéroïdiennes, elles représentent des stades plus avancés de cancer du sein.

Cependant, le développement tumoral ne dépend pas que de la nature des cellules cancéreuses, il est également influencé par les interactions entre les cellules cancéreuses et leur environnement. Ainsi, les travaux de Bissel (Weaver *et al*, 1996; Hagios *et al*, 1998; Bissel *et al*, 1999) montrent que des changements dans la composition des membranes basales peuvent aboutir à la transformation et à la cancérisation des cellules mammaires. Par ailleurs, en fonction des stades du développement cancéreux, les cellules cancéreuses sont soumises à l'action paracrine de facteurs produits par les cellules voisines. En effet, il a été reporté que les cellules épithéliales et myoépithéliales mammaires normales inhibent la croissance des cellules cancéreuses de sein (Van Roozendal *et al*, 1992; Le Bourhis *et al*, 1997; Xiao *et al*, 1999).

La croissance cellulaire résulte de la prolifération et de l'apoptose. Lors de mon stage de DEA, j'ai démontré que les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) induisent

l'apoptose des cellules cancéreuses de sein MCF-7 en co-culture, alors qu'elles n'induisent pas l'apoptose des cellules MDA-MB-231. Dans ce contexte, mon travail de thèse s'est articulé selon deux axes :

-l'étude des effets des CEMN sur la croissance des cellules cancéreuses de sein,

-la purification et la caractérisation des facteurs pro-apoptogènes produits par les CEMN.

Résultats

Partie 1 : Effets des CEMN sur la croissance des cellules cancéreuses de sein

Le développement tumoral ne dépend pas seulement de la nature des cellules cancéreuses mais aussi de leurs interactions avec les cellules normales environnantes. Dans les deux articles suivants (articles 2 et 3), nous avons démontré que les CEMN inhibent la croissance de plusieurs lignées cancéreuses de sein dans différentes conditions de culture. L'inhibition de la croissance est due à une induction de l'apoptose dans les lignées MCF-7 et T47-D. Dans les lignées MDA-MB-231 et BT-20, les CEMN ralentissent uniquement la prolifération. L'analyse en Western blots montre que l'apoptose induite par les CEMN est corrélée à une augmentation de l'expression de P21^{Waf1} et de P53 et une diminution de Bcl-2. Par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique (pifithrin- α) et des études de transfections transitoires, nous avons démontré que l'apoptose induite par les CEMN nécessite l'activation de tyrosine phosphatases dans les cellules cancéreuses.

Article 2 :

"Normal breast epithelial cells induce apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through a

p53-mediated pathway"

Cet article a été publié dans la revue :

"Molecular Cell Biology Research Communications" (vol 3; p 338-344 ; 2000).

Normal Breast Epithelial Cells Induce Apoptosis of MCF-7 Breast Cancer Cells through a p53-Mediated Pathway

Robert-Alain Toillon,* Eric Adriaenssens,* Danièle Wouters,† Severine Lottin,* Bénoni Boilly,* Hubert Hondermarck,* and Xuefen Le Bourhis*

*Laboratoire de Biologie du Développement, Equipe Facteurs de Croissance (UPRES 1033), Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; and †INSERM U459, Faculté de Médecine, 59000 Lille, France

Received July 17, 2000

Cancer development depends not only on the nature of the tumor cells themselves but also on the regulatory effects of various normal cells. The present study was performed to better understand the mechanism by which normal breast epithelial cells (NBEC) can control the growth of MCF-7 breast cancer cells. When MCF-7 cells were treated with NBEC conditioned medium, cell growth was inhibited in a concentrationdependent manner. This inhibition was due to an induction of apoptosis without any change in cell cycle progression. The induction of apoptosis was correlated with increased levels of p53, p21^{waf1} and decreased levels of bcl-2. Transient transfections of MCF-7 cells with two p53 cDNA constructs demonstrated the induction of apoptosis was mediated by endogenous p53. Taken together, our results indicate that NBEC inhibit the growth of MCF-7 breast cancer cells by inducing apoptosis in them via endogenous p53. o 2000 Academic Press

Key Words: breast cancer; cell growth; apoptosis; normal breast epithelial cells; p53.

The most prominent characteristic of tumors is the rapid increase of cell number, which is the result of an imbalance between cell proliferation and apoptosis. These two processes are regulated by the tumor suppressor oncogene p53. The p53-dependent G1 arrest is mediated by direct transactivation of $p21^{wa/l}$ which in turn encodes the inhibitor of cyclindependent kinases (1). Although the biological mechanism by which p53 regulates the G2/M transition remains largely nuclear, it has been reported that its activation results in the down-regulation of Weel expression and the dephosphorylation of Cdc2; the dephosphorylated Cdc2 increases cyclin/Cdc2 kinase activity, thus suppressing the G2 cell cycle check

point (2). p53 can induce apoptosis by modifying the expression of the bcl-2 family, as experimental overexpression of p53 is associated with a decreased expression of bcl-2 and an increased expression of bax, an antagonist of bcl-2 (3, 4).

Cancer development depends not only on the nature of the cancerous cells themselves, but also on the regulatory effects of various normal cells such as fibroblasts, endothelial cells and epithelial cells. This host regulation may be as great a determinant of a tumor cell's behavior in vivo as the specific oncogenic or tumor suppressor alterations occurring within the malignant cell itself (5). While fibroblasts and endothelial cells are believed to favour tumor development (5), normal breast myoepithelial cells and epithelial cells have been shown to exert an inhibitory effect on breast cancer cells (6-10). In addition, improving knowledge of mammary gland development, especially during postlactational involution, suggests that paracrine factors controlling mammary tissue homeostasis might be useful for breast cancer prevention and treatment (11). In a previous study we have demonstrated that normal breast epithelial cells (NBEC) inhibit the growth of breast cancer cells, especially that of hormonosensitive cells such as MCF-7 and ZR75 (7). The MCF-7 cell line is the prototype for hormono-sensitive breast cancer cells, which are representative of early stage of breast cancer development. The fact that MCF-7 cells are strongly growth-inhibited by NBEC suggests that NBEC may exert an important negative control over the early stages of breast cancer development in vivo. It therefore becomes important to understand the mechanism by which NBEC reduce the growth of cancer cells. The present work has demonstrated that NBEC inhibit the growth of MCF-7 breast cancer cells by inducing apoptosis. Moreover, this induction is mediated by endogenous p53.



MATERIALS AND METHODS

Materials

All cell culture reagents were obtained from Bio-Whittaker (France) except insulin which was obtained from Organon (France). EGF, type XI collage-33258, sheep anti-mouse IgG nase. Hoechst monoclonal antibody FITC-conjugated, trypan blue and electrophoresis reagents were from Sigma (U.S.A.). Mouse anti-bcl-2 and anti-p53 antibodies were obtained from TEBU (France). Mouse antip21^{waf1} and anti-bax antibodies were purchased from France Biochem (France). Annexin V and in situ cell death detection kits were provided by Roche Diagnostics (Germany). ECL reagents were obtained from Amersham Life Science (France). pEGFp-C1 plasmide containing Green Fluorescent Protein (GFP) cDNA was from Clontech and lipofectin reagent from Life Technologies (France).

Cell Culture

Normal breast epithelial cell (NBEC) cultures were established as described previously (7) from mammoplasty material (20- to 40-year-old women) obtained from Department of Plastic Surgery (Professor Pellerin) of the Medical University of Lille (France). Cells were cultured in DMEM/F12 (1/1) medium containing 5% fetal calf serum (FCS), 10 UI/ml insulin, 5 µM cortisol, 2 ng/ml EGF, 100 ng/ml cholera toxin, 100 μ g/ml penicillin and 45 μ g/ml gentamicin (B1 medium). When cells approached confluence, they were placed in the same medium except that the calcium concentration was reduced to 20 μ M. In this low calcium-containing medium, released floating daughter cells were collected and replated in B1 medium prior to experimentation. The epithelial phenotype of cells so obtained was controlled as described previously (7). The breast cancer cell line MCF-7 was obtained from the American Type Cell Culture Collection. Cells were routinely grown in EMEM medium supplemented with 10% FCS, 5 UI/ml insulin, 100 UI/ml streptomycin, 100 μ g/ml penicillin and 45 μ g/ml gentamicin.

Preparation of NBEC Conditioned Medium (NBEC-CM)

NBEC were plated in 75 cm² flasks (NUNC). When they reached confluence, they were washed and incubated in DMEM/F12 serum-free medium. Two hours later, the serum-free medium was changed and cells were further cultured for 24 h. The medium was then collected and stored at -70° C prior to use.



FIG. 1. NBEC inhibit growth of MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated by increasing quantities of NBEC-CM in serum-free medium. After 24 h of treatment, viable cell number was determined using trypan blue exclusion assay. The dotted line represents the number of plated cells.

Cell Growth Assays

MCF-7 cells were plated in triplicate at a density of $40,000 \text{ cells/cm}^2$ in 35-mm dishes. Cells were allowed to adhere overnight and then washed twice in PBS; the culture medium was replaced with serum-free medium for 2 h and then cells were treated with NBEC-CM for 24 h. At the end of the treatments, cells were harvested with 0.25% trypsin and counted with an hematocytometer. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion test.

Determination of Apoptotic Cells

Hoechst staining. Cells were fixed in cold methanol $(-20^{\circ}C)$ for 10 min and washed twice with PBS before staining with 1 μ g/ml Hoechst 33258 for 10 min at room temperature in the dark. Cells were then washed with PBS and mounted with coverslips using glycergel. Apoptotic cells exhibiting condensed and fragmented nuclei were counted under an Olympus-BH2 fluorescent microscope.

In situ DNA fragmentation detection. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 30 min, then permeabilized in 0.1% Triton X-100 buffer for 2 min at 4°C. The TUNEL reaction was performed using the Roche Diagnostic detection Kit.

Annexin V staining. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 30 min. Detection of phosphatidylserine translocation was

MOLECULAR CELL BIOLOGY RESEARCH COMMUNICATIONS



FIG. 2. Determination of MCF-7 apoptosis induced by NBEC. (A) Nuclear morphologies of apoptotic cells after Hoechst staining. a, nonapoptotic nuclei; b and d. nuclear hypercondensation and fragmentation; c, pycnotic nuclei. (B) DNA laddering. Lane 1, cells treated with 25% NBEC-CM. Lane 2, cells treated with 50% NBEC-CM. Lane 3, untreated cells cultured in serum-free medium. Lane 4, untreated cells cultured in serum-containing medium. Apoptosis is demonstrated by the formation of DNA laddering (lanes 1 and 2). MW, molecular weight (multiples of 100 bp).

performed by annexin V staining as described in standard assay using the Roche Diagnostic detection Kit.

Apoptotic cells were counted in randomly selected

fields. A minimum of 500-1000 cells was examined for each case, and the results expressed as the number of apoptotic cells as a proportion of the total number of cells counted.

Cell Cycle Analysis

Cells (1×10^6) were trypsinized and fixed in 70% ethanol (30 min, -20°C). Cells were washed with PBS and treated with 0.25 μ g/ml RNAse A (30 min, 20°C). Cells were then incubated with 20 μ g/ml propidium iodide (45 min, 20°C). The cell suspension was filtered and analyzed using a Coulter Epics XL/XL-MCl cytometer.

Western blots. Pre-confluent cell cultures were washed with PBS and lysed (30 min at 4°C) in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% SDS, 1 mM PMSF, 1 mM orthovanadate, 1 mM $Na_4P_2O_7$, 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml leupeptin). The lysate was sonicated, boiled and clarified by centrifugation (10,000g, 5 min at 4°C). The protein concentration of each sample was determined using a Bio-Rad protein assay Kit. Each sample (20 μ g) was then loaded onto 5% stacking/12% running SDS polyacrylamide gel. Immunoblots were blocked with 5% BSA. 0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline overnight at 4°C, then incubated with primary antibody (1:200 dilution, overnight at 4°C). Detection was performed using a goat anti-mouse secondary antibody (1:2000 dilution, 1.5 h at room temperature) and an ECL detection system.

Transient Transfections

MCF-7 cells were transiently cotransfected with a pL15TK plasmid containing antisense or temperaturesensitive p53 cDNA and a pEGFp-C1 plasmid containing Green Fluorescent Protein (GFP) cDNA. The different p53 constructs were as previously described (12). 2×10^5 cells were seeded into 35-mm dishes; the following day, cells were transfected with 1 μ g of the different plasmids and 10 μ l of lipofection reagent. Following transfection, cells were incubated in fresh medium for 18 h at 37°C. Cells were then treated with NBEC-CM for 16 h at 32°C or 37°C, fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and stained with Hoescht for apoptosis detection as described above. A random count of 500 GFP-positive cells was performed for each assay.

RESULTS AND DISCUSSION

NBEC Inhibit Growth of MCF-7 Cells by Inducing Apoptosis

MCF-7 cells were cultured in serum-free medium in the presence of different quantities of NBEC conditioned medium (NBEC-CM) for 24 h. Figure 1 shows that NBEC-CM inhibited growth of the MCF-7 cells in a dose-dependent manner. Inhibition of 50% was obtained when cells were treated with 2.5% NBEC-CM. In addition, the number of MCF-7 cells treated with



FIG. 3. NBEC induce apoptosis of MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were cultured in serum-free medium in the presence of different quantities of NBEC-CM. Following 24 h of treatment, apoptosis was determined after Hoescht staining as shown in Fig. 2. (B) Cells were cultured in serum-free medium in the presence of 25% NBEC-CM. Apoptotic cells were determined after different periods in culture. The figure shows the results of a triplicate assay in one experiment, which is representative of three independent experiments.

NBEC-CM was lower than the plated cell number, indicating cell loss. Therefore, we assessed the effect of NBEC on the induction of apoptosis in MCF-7 cells. Cells were treated as above and apoptosis was determined after Hoechst 33258 and annexin V staining as well as by the TUNEL reaction. As similar results were obtained using these different methods for cells cultured under the same conditions (data not shown), results shown in this report were based only on Hoechst staining. Typical apoptotic features are shown in Fig. 2A. Apoptosis was also confirmed by the formation of DNA ladders (Fig. 2B, lanes 1 and 2). When apoptosis was determined after 24 h incubation of MCF-7 cells with increasing quantities of NBEC-CM, we found that NBEC-CM induced apoptosis in a dosedependent manner (Fig. 3A). Moreover, when MCF-7 cells were treated with 25% NBEC-CM, a significant



FIG. 4. Cell cycle histograms of MCF-7. MCF-7 cells were cultured in the absence or presence of 25% NBEC-CM in serum-free medium for 24 h and then analyzed by flow cytometry as described under Materials and Methods.

increase in apoptosis was observed after 8 h of treatment (Fig. 3B); this increase continued thereafter and attained levels 4.5-fold of that of control after 24 h of treatment.

To determine whether NBEC-CM can also modify cell cycle progression of MCF-7 cells, we performed flux cytometry (Fig. 4). When cells were treated with 25% NBEC-CM for 24 h, no modification of cell cycle was observed. Following 48 h of treatment, the majority of the MCF-7 cells died and disappeared, and were thus no longer suitable for cell cycle analysis.

Induction of Apoptosis Correlates to Increased Levels of p53, p21^{waf1} and Decreased Levels of bcl-2

It has been long established that p53 increases the level of $p21^{waf1}$ (1) which induces cell arrest in the G1 phase of the cell cycle. However, it has also been reported that p53-induced increase of p21^{waf1} is only associated with the induction of apoptosis, without any change in cell cycle distribution (13). Consistent with these later data, we did not observe any change in cell cycle progression when MCF-7 cells were treated with 25% of NBEC-CM for 24 h in the absence of serum (Fig. 4). On the contrary, the p53 and p21^{waf1} levels increased as early as 2 h after treatment and the increased levels persisted over 24 h of treatment when compared to untreated cells (Fig. 5). The bcl-2 family is known to play a major role in the regulation of apoptosis: increased expression of bcl-2 can protect cells from apoptosis, while increased expression of bax can induce apoptosis (14, 15). We observed that the level of bcl-2 in untreated cells was initially high, but decreased with time in serum-free medium (Fig. 5). However, only 5-7% of apoptotic cells were detected after 24 h of serum-free culture (Fig. 3). After more prolonged serum-free culture, all the cells died. The downregulated bcl-2 in untreated cells may therefore reflect an early apoptotic event in serum-free culture. When cells were treated with NBEC-CM, bcl-2 protein decreased rapidly (30 min after addition of NBEC-CM) and markedly when compared to untreated cells (Fig. 5). In contrast, the levels of bax were not affected by the presence or absence of NBEC-CM (Fig. 5). Therefore, the ratio of bcl-2/bax is decreased in NBEC-CM treated cells, favoring the formation of bax/bax apoptosis-inducing homodimers.

Induction of Apoptosis Is Mediated by p53

Since MCF-7 cells express wild-type p53, and the induction of apoptosis by NBEC is correlated to increased p53 levels, we next determined whether NBEC-induced apoptosis was controlled by p53. MCF-7 cells were cotransfected with GFP cDNA and one of two p53 cDNA constructs: either antisense or a temperature-sensitive mutant. Cells were treated with 25% NBEC-CM for 16 h at 32 or 37°C after transfection. As shown in Table 1, antisense p53 abolished apoptotic induction by NBEC at both 32 and 37°C when compared to the control vector; consistent with these data, the temperature sensitive p53 mutant, which acts as a trans-dominant negative at the non permissive temperature (37°C), also abolished apoptotic induction by NBEC. These results indicate that the induction of apoptosis by NBEC is mediated through p53. However, this latter mutant, which acts as a wildtype p53 at the permissive temperature (32°C), had no



FIG. 5. Western blot analysis of p53, p21^{wan}, bcl-2, and bax in the MCF-7 cells. Pre-confluent MCF-7 cells were cultured in serum-free medium with or without 25% NBEC-CM for different periods of time. At the end of treatments, cells were lysed and Western blots were performed. Each experiment was repeated three times and equal protein charges were verified by Coomassie blue coloration or by Western blotting of β -actin.

effect on apoptosis induction by NBEC when compared to the control vector. This indicates that the endogenous p53 was sufficient to mediate the induction of apoptosis by NBEC.

In conclusion, our results demonstrate that NBEC inhibit growth of MCF-7 breast cancer cells by inducing apoptosis without any change in cell cycle progression. The induction of apoptosis is mediated by endogenous p53. These *in vitro* observations appear to explain the more efficient control of breast cancer at early stages of development. The mechanisms by which p53 induces apoptosis have been intensively dissected and multiple pathways have been identified (16). For

TABLE 1Effect of p53 Constructs on NBEC Induced Apoptosis

in the MCF-7 Cells

	32°C	37°C
Empty vector Antisense <i>p53</i> Temperature-sensitive <i>p53</i>	$\begin{array}{c} 2.7 \pm 0.3 \\ 1.0 \pm 0.2 \\ 2.6 \pm 0.3 \end{array}$	$2.5 \pm 0.3 \\ 1.0 \pm 0.3 \\ 1.0 \pm 0.4$

Note. MCF-7 cells were transiently cotransfected with a pL15TK plasmid containing antisense and temperature-sensitive p53 cDNA and a pEGFp-C1 plasmid containing GFP cDNA (Clontech) as described under Materials and Methods. Transfected cells were treated with 25% NBEC-CM for 16 h at 32 or 37°C, and then processed for apoptosis determination. Results are expressed as the ratio of percentage of apoptosis in NBEC-CM-treated cells to the percentage of apoptosis in untreated cells and are the mean value of a triplicate assay which is representative of three independent experiments.

example, p53 can induce apoptosis by regulating the expression of numerous apoptotic regulatory genes such as $p21^{waf1}$ (13), bcl-2 (3) and bax (4). Whether $p21^{waf1}$ and bcl-2 are under control of p53 and whether p21^{waf1} and bcl-2 are directly involved in the NBECinduced apoptosis of MCF-7 cells are not known. Transfection experiments with $p21^{wafl}$ and bcl-2 are currently being performed to demonstrate such a causal effect. The mechanisms of the apoptosisinducing effect of NBEC on breast cancer cells, from the standpoint of both effector molecules and signal transduction, hold promise for the understanding of the natural paracrine tumor suppression as well as for cancer prevention. Identification of apoptosis-inducing factor(s) is also presently being performed in the laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Nord) and the French Ministry of Education. We are grateful to Mrs. Isabelle Pollet for her excellent technical assistance. We thank Dr. Victor Nurcombe (University of Queensland, Australia) for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- 1. Bates, S., and Vousden, K. H. (1994) Curr. Opin. Genet. Dev. 6, 1–7.
- Leach, S. Scatena, C., Keefer, C., Goodman, H., Song, S., Yang, L., and Pietenpol, J. A. (1998) *Cancer Res.* 58, 3231– 3236.

- 3. Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S., and Croce, C. (1994) Cancer Res. 54, 2095-2097.
- 4. Miyashita, T., and Reed, J. (1995) Cell 80, 293-299.
- 5. Wolman, S. R., Heppner, G. H., and Wolman, E. (1997) FASEB J. 11, 535–543.
- Sternlicht, M. D., Kedeshian, P., Shao, Z. M., Safarians, S., and Barsky, S. H. (1997) *Clin. Cancer Res.* 3, 1949–1958.
- Dong-Le Bourhis, X. F., Berthois, Y., Millot, G., Degeorges, A., Sylvi, M., Martin, P. M., and Calvo, F. (1997) Int. J. Cancer 71, 42-48.
- Shao, Z. M., Nguyen, M., Alpaugh, M. L., O'Connell, J. T., and Barsky, S. H. (1998) Exp. Cell Res. 241, 394-403.
- 9. Carpenter, P. M., and Nguyen, H. P. (1998) Anticancer Res. 18, 1063-1068.

- Quarrie, H. H., Pitts, J. D., and Finbow, M. E. (1999) Cell Prolif. 32, 551-561.
- 11. Rosfjord, E. C., and Dickson, R. B. (1999) J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4, 229-237.
- Iotsova, V., and Stehelin, D. (1995) Eur. J. Cell Biol. 68, 122– 132.
- 13. Sheikh, M. S., Garcia, M., Zhan, Q., Liu, Y., and Fornace, A. J. (1996) Cell Growth Differ. 7, 1599-1607.
- 14. Adams, J. M., and Cory, C. (1998) Science 281, 1322-1326.
- Salomons, G. S., Brady, H. J., Verwijs-Janssen, M., Van Den Berg, J. D., Hart, A. A., Van Den Berg, H., Behrendt, H., Hahlen, K., and Smets, L. A. (1997) Int. J. Cancer 71, 959-965.
- 16. Sionov, R. V., and Haupt, Y. (1999) Oncogene 18, 6145-6157.

"Normal breast epithelial cells induce p53-dependent apoptosis and p53-independent

cell cycle arrest of breast cancer cells"

Cet article est soumis à publication dans la revue : "Breast Cancer Research and Treatment".

Normal breast epithelial cells induce P53-dependent apoptosis and p53independent cell cycle arrest of breast cancer cells

Robert-Alain Toillon¹, Valérie Chopin¹, Nathalie Jouy², William Fauquette, Bénoni Boilly¹, Xuefen Le Bourhis¹

¹Laboratoire de Biologie du Développement, Equipe facteurs de croissance (UPRES 1033), Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

²Institut Fédératif de Recherche 22: « Biologie et Pathologie des Régulations Cellulaires », Institut de Recherche sur le Cancer de Lille, 59045 Lille Cedex, France.

Running title : Apoptosis induction of breast cancer cells by normal breast epithelial cells

Correspondence: X Le Bourhis. Tel : (33) 03 20 43 45 81. Fax : (33) 3 20 43 40 38. Email : Xuefen.Lebourhis@univ-lille1.fr

Cancer development depends not only on the nature of cancerous cells themselves, but also on the regulatory effects of various normal cells. The present study was performed to investigate the effect of normal breast epithelial cells (NBEC) on the growth of breast cancer cells under various conditions. We demonstrated that NBEC- conditioned medium (NBEC-CM) inhibited growth of breast cancer cell lines in monolayer culture and three-dimensional collagen gel culture, as well as in soft agar. In MCF-7 and T47-D cells which have a functional P53, NBEC-CM induced apoptosis without modifying cell cycle progression. In MDA-MB-231 and BT-20 cells that have a non-functional P53, NBEC-CM did not induce apoptosis, although a slight G1 blocage was observed in MDA-MB-231 cells. Transient transfections of MCF-7 and T47-D cells demonstrated that NBECtriggered apoptosis was mediated by endogenous P53. Moreover, pifithrin- α , which specifically inhibits the transcriptional activity of P53, completely abolished NBECinduced apoptosis in both MCF-7 and T47-D cells, indicating that P53 mediated apoptosis via its transcriptional activity. Finally, orthovanadate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor, completely inhibited NBEC-triggered apoptosis, indicating that NBEC-triggered apoptosis was regulated by tyrosine phosphatases.

Key words: breast cancer; cell growth; apoptosis; normal breast epithelial cells; p53; tyrosine phosphatases.

INTRODUCTION

It has become clear that cancer development is controlled by important paracrine regulation in the host microenvironment. This host regulation may be as great a determinant of a tumor cell's behavior in vivo as the specific oncogenic or tumor suppressor alterations occurring within the malignant cell itself [1]. Breast cancer is one of the most common cancers in women. However, this pathology progresses slowly, since it has been estimated that the development of a tumor of 2 cm from one tumor cell requires 6-8 years. On the other hand, improved knowledge of mammary gland development, especially during post-lactational involution, suggests that paracrine factors controlling mammary tissue homeostasis may be useful for breast cancer prevention and treatment [2,3]. We have studied normal breast epithelial cells (NBEC) from this perspective and observed that these cells exert a considerable growth-inhibitory effect on breast cancer cells. Moreover, this growth-inhibitory effect is specific to mammary tumor tissue as the growth of cells from normal breast as well as other tissues are not inhibited by NBEC-conditioned medium (NBEC-CM) [4].

The most prominent characteristic of tumors is the rapid increase in the number of cells, resulting from an imbalance between cell proliferation and apoptosis. These two processes are regulated by the tumor suppressor oncogene p53. The p53-dependent G1 arrest is mediated by direct transactivation of $p21^{WAF1}$ which in turn encodes the inhibitor of cyclin-dependent kinases [5]. How p53 triggers apoptosis has not yet been completely elucidated, but it seems to involve both transcription-dependent and -independent mechanisms [6,7]. It has been reported that 15 to 60% of breast tumors contain p53 mutations [8,9]. This mutation is related to evolved and aggressive cancers [10]. Understanding how p53 triggers apoptosis is therefore central to understanding how these tumors develop.

Apoptosis is a morphologically and biologically distinct form of cell death, characterized by nuclear and cytoplasmic condensation and DNA fragmentation. The

execution phase of apoptosis generally involves the activation of caspases, which are responsible for proteolytic degradation of specific cellular substrates. In addition to proteolytic cascade, the apoptotic signal transduction process uses phosphorylation and dephosphorylation pathways. Phosphatidylinositol-3 kinase protects cells from apoptosis by activating the serine-threonine kinase, Akt [11], which, in turn, phosphorylates Bad protein. The phosphorylated Bad is then sequestered in the cytosol by 14-3-3 protein, precluding its inhibition of Bcl-x_L [12,13]. Bcl-2 may also be activated by phosphorylation of Ser⁷⁰ or inactivated by phosphorylation of other sites by JNK [14]. JNK can potentiate the ability of P53 to induce apoptosis by phosphorylating it. The phosphorylated P53 does not associate with MDM2, leading to increased P53 transcriptional activity [15]. The role of the tyrosine phosphorylation. Both receptor and cytoplasmic tyrosine phosphatases have been reported to be involved in the regulation of apoptosis [16-19], but the functional impact of these associated phosphatases on Fasmediated apoptosis is not clear [20].

In this study, we investigated the ability of NBEC to inhibit growth and induce apoptosis in human breast cancer cell lines with different p53 statuses. We also attempted to elucidate the contribution of different pathways in the induction of apoptosis. Our results indicate that for breast cancer cells, which have a non functional P53, NBEC inhibited cell growth without inducing apoptosis. On the contrary, NBEC inhibited growth of wild-type p53-expressing breast cancer cells by inducing apoptosis. The induction of apoptosis is controlled by both P53 and protein tyrosine phosphatases.

MATERIALS AND METHODS

Materials. All cell culture reagents were obtained from BioWhittaker (France) except insulin, obtained from Organon (France). EGF, type XI collagenase, Hoechst

33258, sheep anti-mouse IgG monoclonal antibody FITC-conjugated, trypan blue, and electrophoresis reagents were from Sigma (USA). Mouse anti-P53 antibody was obtained from TEBU (France). Mouse anti-P21^{WAF1} antibody was purchased from France Biochem (France). Annexin V and *in situ* cell death detection kits were provided by Roche Diagnostics (Germany). ECL reagents were obtained from Amersham Life Science (France). pEGFp-C1 plasmid containing Green Fluorescent Protein (GFP) cDNA was from Clontech and lipofectin reagent from Life Technologies (France). pCDNA3-p21^{WAF1} was a generous gift from Pr. Ducommun (CNRS UPR 9062, FRANCE) and pcDNA3-antisense p21^{WAF1} was from Dr. Smith (Mayo Foundation, Rochester, USA). The different p53 constructs were as previously described [21].

Cell Culture. Normal breast epithelial cell (NBEC) and fibroblast cultures were established as described previously [4] from mammoplasty material (20-40 year-old women) obtained from the Department of Plastic Surgery (Prof. Pellerin) at the Medical University of Lille (France). NBEC were cultured in DME/F12 (1/1) medium containing 5% fetal calf serum (FCS), 10 UI/ml insulin, 5 μ M cortisol, 2 ng/ml EGF, 100 ng/ml cholera toxin, 100 UI/ml streptomycin, and 100 μ g/ml penicillin (B1 medium). Normal fibroblasts were cultured in B1 medium without cholera toxin. The epithelial and fibroblastic phenotypes of cells were controlled as described previously [4]. Breast cancer cell lines MCF-7, T47-D, BT-20, MDA-MB-231 were obtained from the American Type Cell Culture Collection. They were routinely grown in EMEM supplemented with 5% FCS, 5 UI/ml insulin, 100 UI/ml streptomycin, and 100 μ g/ml penicillin.

Preparation of conditioned medium. NBEC and fibroblasts were plated in 75 cm² flasks (NUNC). When they reached confluence, they were washed and incubated in basal DME/F12 medium (without serum, insulin, cortisol, EGF, or cholera toxin). Two hours later, the basal DME/F12 medium was changed and cells were further cultured for 24 h. The medium was then collected and stored at -70°C prior to use.

Cell Growth assays in monolayer culture. Breast cancer cells were plated in triplicate at a density of 40,000 cells/cm² in 35-mm dishes. Cells were allowed to adhere overnight and then washed twice in PBS. The culture medium was replaced with basal EMEM (without serum or insulin) for 2 h, then cells were cultured in basal EMEM in the presence of 50% NBEC-CM. At the end of the treatments, cells were harvested with 0.25% trypsin and counted with an hematocytometer. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion test.

Cell Growth assays in three dimensional culture in type I collagen gel. Collagen gel was prepared as described previously by Fauquette et al [22]. Briefly, 8 volumes of 2 mg/ml collagen solution were mixed with 1 volume of EMEM 10X and 1 volume of 22.2 g/L sodium bicarbonate. A volume of 500 μ l fresh medium containing 2 x 10⁵ breast cancer cells was dispensed in 16 mm wells. After gel formation, 500 μ l of fresh medium containing NBEC-CM were added and changed every other day. The final serum concentration was 3% in the culture medium and the final NBEC-CM dilution was 25%. Cells were cultured for 5 days. At the end of the experiment, collagen gel was digested by 500 units/ml of type XI collagenase and the number of cells was determined by hematocytometer count.

Cell Growth assays in anchorage-independent growth in soft agar. Breast cancer cells were seeded at a density of 5,000 cells/cm². The bottom layer was prepared with EMEM containing 10% FCS and 0.56% Bacto agar. Cells were seeded over the bottom layer in triplicate in EMEM supplemented with 3% FCS containing 0.37% Bacto agar. NBEC-CM was added at a final concentration of 25% and the culture medium was changed every other day. Cells were allowed to grow for 7-10 days before colonies of at least 20 cells were counted.

Cell cycle analysis. Breast cancer cells were treated with 50% NBEC-CM in basal EMEM for 24 h or 48 h. Cells (1×10^6) were trypsinized and fixed in 70% ethanol (30

min, -20°C). Cells were washed with PBS and treated with 0.25 μ g/ml RNAse A (30 mn, 20°C), then incubated with 20 μ g/ml propidium iodide (45 min, 20°C). The cell suspension was filtered and analyzed using a Coulter Epics XL/XL-MCl cytometer.

Determination of apoptotic cells by Hoechst staining. Breast cancer cells were plated at a density of 40,000 cells/cm² in 35-mm dishes, and treated with 50% NBEC-CM in basal EMEM for 24 h. Cells were fixed in cold methanol (-20°C) for 10 min and washed twice with PBS before staining with 1 μ g/ml Hoechst 33258 for 10 min at room temperature in the dark. Cells were then washed with PBS and mounted with coverslips using glycergel. Apoptotic cells exhibiting condensed, fragmented nuclei were counted under an Olympus-BH2 fluorescent microscope. Apoptotic cells were counted in randomly selected fields. A minimum of 500-1000 cells was examined for each case, and the results expressed as the number of apoptotic cells over the total number of cells counted.

Co-culture experiments. Co-culture experiments were performed as follows: 35mm dishes containing 3 round slides were coated with 0.5 mg/ml rat-tail collagen. Breast cancer cells were plated in these dishes at a density of 40,000 cells/cm². In parallel, normal and cancer cells were plated in 35-mm dishes without slides at a density of 20,000 cells/cm². Cells were allowed to adhere overnight and slides were transferred to dishes without slides. They were co-cultured in basal EMEM for 24 h or 48 h. Cells were fixed in ice-cold methanol (-20°C) for 10 min and washed twice with PBS before staining with 1 µg/ml Hoechst 33258 for 10 min at room temperature in the dark. Cells were then washed with PBS and mounted with coverslips using glycergel. Apoptosis was determined as described above.

Western blots. Pre-confluent cell cultures were washed with PBS and 1ysed (30 min at 4°C) in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5 % SDS, 1 mM PMSF, 1 mM orthovanadate, 1 mM Na4P2O7, 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml

leupeptin). The lysate was sonicated, boiled and clarified by centrifugation (10,000 g, 5 min at 4°C). The protein concentration of each sample was determined using a Biorad protein assay Kit. Each sample (20 μ g) was then loaded onto 5% stacking/12 % running SDS polyacrylamide gel. Immunoblots were blocked with 5 % BSA, 0.1 % Tween 20 in Tris-buffered saline overnight at 4°C, then incubated with primary antibody (1: 200 dilution, overnight at 4°C). Detection was performed using a goat anti-mouse secondary antibody (1: 2000 dilution, 1.5 h at room temperature) and an ECL detection system (Amersham).

Transient transfections. Breast cancer cells were transiently co-transfected with a pEGFp-C1 plasmid containing Green Fluorescent Protein (GFP) cDNA (Clontech) and several plasmids of interest. Briefly, 2×10^5 cells were seeded into 35-mm dishes and the following day, cells were transfected with 0.5 µg GFP-plasmid, 0.5 µg plasmid of interest, and 10 µl transfection reagent lipofectine in 1 ml serum-free Opti-MEM (Life Technologies, Inc.). After transfection, cells were treated with 50% NBEC-CM in basal EMEM for 24 h. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and stained with Hoechst for apoptosis detection. A random count of 500 GFP-positive cells was performed for each assay. In all experiments, about 20-30% of cells were transfected as judged by the percentage of GFP-positive cells.

Statistical analysis. Statistical significance was measured by Student's paired t test. P for each data set is shown in the legend.

RESULTS

Effect of NBEC-CM on the growth of breast cancer cells

We previously demonstrated that NBEC-CM inhibited growth of MCF-7 breast cancer cell line in a dose-dependent manner [23]. To test whether the growth inhibitory effect of NBEC-CM is a general phenomenon, we treated different breast cancer cell lines with 50% NBEC-CM under various culture conditions. In monolayer culture, cell growth was inhibited after 24 h of treatment for all the cell lines studied (Fig. 1A), except MDA-MB-231 cells. In gel collagen I culture, inhibition of cell growth was also observed after 5 days of treatment for all the cell lines tested (Fig. 1B). In soft agar culture, colony formation was reduced by NBEC-CM in all the cell lines tested (Fig. 1C). In addition to decreasing the number of colonies (Fig. 1C), NBEC-CM also reduced their size and changed their appearance (Fig. 1D).

Effects of NBEC-CM on the cell cycle of breast cancer cells

MCF-7, T47-D, and MDA-MB-231 cells were analyzed by flow cytometry. BT-20 cells were not used due to technical difficulties. When cells were treated with 50% NBEC-CM for 24 h in basal EMEM, no modification was observed in the cell cycle. Following 48 h treatment, the majority of the MCF-7 and T47-D cells died and disappeared, and were thus no longer suitable for cell cycle analysis. A slight increase was observed in the G1 phase in MDA-MB-231 cells, accompanied by a decrease in the S phase (Table 1). In these conditions, growth of MDA-MB-231 cells was inhibited to 80%, compared to control (data not shown).

Effects of NBEC-CM on the apoptosis induction of breast cancer cells

To determine the potential of NBEC to induce apoptosis in breast cancer cells, cells were cultured in basal EMEM in the presence of 50% NBEC-CM for 24 h. As shown in Fig. 2, NBEC-CM induced apoptosis in MCF-7 and T47-D cells, with a 6-7 fold increase in apoptosis compared to untreated cells. In contrast, MDA-MB-231 and BT-20 cells were resistant to NBEC-CM-induced apoptosis, exhibiting background levels of 5% apoptosis.

Effect of NBEC and fibroblasts on apoptosis induction in breast cancer cells in coculture.

When co-cultured with a ratio of 1 normal cell for 2 cancer cells, NBEC induced about 3-fold apoptosis of MCF-7 cells, but had no effect on the apoptosis of MDA-MB-231 cells (Fig. 3). Neither normal breast fibroblasts (fig.3) nor MRC-5 (not shown) induced apoptosis in breast cancer cells (Fig. 3).

Effect of NBEC-CM on the expression of P53 and P21^{WAF1} in MCF-7 and T47D

Since MCF-7 and T47D cells express functional P53, we then analyzed whether levels of P53 and P21^{WAF1} were modified when these cells were induced into apoptosis by NBEC-CM. As shown in Fig. 4, after 12 h of treatment with 50% NBEC-CM, the levels of both P53 and P21^{WAF1} increased in MCF-7 and T47-D cells.
In order to determine whether NBEC-triggered apoptosis was controlled by P53, we co-transfected MCF-7 and T47-D cells with GFP cDNA and one of two p53 cDNA constructs: wild-type or antisense. Cells were treated with 50% NBEC-CM for 24 h after transfection. As shown in Fig. 5, transfection of these cells with wild-type p53 had no effect on NBEC-triggered apoptosis, compared to the control vector, suggesting that endogenous p53 was sufficient to induce apoptosis. However, antisense p53 abolished apoptotic induction by NBEC in both MCF-7 and T47-D cells, compared to the control vector. To further verify the implication of P53 in NBEC-triggered apoptosis, we treated MCF-7 and T47-D cells with pifithrin- α , which specifically inhibits the transcriptional activity of P53 [24]. As shown in Fig. 6, 20 μ M of pifithrin- α alone had no effect on the basal apoptosis of MCF-7 and T47-D, but it completely abolished NBEC-induced apoptosis in these cells.

Effect of p21^{WAF1} on NBEC-CM-triggered apoptosis

As NBEC-triggered apoptosis is correlated to increased P21^{WAF1} levels in MCF-7 and T47-D (Fig. 4) and $p21^{WAF1}$ is one of the P53-responsive genes, we then determined whether NBEC-triggered apoptosis was also controlled by P21^{WAF1}. MCF-7 and T-47D cells were transiently co-transfected with GFP cDNA and one of two p21 cDNA constructs: wild-type or antisense. Cells were treated with 50% NBEC-CM for 24 h after transfection. As shown in Fig. 7, neither wild-type nor antisense p21^{WAF1} modified NBEC-triggered apoptosis in these cells, compared to the control vector.

Effects of protein phosphorylation on NBEC-trigered apoptosis

MCF-7 and T47-D cells were treated with 50% NBEC-CM in the presence of orthovanadate (1 μ M) and genistein (10 μ M) for 24 h. Orthovanadate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor, completely suppressed NBEC-triggered apoptosis, suggesting that protein tyrosine phophatases may be essential for apoptosis induction (Fig. 8A). Furthermore, the protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, potentiated NBEC-induced apoptosis, confirming that protein dephosphorylation was necessary for NBEC-triggered apoptosis (Fig. 8B).

DISCUSSION

Tumor development depends not only on the nature of the tumor cells themselves but also on the modifying effects of normal host cells. While fibroblasts and endothelial cells are believed to favor tumor development [1], normal myoepithelial cells and epithelial cells have been shown to exert a tumor suppressor effect [4, 23-26]. In previous studies, we demonstrated that normal breast epithelial cells (NBEC) inhibited growth of breast cancer cells in monolayer culture and induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells [4, 23]. In this study, we examined the effects of NBEC on the growth of breast cancer cells in monolayer culture, three-dimensional collagen gel culture, and soft agar culture. Three-dimensional collagen gel culture is closer to the *in vivo* situation than monolayer culture, and anchorage-independent growth in soft agar has been used extensively in clinical and experimental oncology as an *in vitro* indicator of malignancy. We observed that growth of breast cancer cells was inhibited by NBEC conditioned medium (NBEC-CM) under these culture conditions. Similary conditioned media of normal breast fibroblasts and MRC-5 fibroblasts had no effect on breast cancer cell growth, indicating that the growth inhibitory effect was specific to NBEC. However, variations were observed in NBEC-induced growth inhibition, depending on the culture conditions as well as the breast cancer cell lines tested. Indeed, although all cell lines analyzed were similarly growth-inhibited in three-dimensional collagen gel culture and soft agar, the growth of MDA-MB-231 cells in monolayer culture was reduced less by NBEC-CM, compared to other cell lines (Fig.1, 3). MDA-MB-231 cells are a more malignant phenotype in terms of autocrine growth factor production [28] and constitutive activation of signaling pathways for survival factors [29]. Moreover, in MDA-MB-231 and BT-20 cells, which have a mutant, non-functional P53 [30] NBEC inhibited cell growth without inducing apoptosis (Fig. 1-3), indicating that the growth inhibitory effect was not mediated by P53. For MCF-7 and T47-D cells, which have a functional P53 [30], NBEC inhibited cell growth by inducing apoptosis without any change in cell cycle (Fig. 1-3 and Table 1), suggesting that P53 may be involved in NBEC-triggered apoptosis. Indeed, pifithrin- α , which specifically inhibits the transcriptional activity of P53 [24], inhibited NBEC-triggered apoptosis. Moreover, the fact that transfection of MCF-7 and T47-D cells with wild-type p53 did not modify NBEC-triggered apoptosis, whereas antisense p53 inhibited it, demonstrates that a relatively low level of endogenous P53 was sufficient to induce apoptosis. The mechanisms of p53 mediated apoptosis have been intensively dissected and multiple pathways have been identified [6, 7]. For example, P53 is capable of inducing apoptosis by regulating the expression of numerous apoptotic regulatory genes such as bcl-2, bax, Fas and p21^{WAF1} [6, 7]. We observed that NBEC-triggered apoptosis in MCF-7 and T47-D cells was accompanied by increased levels of P53, P21^{WAF1}. However, transient transfection of these cells with wild-type and antisense p21^{WAF1} did not modify NBEC-triggered apoptosis, suggesting that p21^{WAF1} was not involved in this mechanism. We have not examined the expression of all P53responsive genes known to regulate apoptosis. It is certainly possible that these genes may be expressed and may act alone or in concert to regulate NBEC-triggered apoptosis.

On the other hand, phosphorylation of signal transduction proteins is also important in the regulation of apoptosis. Yang et al. [31] reported that apoptosis of endothelial cells following removal of growth factors was associated with dephosphorylation of tyrosine residues at the cell periphery. The dephosphorylation of total cellular protein that accompanies apoptosis can be blocked by orthovanadate [32]. Orthovanadate has also been found to block DNA fragmentation induced by a homologue of etoposide [33], and prevents apoptosis of endothelial cells induced by TNF-alpha [34]. Several protein tyrosine phosphatases have been reported to control apoptosis. FAP-1 is a cytoplasmic phosphatase which inhibits Fas-mediated apoptosis [35-37]. Although the mechanism has not been completely elucidated, it has recently been reported that FAP-1 can dephophorylates $I\kappa B\alpha$ [17, 19]. This raises the possibility that FAP-1 suppresses apoptosis through NF-KB activation. Overexpression of the transmembrane tyrosine phosphatase LAR directly activates the caspase pathway and induces P53-independent apoptosis without any modification in the cell cycle [38]. Recently, Radha et al. reported that non-receptor type protein tyrosine phosphatase, PTP-S2, induces P53-dependent apoptosis, but how this tyrosine phosphatase regulates P53 is not known [18]. In this study, we demonstrated that NBEC-triggered apoptosis was completely inhibited by the tyrosine phosphatase inhibitor, orthovanadate, indicating that tyrosine phosphatase activity is crucial for NBEC-triggered apoptosis. Since FAP-1 inhibits apoptosis, it can be excluded from NBEC-CM induced apoptosis. It will, therefore, be important to identify the phosphatase and determine whether it controls P53 activity.

In conclusion, our results indicate that NBEC inhibited growth of all breast cancer cell lines analyzed. The growth inhibition of breast cancer cells with functional P53 was due to the induction of apoptosis, while more malignant cells with non-functional P53 were only induced into cell cycle arrest. Moreover, NBEC-triggered apoptosis was under

the control of P53 transcriptional activity, and was mediated by protein tyrosine phosphatase.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Nord) and the French Ministry of Education. We are grateful to Mrs Isabelle Pollet for her excellent technical assistance, we also thank the commun service of IFR 22.

REFERENCES

- 1. Wolman, S. R, Heppner, G. H, and Wolman, E. (1997). New directions in breast cancer research. *FASEB J.* 11, 535-543.
- 2. Rosfjord, E. C., and Dickson, R. B. (1999). Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **4**, 229-237.
- Le Bourhis, X., Toillon, R. A., Boilly, B., and Hondermarck, H. (2000). Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 60, 251-258.
- Dong-Le Bourhis, X. F., Berthois, Y., Millot, G., Degeorges, A., Sylvi, M., Martin, P. M., and Calvo, F. (1997). Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in coculture. *Int. J. Cancer* **71**, 42-48.
- 5. Bates, S., and Vousden, K. H. (1996). p53 in signalling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr. Opinion Genet. Dev.* 6, 1-7.
- Sionov, R. V., and Haupt, Y. (1999). The cellular response to p53: the decision between life and death. Oncogene 18, 6145-6157.

- Sheikh, M. S, and Fornace, A. J., Jr (2000). Role of p53 members family members in apoptosis. J. Cell. Physiol. 182, 171-181.
- Bautista, S., and Theillet, C. (1997). p53 mutations in breast cancer: incidence and relations to tumor aggressiveness and evolution of the disease. *Path. Biol.* 45, 882-892.
- Hartman, A., Blaszyk, H., Kovach, J. S., and Sommer, S. S. (1997). The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends Genet.* 13, 27-33.
- 10. Borresen, A. L., Andersen, T. I., Eyfjord, J. E., Cornelis, R. S., Thorlacius, S., Borg, A., Johansson, U., Theillet, C., Scherneck, S., and Hartman, S. (1995). Tp53 mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zinc-binding domains. *Genes Chromosomes Cancer* 14, 71-75.
- Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R., and Greenberg, M. E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665.
- 12. Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- 13. Chang, B. S., Minn, A. J., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., and Thompson, C. B. (1997). Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *EMBO J*. 16, 968-977.
- 14. Ip, Y. T., and Davis, R. J. (1998). Signal transduction by c-jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 205-219.
- 15. Fuchs, S. Y., Adler, A., Pincus, M. R., and Ronai, Z. (1998). Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 10541-10546.

- Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Ratter, F., Dröge, W., and Schmitz, L. (1999).
 Inhibition of tyrosine phosphatases antogonizes CD95-mediated apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 264, 132-139.
- 17. Maekawa, K., Imagawa, N., Naito, A., Harada, S., Yoshie O., Takagi, S. (1999). Association of protein-tyrosine phosphatase PTP-BAS with the transcription-factorinhibitory protin IkappaBalpha through interaction between the PDZ1 domain and ankyrin repeats. *Biochem. J.* **337**, 179-184.
- 18. Radha, V., Sudhakar, C., and Swarup, G. (1999). Induction of p53 dependent apoptosis upon overexpression of a nuclear protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett.*453, 308-312.
- 19. Nakai, Y., Irie, S., and Sato, T.A. (2000). Identification of IkappaBalpha as a substrate of Fas-associated phosphatase-1. *Eur. J. Biochem.* 267, 7170-7175.
- 20. Cuppen, E., Nagata, S., Wieringa, B., and Hendriks, W. (1997). No evidence for involvement of mouse protein-tyrosine phosphatase-BAS-like Fas-associated phosphatase-1 in Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 30215-30220.
- 21. Iotsova, V., and Stehelin, D. (1995). Antisense p53 provokes changes in Hela cell growth and morphology. *Eur. J. Cell Biol.* 68, 122-132.
- 22. Fauquette, W., Dong-Le Bourhis, X., Delannoy-Courdent, A., Boilly, B., and Desbiens, X. (1997). Characterization of morphogenetic and invasive abilities of human mammary epithelial cells: Correlation with variations of urokinase-type plasminogen activator activity and type-1 plasminogen activator inhibitor level. *Biol. Cell* **89**, 29-41.
- 23. Toillon, R. A., Adriaenssens, E., Wouters, D., Lottin, S., Boilly, B., Hondermarck, H., and Le Bourhis, X. (2000). Normal breast epithelial cells induce apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through a p53-mediated pathway. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3, 338-344.

- Komarov, P. G., Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Christov-Tselkov, K., Coon, J. S., Chernov, M. V., and Gudkov, A. V. (1999). A chemical inhibitor of P53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285, 1733-1736.
- 25. Sternlicht, M. D., Kedeshian., P., Shao, Z. M., Safarians, S., and Barsky, S. H. (1997). The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin. Cancer Res.*3, 1949-1958.
- 26. Shao, Z. M., Nguyen, M., Alpaugh, M. L., O'Connell, J. T., and Barsky, S. H (1998). The human myoepithelial cell exerts antiproliferative effects on breast carcinoma cells characterized by p21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. *Exp. Cell Res.* **241**, 394-403.
- 27. Alpaugh, M. S., Lee, M. C., Nguyen, M., Deato, M., Dishakjian, L., and Barsky,
 S. H. (2000). Myoepithelial-specific CD-44 shedding contributes to the anti-invasive antiangiogenic phenotype of myoepithelial cells. *Exp. Cell Res.* 261, 116-23.
- 28. El Yazidi, I., Renaud, F., Laurent, M., Courtois, Y., and Boilly-Marer, Y.(1998).
 Production and oestrogen regulation of FGF1 in normal and cancer breast cells; *Biochim. Biophys. Acta* 1403, 127-140.
- 29. Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D. A., Goulet, R. J., and Sledge, G. W. (1997). Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormono-independent growth. *Mol. Cell Biol.* 17, 3629-3639.
- 30. Sheikh, M. S., Li, X. S., Chen, J. C., Shao, Z. M., Ordonez, J. V., and Fontana, J. A. (1994). Mechanism of regulation of WAF1/Cip 1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. *Oncogene* 9, 3407-3415.
- 31. Yang, C., Chang, J., Gorospe, M., and Passantini, A (1996). Protein tyrosine phosphatase regulation of endothelial cell apoptosis and differentiation. *Cell Growth Differ*. **7**, 161-71.

- 32. Lund-Johansen, F., Frey, T., Ledbetter, J. A., and Thompson, P. A. (1996). Apoptosis in hematopoeietic cells is associated with an extensive decrease in cellular phosphotyrosine content that can be inhibited by the tyrosine phosphatase antagonist pervanadate. *Cytometry* **25**, 182-190.
- 33. Huang, T. S., Shu, C. H., Shih, Y. L., Huang, H. C., Su, Y. C., Chao, Y., Yang W. K., and Whang-Peng J. (1996). Protein tyrosine phosphatase activities are involved in apoptotic cancer cell death induced by GL331, a new homolog of etoposide. *Cancer Lett.* 110, 77-85.
- 34. Ahmad, F., and Goldstein, B. J. (1997). Effect of tumor necrosis factor-alpha on the phosphorylation of tyrosine kinase receptors is associated with dynamic alterations in specific protein-tyrosine phosphatases. J. Cell Biochem. 64, 117-127.
- 35. Saras, J., Engstrom, U., Gonez, L. J., and Heldin, C. H. (1997). Characterization of the interactions between PDZ domains of the protein-tyrosine phosphatase PTPL1 and carboxyl-terminal tail of Fas. J. Biol. Chem. 272, 20979-20981.
- 36.Sato, T., Irie, S., Kitada, S., and Reed, J. C. (1995). FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268, 411-415.
- 37. Ungefroren, H., Voss, M., Jansen, M., Roeder, C., Henne-Bruns, D., Kremer, B., and Kalthoff, H. (1998). Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fasligand yet are resistant to Fas-medaited apoptosis. *Cancer Res.* 58, 1741-1749.
- 38. Weng, L. P., Yuan, J., and Yu, Q. (1998). Overexpression of the transmembrane tyrosine phosphatase LAR activates the caspase pathway and induces apoptosis. *Curr. Biol.* 8, 247-256.

	% of G0/G1		% of S		% of G2/M	
	-	+	-	+	-	+
MCF-7	64.8	60.3	22.7	22.8	12.4	16.8
(24 h)	(52-72)	(59-61)	(17-30)	(21-24)	(7-17)	(16-18)
T47-D	70.8	72.3	14.3	15.8	13	9.6
(24h)	(69-73)	(69-78)	(12-17)	(12-21)	(10-16)	(5-14)
MDA-MB-231	70.2	85	20.7	11.2	9.2	6.4
(48h)	(69-71)	(81-93)	(20-21)	(11-13)	(9-10)	(5-8)

Table 1. Cell cycle distribution of breast cancer cells treated with NBEC-CM.

Breast cancer cells were treated with 50% NBEC-CM in basal EMEM for 24 h or 48 h, then analyzed by flow cytometry, as described in Materials and Methods. Results are mean value (mini-maxi) of a triplicate assay in one experiment, representative of three independent experiments. -, without NBEC-CM; +, 50% NBEC-CM.



Figure 1A: Effect of NBEC-CM on the growth of breast cancer cell lines in monolayer culture. Cells were treated with 50% NBEC-CM as described in Materials and Methods. Monolayer culture was performed in basal EMEM for 24 h. The figure shows the results of a triplicate assay in one experiment, representative of three independent experiments. *, p<0.01.



Figure 1B: Effect of NBEC-CM on the growth of breast cancer cell lines in threedimensional gel collagen. Cells were treated with 50% NBEC-CM as described in Materials and Methods. Three-dimensional gel collagen culture was performed for 5 days. The figure shows the results of a triplicate assay in one experiment, representative of three independent experiments. *, p<0.01.



Figure 1C: Effect of NBEC-CM on the growth of breast cancer cell lines in soft agar. Cells were treated with 50% NBEC-CM as described in Materials and Methods. Soft agar culture was performed for 7-13 days. The figure shows the results of a triplicate assay in one experiment, representative of three independent experiments. *, p<0.01.

MCF-7 colonies in soft agar



Without NBEC-CM

50% NBEC-CM

Figure 1D: Illustration of colony formation in soft agar culture (MCF-7 cells after 10 days of culture).



Figure 2: Effect of NBEC-CM on apoptosis induction. Breast cancer cells were cultured in basal EMEM and treated with 50% NBEC-CM for 24 h. Apoptosis was determined after Hoechst staining. The figure shows the results of a triplicate assay in one experiment, representative of three independent experiments. *, p<0.01.



Figure 3: Effect of NBEC and fibroblasts on apoptosis induction in breast cancer cells in co-culture. Normal and breast cancer cells were co-cultured at a density of 1 normal cell for 2 cancer cells, as described in Materials and Methods. Apoptosis was determined after Hoechst staining. The figure shows the results of a triplicate assay in one experiment, representative of four independent experiments. *, p<0.01.



Figure 4: Western blot analysis of P53, P21^{WAF1}. Pre-confluent MCF-7 and T47-D cells were treated with 50% NBEC-CM in basal EMEM for 12 h. At the end of treatment, cells were lysed and Western blots were performed as described in Materials and Methods. The loading and transfer of equal amounts of protein were confirmed by staining the membranes with Red Ponceau.



Figure 5. Effect of NBEC-CM on apoptosis induction in p53-transfected cells. MCF-7 and T47-D cells were transiently co-transfected with a pL15TK plasmid containing wild-type (wt) or antisense (as) p53 cDNA and a pEGFp-C1 plasmid containing GFP cDNA (Clontech). Transfected cells were treated with 50% NBEC-CM for 24 h, then processed for apoptosis determination as described in Materials and Methods. The figure shows the results of a triplicate assay in one experiment, representative of three independent experiments. *, p<0.01.



Figure 6: Effect of pifithrin- α on NBEC-triggered apoptosis. MCF-7 and T47-D cells were treated with 50% NBEC-CM in the presence or absence of 20 µg/ml pifithrin- α for 24 h. Apoptosis was determined after Hoechst staining. The figure shows the results of a triplicate assay in one experiment, representative of three independent experiments. *, p<0.01.



Figure 7: Effect of P21^{WAF1} on NBEC-CM-triggered apoptosis. MCF-7 and T47-D cells were transiently co-transfected with a pCDNA3 plasmid containing wild-type (wt) or antisense (as) p21^{WAF1} cDNA and a pEGFp-C1 plasmid containing GFP cDNA (Clontech). Transfected cells were treated with 50% NBEC-CM for 24 h, then processed for apoptosis determination as described in Materials and Methods. The figure shows the results of a triplicate assay in one experiment, representative of three independent experiments. *, p<0.01.



Figure 8: Effects of orthovanadate and genistein on NBEC-triggered apoptosis. MCF-7 and T47-D cells were cultured in basal EMEM and treated with 50% NBEC-CM in the presence or absence of 1 μ M orthovanadate (A) and 10 μ M genistein (B) for 24 h. Apoptosis was determined after Hoechst staining. Data shown are representative of 3 separate experiments. Each bar represents the mean +/- SD in a triplicate assay. *, p<0.01.

Nous avons démontré que les lignées MCF-7 et T47-D représentant des stades précoces du développement tumoral sont induites en apoptose par les CEMN. Au contraire, la lignée MDA-MB-231, qui représente un stade plus avancé du développement tumoral, est résistante à l'action apoptogène des CEMN. Nous nous sommes donc intéressés aux événements intracellulaires conduisant à la mort ou à la résistance à l'apoptose induite par les CEMN. Par analyses en Western blots et utilisation d'anticorps neutralisants, nous avons démontré que les CEMN induisent l'apoptose des cellules MCF-7 en augmentant l'expression de Fas membranaire. Dans les MDA-MB-231, l'inhibition de la PI3 kinase ou de NF- κ B par des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques ou par transfections transitoires restaure la sensibilité de ces cellules à l'action apoptogène des CEMN. De plus, nous avons montré que l'activation constitutive de NF- κ B est sous contrôle de la PI3 kinase. Lorsque NF- κ B est inhibé, l'apoptose induite par les CEMN est abolie par un anticorps neutralisant anti-Fas, suggérant que les CEMN induisent l'apoptose des cellules MDA-MB-231 *via* Fas.

L'ensemble de nos résultats montre que les CEMN peuvent induire l'apoptose des lignées cancéreuses de sein *via* l'expression de Fas à la surface cellulaire. Les cellules MDA-MB-231 échappent à ce contrôle par une suractivation de la PI3 kinase et de NF-KB (article 4).

Article 4 :

"Normal breast epithelial cells induce apoptosis of breast cancer cells via Fas/Fas L

pathways"

Cet article est soumis à publication dans la revue "Experimental Cell Research".

Normal Breast Epithelial Cells Induce Apoptosis of Breast Cancer Cells *via* Fas Signalling

Robert-Alain Toillon¹, Simon Descamps¹, Eric Adriaenssens², Jean-Marc Ricort³, David Bernard⁴, Bénoni Boilly¹ and Xuefen Le Bourhis^{1,*}

¹ Laboratoire de Biologie du Développement (UPRES, EA 1033), Equipe Facteurs de Croissance, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.
²Immunopathologie Cellulaire des Maladies Infectieuses, CNRS, UMR 8527, Institut de Biologie de Lille, France.
³Unité INSERM 515, Hôpital Saint-Antoine, 75571 Paris, France.

⁴EP560, Institut de Biologie de Lille, France.

Running title. Normal breast epithelial cells induce apoptosis of breast cancer cells

^{*}To whom requests for reprints should be addressed, at Laboratoire de Biologie du Développement (UPRES, EA 1033), SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France.

Tel : (33) 3 20 43 45 81. Fax : (33) 3 20 43 40 38. E-mail : xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

The abbrevations used are: NBEC, normal breast epithelial cells; NBEC-CM, conditioned medium by normal breast epithelial cells; FCS, foetal calf serum; Ab, antibody; DN, dominant negative; PI3 kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase.

Abstract

Fas/Fas ligand (Fas L) death pathway is an important mediator of apoptosis. Deregulation of Fas pathway is reported to be involved in the immune escape of breast cancer and their resistance to anti-cancer drugs. In this study, we demonstrated that conditioned medium by normal breast epithelial cells (NBEC-CM) induced apoptosis of MCF-7 Fas-sensitive cells, but had no effect on MDA-MB-231 Fas-resistant cells. Inhibition of PI3 kinase or NF- κ B by specific inhibitors or transient transfections restored the sensitivity of MDA-MB-231 cells to NBEC-induced apoptosis. Moreover, the constitutive activation of NF- κ B was controlled by PI3 kinase, since inhibition of PI3 kinase reduced NF- κ B activity. Inducible activation of NF- κ B rendered MCF-7 cells resistant to NBEC-CM-induced apoptosis. In addition, we showed that Fas neutralizing antibody abolished NBEC-triggered apoptosis and that the increase of membrane Fas and Fas L was associated with NBEC-CM induced apoptosis. Taken together, these data show that NBEC induced apoptosis in breast cancer cells *via* Fas signalling. The constitutive activation of PI3 kinase and NF- κ B in advanced MDA-MB-231 breast cancer cells rendered them resistant to NBEC-triggered apoptosis. These *in vitro* findings may be significant in explaining why breast cancer is more efficiently controlled in the early stages of tumor development.

advanced

Key words: breast cancer, apoptosis, Fas/Fas ligand, PI3 kinase, NF-KB.

Introduction

Apoptosis is essential for normal development, differentiation, and tissue homeostasis [1]. Deregulation of apoptosis may result in inappropriate cell survival and promote tumour development [2].

Many initial stimuli controlling apoptosis have been identified and the best characterized is the Fas/TNF receptor family [3, 4]. Fas may be expressed on the surface of many cell types, including breast [5-7]. Activation of Fas by its ligand or a cross-linking antibody results in the oligomerization of its intracellular death domain and the recruitment of FADD (MORT1). Once bound, FADD is able to activate pro-caspases-8 and -10 in a death inducing signalling complex (DISC). In turn, caspases-8 and -10 activate downstream caspases, resulting in apoptotic cell death [8].

It has been recently reported that Fas is implicated in the induction of apoptosis during mammary gland involution [9]. Defects in the Fas/Fas L apoptotic signaling pathway provide a survival advantage to cancer cells and may be implicated in tumorigenesis. Indeed, expression of Fas L by breast cancer cells is associated with the loss of Fas expression, thus eliminating the possibility of self-induced apoptosis. Moreover, Fas L-expressing tumour cells may be capable of avoiding host T cell-mediated immune control by eliminating activated anti-tumour T cells [10, 11]. Significantly, constitutive down-regulation of Fas is involved in drug resistance [12] and associated with a poor prognosis in breast cancer [13].

Resistance to TNF-receptor family-induced apoptosis may also result from an enhancement of survival pathways including NF- κ B and PI3 kinase. NF- κ B is a heterodimer of members of Rel/NF- κ B protein family. In resting cells, NF- κ B is sequestered in the cytoplasmic compartment by complexion with I κ B inhibitory proteins. Upon stimulation, I κ B is degraded and NF- κ B is translocated to the cell nucleus to modulate target genes involved in various physiological processes including prevention of apoptosis [14, 15]. Moreover, constitutive activation of NF- κ B has been shown to be implicated in breast cancer progression but the mechanism has not yet been elucidated [16-18]. PI3 kinase activation leads to the production of phosphorylated PIP3, which acts as second messenger for several targets including serine threonine kinase Akt [19]. Akt prevents apoptosis by inactivating pro-apoptotic mediators such as Bad and caspase 9 and activating the NF- κ B survival pathway [19-21]. In many cancer cells, PI3 kinase is constitutively activated by either mutation [22] or activation of growth factor receptors [23-25], which promotes the survival of cancer cells [26].

However, cancer development depends not only on cancer cells themselves, but also on the regulatory effects of neighboring normal cells such as fibroblasts, endothelial cells, and epithelial cells. This host regulation may be as great a determinant of a tumour cell's behavior *in vivo* as the specific oncogenic or tumour-suppressor alterations occurring within the malignant cell itself [27]. While fibroblasts and endothelial cells are believed to favor tumour development [27], normal breast myoepithelial cells and epithelial cells have been shown to exert an inhibitory effect on breast cancer cells [28-32]. In addition, improved knowledge of mammary gland development, especially during post-lactational involution, suggests that paracrine factors controlling mammary tissue homeostasis may be useful in breast cancer prevention and treatment [33]. In previous studies, we demonstrated that normal breast epithelial cells (NBEC) inhibited the growth of breast cancer cells, especially hormone-sensitive cells such as MCF-7 and ZR-75 [29]. Moreover, the growth inhibition of MCF-7 cells is due to an induction of apoptosis [34].

In this study, we determined the mechanism by which NBEC induce apoptosis in breast cancer cells. We also attempted to elucidate why more developed breast cancer cells are resistant to NBEC-induced apoptosis.

Materials and Methods

Chemicals. All cell culture reagents were obtained from BioWhittaker (France) except insulin, which was obtained from Organon (France). Hoechst 33258 and electrophoresis reagents were from Sigma (USA). Caspase inhibitors, Fas neutralizing and agonist antibodies were from

R&D Systems (UK). Anti-Fas and -Fas L antibodies for Western blots were from Santa Cruz Biotechnology (USA). LY294002, wortmannin and SN-50 were obtained from Biomol Research Laboratories (USA). NF-κB luciferase expression vector was purchased from Stratagene (USA). The inducible reporter vector contains the luciferase reporter gene driven by a basic promoter element (TATA box) plus a defined inducible cis-enhancer element constituted from 5 binding sites for NF-κB repeats. The dominant negative IκB (α) expression vector (pCDNA3) containing a Ser to Ala substitution at residues 32 and 36 (IκBm) was obtained from Dr. Jean Feuillard (Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Avicenne, Bobigny, France). The irreversible binding of IκBm to NF-κB inhibits NF-κB activation. The dominant negative pSR(α)- Δ p85 vector was a gift from Dr. Kasuga [35]; in this vector, 35 amino acids were deleted in p85 protein and replaced by Ser-Arg; this mutant is unable to interact with p110. The dominant negative pCMV-p110 Δ kin was a gift from Dr. Williams [36]; this vector encodes a chimera that contains the iSH2 domain of p85 fused to the NH2 terminus of p110 by means of a flexible glycine-linker; in addition, the ATP binding site is mutated. The pCMV expression vector containing p65 rel-A NF-κB subunit was a generous gift from Dr. Crepieux (Mc Gill University, Montréal, Canada).

Cell culture. Normal breast epithelial cell (NBEC) cultures were established as described previously [29] from mammoplasty material (18-30 year-old women) obtained from the department of Plastic Surgery (Pr. Pellerin) at the Medical University of Lille (France). Cells were cultured in DMEM/F12 (1/1) medium containing 5% fetal calf serum (FCS), 10 μ g/ml insulin, 5 μ g cortisol, 2 ng/ml EGF, 100 ng/ml cholera toxin, 100 UI/ml streptomycin, 100 μ g/ml penicillin and 45 μ g/ml gentamicin (B1 medium). When cells approached confluence, they were placed in the same medium except that the calcium concentration was reduced to 20 μ M. In this low-calcium medium, released floating daughter cells were collected and replated in B1 medium prior to experiments. The epithelial phenotype of cells was controlled as described previously [29]. Breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 were routinely grown in EMEM medium supplemented with 10% FCS, 5 μ g/ml insulin, 100 UI/ml streptomycin, 100 μ g/ml penicillin and 45 μ g/ml gentamicin. For experiments, cells were cultured in basal DME/F12 medium.

Preparation of NBEC conditioned medium (NBEC-CM). NBEC were plated in 75 cm² flasks (NUNC). When they reached confluence, they were washed and incubated in basal DME/F12 medium (without serum, insulin, cortisol, EGF, or cholera toxin). Two hours later, the basal DME/F12 medium was changed and cells were further cultured for 24 h. The medium was then collected and stored at -70°C prior to use.

Determination of apoptotic cells. Breast cancer cells were seeded in 35-mm dishes (NUNC). After treatment, cells were fixed in ice-cold methanol for 10 min and washed twice with PBS before staining with 1 μ g/ml Hoechst 33258 for 30 min at room temperature in the dark. Cells were then washed with PBS and mounted with coverslips using glycergel (Dako, France). Apoptotic cells exhibiting condensed and fragmented nuclei were counted under an Olympus-BH2 fluorescent microscope. A minimum of 500-1000 cells in randomly selected fields was examined, and the results expressed as the number of apoptotic cells over the total number of cells counted.

Subcellular fractionation. Pre-confluent cells were washed twice with PBS and collected in 1 ml of extraction buffer (50 mM HEPES pH 7.0, 50 mM KCl, 5mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF). Cells were lysed by 5 cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing at 37°C. The crude lysate was centrifuged (100, 000 g, 1 h at 4°C) and the resulting supernatant was separated from the pellet. The pellet (membrane and organelles) was resuspended in 1 ml of extraction buffer and the supernatant (cytosol) was concentrated through a 3 kDa molecular weight cut-off amicon membrane.

Western blots. Pre-confluent cell cultures were washed with PBS and lysed for 30 min at 4°C in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 1 mM orthovanadate, 1 mM Na₄P₂O₇, 10 μ g/ml aprotinin, and 10 μ g/ml leupeptin). The lysate was sonicated, boiled, and clarified by centrifugation (13, 000 g, 5 min at 4°C). The protein concentration of each sample was determined using a Biorad protein assay kit. Each sample (25 μ g) was then loaded onto 5% stacking/12% running SDS polyacrylamide gel. Immunoblots were incubated with primary antibody (1: 1000 dilution, overnight at 4°C). Detection was performed

using a goat anti-mouse secondary antibody (1: 2000 dilution, 1.5 h at room temperature) and an ECL detection system (Amersham).

Transient transfections. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were transiently co-transfected with a pEGFp-C1 plasmid containing Green Fluorescent Protein (GFP) cDNA (Clontech) and different plasmids of interest. Briefly, 2 x 10^5 cells were seeded into 35-mm dishes and the following day, cells were transfected with 0.5 µg GFP-plasmid, 0.5 µg plasmid of interest and 10 µl transfection reagent (lipofectamine for MDA-MB-231 cells, and lipofectine for MCF-7 cells) in 1 ml Opti-MEM (Life Technologies, Inc.). After 6 h, cells were cultured for a further 18 h in FCS-containing medium and treated with NBEC-CM in basal DMEM/F12 medium for an additional 24 h. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and stained with Hoechst for apoptosis detection. A random count of 500 GFP-positive cells was performed for each assay.

NF- κ B luciferase activity assay. Cells were transiently cotransfected with 0.1 µg of reporter plasmid and 0.5 µg plasmid of interest as described above. After transfection and treatment with NBEC-CM, cells were lysed in 100 µl of reporter lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA). Prior to luciferase activity assays, total proteins were determined by Biorad assay. Luciferase activity was measured according to the manufacturers (Promega, Madison, WI, USA) by a lumat LB 9501 (Berthold).

Statistical Analysis. Statistical significance was measured by student's paired t test. P for each data set is shown in the legend.

Results

NBEC induce apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 cells. To determine the potential of NBEC to induce apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, cells were cultured in basal DMEM/F12 medium in the presence of different dilutions of NBEC-conditioned medium (NBEC-CM). As shown in Fig. 1, NBEC-CM induced apoptosis in MCF-7 cells in a dose-dependent manner, with a significant increase of apoptosis at 2.5% dilution

of NBEC-CM and a 4.5-fold increase of apoptosis at 50% dilution of NBEC-CM. In contrast, MDA-MB-231 cells were resistant to NBEC-CM-induced apoptosis, exhibiting background levels of 5% apoptosis (data not shown).

NF-KB renders breast cancer cells resistant to NBEC-induced apoptosis. NF-KB exerts its survival function by activating several anti-apoptotic target genes such as IAPs and Bcl-2 family [37]. NF-KB has been previously reported to be constitutively activated in MDA-MB-231 cells [16]. To test whether constitutive NF-KB activity in MDA-MB-231 cells could confer resistance to NBEC-induced apoptosis, cells were treated with the NF-KB cell permeable inhibitor SN-50 to reduce NF-κB constitutive activity. The efficiency of SN-50 as an inhibitor of NF-κB was confirmed by electrophoretic mobility shift assay, since 50 µg/ml SN-50 reduced DNA binding of NF-KB by 50% (data not shown). As shown in Fig. 2A, SN-50 alone had no effect on the basal apoptosis of MDA-MB-231 cells, but it could render these cells sensitive to NBECinduced apoptosis, with a 4-fold increase of apoptosis after 24 h of culture. Similarly, transient transfection with IkBm had no effect on the basal apoptosis of MDA-MB-231 cells, but restored the sensitivity of MDA-MB-231 cells to NBEC-induced apoptosis. A 2-fold increase of apoptosis was observed when IkBm transfected MDA-MB-231 cells were treated with NBEC-CM for 24 h (Fig. 2B). The efficiency of IkBm was confirmed by NF-kB reporter gene assay, since IkBm reduced NF-kB luciferase activity by 90%, compared to control vector (Fig. 2C). Interestingly, when MCF-7 cells were treated with NF-KB inhibitor SN-50 alone, no modification was observed in NBEC-induced apoptosis (Fig. 3A), suggesting that these cells possess little constitutive NF- κ B activity. These results are in agreement with the data of Nakashatri et al. [16]. However, transient transfection with p65 rel-A subunit of NF-kB abolished NBEC-CM-triggered apoptosis when compared to NBEC-CM-untreated cells (Fig. 3B), indicating that inducible NF-kB activation in the MCF-7 cells could render them insensitive to NBEC-induced apoptosis.

Taken together, these results indicate that constitutive (Fig. 2) or inducible (Fig. 3B) NF- κ B activity renders breast cancer cells resistant to NBEC-mediated apoptosis.

MDA-MB-231 cells resistant PI3 kinase renders to **NBEC-induced** apoptosis. To determine the implication of PI3 kinase in the resistance of MDA-MB-231 cells to NBEC-triggered apoptosis, wa attempted to inhibit this kinase by pharmacological inhibitors (wortmannin or LY294002) or by transient transfection of dominant negative subunits of PI3 kinase. The efficiency of wortmannin or LY294002 as inhibitors of PI3 kinase was verified by PI3 kinase activity test as described previously [38, 39]. 100 nM wortmannim or 15 µM LY294002 totally inhibited PI3 kinase activity (data not shown). When MDA-MB-231 cells were treated with the PI3 kinase inhibitors wortmannin or LY294002 alone, no significant modification was observed in basal apoptosis (Fig. 4A). However, co-treatment with PI3 kinase inhibitors and NBEC-CM induced a 5 to 8-fold increase of apoptosis (Fig. 4A). Moreover, transient transfections with dominant negative p85 and p110 subunits of PI3 kinase also restored the sensitivity of MDA-MB-231 cells to NBEC-CM-induced apoptosis. NBEC-CM induced a 3-fold increase of apoptosis in dominant negative PI3 kinase subunit transfected cells when compared to control vector (Fig. 4B).

PI3 kinase controls constitutive NF-κB activity in MDA-MB-231 cells. As PI3 kinase may activate NF-κB by phosphorylating IκB directly or indirectly [19, 20, 40], we first examined whether pharmacological inhibitors of PI3 kinase (wortmannin or LY294002) could reduce NF-κB activity in MDA-MB-231 cells. As shown in Fig. 5A, wortmannin reduced NF-κB activity to 70% of control, and LY294002 to about 50% of control. The impact of PI3 kinase on NF-κB activity was also evaluated by transient transfections with dominant negative PI3 kinase subunits. As shown in Fig. 5B, up to 80% inhibition of NF-κB activity was observed in dominant negative p85 transfected cells and 50% in dominant negative p110 transfected cells. These results indicate that PI3 kinase controls the constitutive NF-κB activity in MDA-MB-231 cells.

NBEC-triggered apoptosis involves Fas signalling. In current models of apoptosis, an initial proapoptotic stress can activate different caspases. In order to determine the transduction pathways involved in NBEC-triggered apoptosis, we treated MCF-7 cells with NBEC-CM in the presence or absence of cell-permeable caspase inhibitors. As shown in Table 1,

inhibitors of caspase-8 and -9 totally reversed the apoptotic effect of NBEC-CM; a 50 % decrease of NBEC-triggered apoptosis was observed for general caspase inhibitors as well as those of caspases-1, -6, -10 and -13. However, inhibitors of caspases-2, -3 and -4 had little or no effect on NBEC-triggered apoptosis.

The involvement of caspase-8 in NBEC-induced apoptosis suggested a possible intervention of Fas/Fas L. To verify this hypothesis, we treated MCF-7 and MDA-MB-231 cells (rendered sensitive to NBEC by the PI3 kinase inhibitor LY294002) with Fas agonist or neutralizing antibodies for 24 h. In the presence of Fas agonist antibody, MCF-7 cells were induced to apoptosis in a dose-dependent manner (data not shown). At 50 ng/ml, 25% of MCF-7 cells were induced to apoptosis, while no induction of apoptosis was observed in MDA-MB-231 cells (Fig. 6A, B). However, a similar induction of apoptosis was observed when both cell lines were treated with NBEC-CM alone or NBEC-CM plus Fas agonist antibody (Fig. 6A, B). Fas neutralizing antibody had no effect on the levels of basal apoptosis of either MCF-7 or MDA-MB-231 cells, but it totally inhibited NBEC-triggered apoptosis in both cell lines (Fig. 6C, D), indicating that the basal apoptosis of breast cancer cells did not involve Fas signalling, while NBEC-triggered apoptosis did.

Modulation of Fas/Fas L levels by NBEC. In an effort to understand how the Fas/Fas L system was involved in NBEC-triggered apoptosis, Fas and Fas L levels were determined by Western-blots. In MCF-7 cells, Fas levels from whole cell extract were not modified, whereas an increase in membrane Fas was observed after 24 h of treatment with NBEC-CM, suggesting a translocation of Fas from the cytosol to the membrane (Fig. 7). Membrane Fas L was increased when cells were treated with NBEC-CM for 24 h (Fig. 7). In MDA-MB-231 cells, Fas levels from whole cell and membrane extracts were not detectable when cells were cultured in the absence or presence of NBEC-CM for 24 h. However, total and membrane Fas became detectable in cells treated with the PI3 kinase inhibitor LY294002 for 24 h (Fig. 7). The levels of both total and membrane Fas in cells treated with LY294002 plus NBEC-CM were further increased compared to that of cells treated with LY294002 alone (Fig. 7). The levels of membrane

Fas L were not modified when cells were treated with NBEC-CM or LY294002 alone, whereas a strong increase in the levels of Fas L was observed for cells treated with LY294002 plus NBEC-CM. Taken together, these data show that NBEC-induced apoptosis was associated with an increase of membrane Fas and Fas L in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

Discussion

Breast cancers often progress from a noninvasive, estrogen-sensitive phenotype to an invasive, estrogen-insensitive phenotype. The MCF-7 cell line is the prototype for hormonesensitive breast cancer cells, representative of early stages in breast cancer development. In this study, we demonstrated that normal breast epithelial cells (NBEC) strongly induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells *via* Fas sigalling, as functional knockout of Fas by Fas neutralizing antibody completely abolished NBEC-induced apoptosis. Fas is a transmembrane protein also known as APO1/CD95. Fas can mediate apoptosis when it is triggered by its natural ligand, Fas L, or cross-linked with anti-Fas agonist antibody. We observed that anti-Fas agonist antibody induced apoptosis in MCF-7 cells in a dose-dependent manner (data not shown). In these Fas-sensitive cells, NBEC increased the levels of membrane Fas and Fas L (Fig. 7). The increase in membrane Fas was due to a translocation from cytosol to the membrane, as Fas levels from total cell extracts were not modified by NBEC-CM. Yu et al. reported that Vitamine E succinate can convert Fas-resistant human breast cancer cells to the Fas-sensitive phenotype by translocating cytosolic Fas to the membrane[41]. Our results suggest that simultaneous increase of membrane Fas and Fas L were necessary to NBEC-induced apoptosis.

Contrary to MCF-7 cells, MDA-MB-231 cells were not induced into apoptosis by NBEC-CM. This cell line is the prototype for hormone-insensitive breast cancer cells, representing late stages in breast cancer development. It is therefore important to understand how these cancer cells become resistant to NBEC-induced apoptosis. We demonstrated that the resistance of MDA-MB-231 breast cancer cells to NBEC-induced apoptosis was caused by constitutive activation of PI3 kinase, as inhibition of PI3 kinase by specific inhibitors and transient transfections restored the sensitivity of MDA-MB-231 cells to NBEC-induced apoptosis. The constitutive activation of PI3 kinase may occur by amplification and/or upregulation of any element in its signalling pathways, including mutations of PI3 kinase itself, Akt and PTEN. PTEN acts as a negative regulator of PI3 kinase/Akt pathways by dephosphorylating PIP3 or Akt [26]. However, no functional mutation of PTEN, PI3 kinase, or Akt was observed in MDA-MB-231 cells [26, 42]. Nevertheless, it has been reported that MDA-MB-231 cells secrete numerous growth factors and interleukines [43-45] which may activate PI3 kinase in an autocrine and /or paracrine [41, 46]. We have shown that inhibition of PI3 kinase activity (by LY294002) increased level of membrane Fas in MDA-MB-231 cells (Fig. 7). However, even in these conditions, MDA-MB-231 cells were not sensitive to anti-Fas agonist antibody (Fig. 6), possibly because the Fas level was still below the threshold for Fas-induced apoptosis. Otherwise, resistance to Fas-mediated apoptosis could have been mediated by other downstream signaling events. For instance, Keane *et al.* have shown that the Fas-resistant cell line. MCF-7, becomes sensitive to Fas-mediated apoptosis upon transfection with the interleukin-1βconverting enzyme, an important protein acting downstream of Fas [5]. Transfection of the MCF-7 cell line with bax- α cDNA increased the sensitivity of these cells to Fas-mediated apoptosis considerably [47]. However, when PI3 kinase was inhibited by LY294002, NBEC-CM further increased the levels of membrane Fas and Fas L (Fig. 7) and induced apoptosis of MDA-MB-231 cells (Fig.3). The induction of apoptosis was abolished by Fas neutralizing antibody (Fig.3). These results indicate that when PI3 kinase was inhibited, NBEC induced apoptosis of MDA-MB-231 cells by increasing the levels of membrane Fas and Fas L.

An other important regulator of cell survival is NF- κ B. Constitutive activation of NF- κ B has been shown to be implicated in breast cancer progression but the mechanism has not yet totally elucidated [16-18]. NF- κ B may be activated by PI3 kinase. PI3 kinase activates an NF- κ B kinase (IKK) complex, the IKK complex phosphorylates I κ B, resulting in degradation of I κ B and translocation of NF- κ B to the nucleus to activate the transcription of target genes [14, 15]. PI3 kinase is also reported to directly phosphorylate I κ B on tyrosine 42 to induce NF- κ B activation

[40]. In accordance with these reports, we demonstrated that in MDA-MB-231 cells, PI3 kinase activated NF- κ B, as inhibition of PI3 kinase by pharmacological inhibitors and transient transfections reduced NF- κ B activity. Moreover, inhibition of NF- κ B alone was sufficient to restore the sensitivity of MDA-MB-231 cells to NBEC-induced apoptosis, since the specific inhibitor SN-50 and transient transfection of I κ Bm restored the sensitivity of MDA-MB-231 cells to NBEC-induced apoptosis. On the other hand, inducible activation of NF- κ B by transient transfection with p65 rel-A subunit of NF- κ B rendered MCF-7 cells resistant to NBEC-CM-induced apoptosis (Fig. 3B). These results together demonstrated that NF- κ B was implicated in the resistance of breast cancer cells to NBEC-induced apoptosis. In agreement with our results, it has been reported that inhibition of NF- κ B by sulfasalazine significantly enhanced TRAIL-induced apoptosis [48] and that inhibition of NF- κ B by I κ B α super-repressor (p6R-I κ B(S32A + S36A)) selectively sensitizes previously insensitive prostate cancer cells to TNF- α [49].

In conclusion, we have demonstrated for the first time that normal breast epithelial cells induced apoptosis in breast cancer cell *via* Fas signalling. Additionally, constitutive activation of PI3 kinase and NF- κ B in advanced MDA-MB-231 breast cancer cells rendered them resistant to NBEC-triggered apoptosis. These *in vitro* findings may be relevant in explaining the more efficient control of breast cancer in the early stages of development. It will, therefore, be important to identify the exact factor(s) produced by normal breast epithelial cells and improve our understanding of the mechanism by which the NBEC-produced factor(s) regulate(s) the Fas signalling pathway.

Acknowledgments

This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité du Nord) and the French ministry of Education.

References
- 1. Vaux, L. V., and Krosmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. Cell, 96: 245-254.
- Wyllie, A. H., Bellamy, C. O. C, Bubb, V. J., Clarke, A. R., Corbet, S., Curtis, L., Harrison, D. J., Hooper, M. L., Toft, N., Webb, S., and Bird, C. C. (1999). Apoptosis and carcinogenesis. *Br. J. Cancer*, 80: 34-37.
- 3. Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death receptor. Science, 267: 1449-1456.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinavasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K-M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, 17: 1675-1687.
- Keane, M. M., Ettenberg, A. E., Lowrey, G. A., Russell, E. K., and Lipkowitz, S. (1996).
 Fas expression and function in normal and malignant breast cell lines. *Cancer Res.*, 56: 4791-4798.
- Weller, M., Malipiero, U., Aguzzi, A., Reed, J. C., and Fontana, A. (1995). Proto-oncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J. Clin. Invest.*, **95**: 2633-2643.
- Takeuchi, T., Sasaki, Y., Ueki, T., Kaziwara, T., Moriyama, N., Kawabe, K., and Kakizoe, T. (1996). Modulation of growth and apoptosis response in PC-3 and LNCAP prostate-cancer cell lines by Fas. *Int. J. Cancer*, 67: 709-714.
- 8. Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J., and Blenis, J. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.*, 8: 1001-1008.
- Song J., Sapi, E., Brown, W., Nilsen, J., Tartaro, K., Kacinski, B. M., Craft, J., Naftolin, F., and Mor, G. (2000). Role of Fas and Fas ligand during mammary gland remodeling. J. *Clin. Invest.*, **106**: 1209-1210.
- Muschen, M., Moers, C., Warskulat, U., Even, J., Niederacaher, D., and Beckmann M. W. (2000). CD95 ligand expression as a mechanism of immune escape in breast cancer. *Immunology*, 99: 69-77.

- 11. Mullauer, L., Mosberger, I., Grusch, M., Rudas, M., and Chott, A. (2000). Fas ligand is expressed in normal breast epithelial cells and is frequently up-regulated in breast cancer. J. Pathol., 190: 20-30.
- 12. Landowski, T. H., Gleason-Guzman, M. C., and Dalton, W. S. (1997). Selection for drug resistance results in resistance to Fas-mediated apoptosis. *Blood*, **89**: 1854-1861.
- 13. Reimer, T., Hernring, C., Koczan, D., Richter, D., Gerber, B., Kabelitz, D., Friese, K., and Thiesen, H-J. (2000). Fas L: Fas ratio-a prognostic factor in breast carcinomas. *Cancer Res.*, 60: 822-828.
- 14. Mercurio, F., and Manning, M. M. (1999). Multiple signals converging on NF-κB. Curr.Opin. Cell Biol., 11: 226-232.
- 15. Barkett, M., and Gilmore, T. D. (1999). Control of apoptosis by rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene*, **18**: 6910-6924.
- 16. Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D. A., Goulet, R. J. Jr., and Sledge, G. W. Jr. (1997). Constitutive activation of NF-κB during progression of breast cancer to hormoneindependent growth. *Mol. Cell Biol.*, **17**: 3629-3639.
- 17. Rayet, B., and Gélinas, C. (1999). Aberrant rel/nfκb genes and activity in human cancer.Oncogene, 18: 6938-6947.
- 18. Cogswell, P.C., Guttridge, D.C., Funkhouser, W.K. and Baldwin A.S. Jr. (2000). Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene*, **19**: 1123-1131.
- 19. Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev., 13: 2905-2927.
- 20. Kane, L. P., Shapiro, D., Stokoe, D., and Weiss, A. (1999). Induction of NF-κB by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.*, **9**: 601-604.

- 21.Burow, M. E., Weldon, C. B., Melnik, L. I., Duong, B. N., Collins-Burow, B. M., Beckman, B. S., and McLachlan, J. A. (2000). PI3-K/AKT regulation of NF-kappaB signaling events in suppression of TNF-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271: 342-345.
- 22. Phillips, W. A., St Clair, F., Munday, A. D., Thomas, R. J., and Mitchell, C. A. (1998).
 Increased levels of phosphatidylinositol 3-kinase activity in colorectal tumors. *Cancer*, 83: 41-47.
- 23. Yao, R., and Cooper, G. M. (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*, **267**: 2003-2006.
- 24. Lan, L., and Wong, N-S. (1999). Phosphatidyl 3-kinase and protein kinase C are required for the inhibition of caspase activity by epidermal growth factor receptor. *FEBS lett.*, **444**: 90-96.
- 25. Liu, W., Li, J., and Roth, R. A. (1999). Heregulin regulation of Akt/Protein kinase B in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**: 897-903.
- 26. Stambolic, V., Mak, T. W., and Woodgett, J. R. (1999). Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis. *Oncogene*, **18**: 6094-6103.
- 27. Wolman, S. R., Heppner, G. H., and Wolman, E. (1997). New directions in breast cancer research. *FASEB J.*, **11**: 535-543.
- 28. Sternlicht, M. D., Kedeshian, P., Shao, Z. M., Safarians, S., and Barsky, S. H. (1997). The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin. Cancer Res.*, **3**: 1949-1958.
- 29. Dong-Le Bourhis, X., Berthois, Y., Millot, G., Degeorges, A., Sylvi, M., Martin, P. M., and Calvo, F. (1997). Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. *Int. J. Cancer*, **71**: 42-48.
- 30. Shao, Z. M., Nguyen, M., Alpaugh, M. L., O'Connell, J. T., and Barsky, S. H. (1998). The human myoepithelial cells exerts antiproliferative effects on breast carcinoma cells characterized by p21^{WAF1/CIP1} induction, G2/M arrest and apoptosis. *Exp. Cell Res.*, **241**: 394-403.

- 31. Carpenter, P. M., and Nguyen, H. P. (1998). Mammary epithelium-induced motility of MCF-7 cells. *Anticancer Res.*, **18**: 1063-1068.
- 32. Quarrie, H. H., Pitts, J. D., and Finbow, M. E. (1999). Interactions between normal mammary epithelial cells and mammary tumor cells in a model system. *Cell Prolif.*, **32**: 551-561.
- 33. Rosfjord, E. C., and Dickson, R. B. (1999). Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells. *J. Mammary Gland Neoplasia*, 4: 229-237.
- 34. Toillon, R-A., Adriaenssens, E., Wouters, D., Lottin, S., Boilly, B., Hondermarck, H., and Le Bourhis, X. (2000). Normal breast epithelial cells induce apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through a p53 mediated pathway. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 3 : 338-344.
- 35.Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, T. R., Hawkins, P. T., Dhand, R., Clark, A. E., Holman, G. D., Waterfield, M. D., and Kasuga, M. (1994). 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not RAS activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7415-7419.
- 36.Hu, Q., Klippel, A., Muslin, A. J., Fantl, W. J., and Williams, L. T. (1995). Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science*, 268: 100-102.
- 37.Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene*,
 18: 6853-6866.
- 38. Heydrick, S.J., Jullien, D., Gautier, N., Van Obberghen, E., Le Marchand-Brustel, Y. (1993).
 Deffect in skeletal muscle phosphatidylinositol-3-kinase in obese insulin-resistant mice. J. Clin. Invest., 91: 1358-1366.
- 39.Giorgetti, S., Ballotti, R., Kowalski-Chauvel, A., Cormont, M., Van Obberghen, E. (1992). Insulin stimulates phosphatidylinositol-3-kinase activity in rat adipocytes. *Eur. J. Biochem.*, 207: 599-606.

- 40. Béraud, C., Henzel, W. J., and Baeuerle, P. A. (1999). Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 429-434.
- 41. Yu, W., Israel, K., Liao, Q. Y., Aldaz, C. M., Sanders, B. G., and Kline, K. (1999). Vitamin E succinate (VES) induces Fas sensitivity in human breast cancer cells: role for Mr 43,000 Fas in VES-triggered apoptosis. *Cancer Res.*, **59**: 953-961.
- 42.Lu, Y., Lin, Y. Z., LaPushin, R., Cuevas, B., Fang, X., Yu, S. X., Davies, M. A., Khan, H., Furui, T., Mao, M., Zinner, R., Hung, M. C., Steck, P., Siminovitch, K., and Mills, G. B. (1999). The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene*, 18: 7034-7045.
- 43. El Yazidi, I., Renaud, F., Laurent, M., Courtois, Y., and Boilly-Marer Y. (1998). Production and oestrogen regulation of FGF1 in normal and cancer breast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1403: 127-140.
- 44. Pederson, L., Winding, B., Foged, N. T., Spelsberg, T. C., and Oursler, M. J. (1999).
 Identification of breast cancer cell line-derived paracrine factors that stimulate osteoclast activity. *Cancer Res.*, 59: 5849-55.
- 45. Bronzert, D. A., Pantazis, P., Antoniades, H. N., Kasid, A., Davidson, N., Dickson, R. B., and Lippman, M. E. (1987). Synthesis and secretion of platelet derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5763-5767.
- 46. Favoni, R. E., and De Cupis, A. (2000). The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: New targets for a novel pharmacological approach. *Pharmacological Rev.*, 52: 179-206.
- 47.Bargou, R. C., Wagener, C., Bommert, K., Mapara, M. Y., Daniel, P. T., Arnold, W., Dietel, M., Guski, H., Feller, A., Royer, H. D., and Dorken, B. (1996). Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *J. Clin. Invest.*, **97**: 2651-2659.

- 48. Goke, R., Goke, A., Goke, B., and Chen, Y. (2000). Regulation of TRAIL-induced apoptosis by transcription factors. *Cell Immunol.*, **201**: 77-82.
- 49. Muenchen, H. J., Lin, D. L., Walsh, M. A., Keller, E. T., and Pienta, K. J. (2000). Tumor necrosis factor -alpha-induced apoptosis in prostate cancer cells through inhibition of nuclear factor-kappaB by an IkappaBalpha « super-repressor ». *Clin. Cancer Res.*, **6**: 1969-1977.

	% of apoptotic nuclei		
inhibitor	Without NBEC-CM	50 % NBEC-CM	
None	8.3 ± 3.3	42.7 ± 0.1	
Z-VAD (General)	9.3 ± 4.4	18.6 ± 5.5	
Z-WEHD (Caspase-1)	12.5 ± 1.1	19.4 ± 4.1	
Z-VDAVD (Caspase-2)	10.2 ± 2	36.7 ± 2.4	
Z-DEVD (Caspase-3)	8.4 ± 2.4	42.3 ± 2	
Z-YVAD (Caspase-4)	11.1 ± 1.2	34.7 ± 2.8	
Z-VEID (Caspase-6)	11.1 ± 0.4	21.6 ± 2.9	
Z-IETD (Caspase-8)	8.2 ± 3.5	11.9 ± 2.9	
Z-LEHD (Caspase-9)	8.7 ± 2.9	13.4 ± 0.5	
Z-AEVD (Caspase-10)	12 ± 1.7	26.7 ± 3.8	
Z-LEED (Caspase-13)	7.5 ± 3.4	22 ± 2	

Table 1. Effect of caspase inhibitors on NBEC-induced apoptosis.

MCF-7 cells were incubated with or without 50% NBEC-CM for 24 h in the presence or absence of 100 μ M of indicated inhibitors of caspases and subjected to apoptosis determination after Hoechst staining. The means ± standard deviation of percentages of apoptotic cells from 2 experiments are shown.



Percent of dilutions of NBEC-CM

Figure 1: NBEC-CM induced apoptosis in MCF-7 cells. MCF-7 cells were cultured in basal DMEM/F12 medium for 24 h in the presence or absence of various dilutions of NBEC-CM. Apoptosis was determined after Hoechst staining. Columns, mean percentage of apoptosis of three independent experiments. Bars, SD, *, p<0.01.



Figure 2: Constitutive activation of NF-κB rendered MDA-MB-231 cells resistant to NBECinduced apoptosis. MDA-MB-231 cells were cultured for 24 h in basal DMEM/F12 medium in the presence or absence of 50% NBEC-CM. A, cells were treated with NF-κB cell permeable inhibitor SN-50 (50 µg/ml). Apoptosis was evaluated after Hoechst staining . Columns, mean percentage of apoptosis of three independent experiments. Bars, SD, * , p<0.01. B, cells were transiently cotransfected with a pEGFp-C1 plasmid containing GFP cDNA and a pCDNA3 plasmid containing dominant negative IκB (α) c DNA (IκBm) or pCDNA3 empty vector (control). Apoptosis was evaluated after Hoechst staining and a random count of 500 GFP-positive cells was performed for each assay. Columns, mean percentage of apoptosis of three independent experiments. Bars, SD, * , p<0.01. C, cells were cotransfected with NF-κB Luciferase expression vector and pCDNA3 plasmid containing dominant negative IκB (α) cDNA (IκBm) or pCDNA3 empty vector (control). Luciferase activity was determined as described in materials and methods. Data are presented as percentage of control. Experiments were performed twice, each with two independent transfections. Bars, SD, * , p<0.01.





7///A 50 % N





B



Figure 3: Inducible activity of NF- κ B rendered MCF-7 cells resistant to NBEC-triggered apoptosis. MCF-7 cells were cultured for 24 h in basal DMEM/F12 medium in the presence or absence of 50% NBEC-CM. A, cells were treated with NF- κ B cell permeable inhibitor SN-50 (50 µg/ml). Apoptosis was evaluated after Hoechst staining. Columns, mean percentage of apoptosis of three independent experiments. Bars, SD, *, p<0.01. B, cells were transiently cotransfected with a pEGFp-C1 plasmid containing GFP cDNA and a pCMV plasmid containing p65 rel-A cDNA or pCMV empty vector (control). Apoptosis was evaluated after Hoechst staining and a random count of 500 GFP-positive cells was performed for each assay. Columns, mean percentage of apoptosis of three independent experiments. Bars, SD, *, p<0.01.



Figure 4: Constitutive activation of PI3 kinase rendered MDA-MB-231 cells resistant to NBEC-induced apoptosis. MDA-MB-231 cells were cultured for 24 h in basal DMEM/F12 medium in the presence or absence of 50% NBEC-CM. A, cells were treated with the PI3 kinase cell permeable inhibitors wortmannin (100 nM) or LY294002 (15 μ M). Apoptosis was evaluated after Hoechst staining. Columns, mean percentage of apoptosis of three independent experiments. Bars, SD, *, p<0.01. B, cells were transiently cotransfected with a pEGFp-C1 plasmid containing GFP cDNA and or a pSR(α) plasmid containing dominant negative p85 cDNA (DN p85) or a pCMV plasmid containing dominant negative p110 cDNA (DN p110). pSR(α) and pCMV empty vectors were used as controls. Apoptosis was evaluated after Hoechst staining and a random count of 500 GFP-positive cells was performed for each assay. Columns, mean percentage of apoptosis of three independent experiments. Bars, SD, *, p<0.01.



Figure 5: PI3 kinase controlled the constitutive NF-kB activity in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were cultured for 24 h in basal DMEM/F12 medium in the presence or absence of 50% NBEC-CM. A, cells were treated with the PI3 kinase cell permeable inhibitors wortmannin (100 nM) or LY294002 (15 μ M). B, cells were cotransfected with NF- κ B Luciferase vector and a pSR(α) plasmid containing dominant negative p85 cDNA (DN p85) or a pCMV plasmid containing dominant negative p110 cDNA (DN p110). pSR(α) and pCMV empty vectors were used as controls. Luciferase activity was determined as described in materials and methods. Data are presented as percentage of control. Experiments were performed twice, each with two independent transfections. Bars, SD, * , p<0.01.



Figure 6: NBEC-triggered apoptosis involved Fas signalling. Breast cancer cells were cultured for 24 h in basal DMEM/F12 medium in the presence or absence of 50% NBEC-CM. A, MCF-7 cells were treated with 50 ng/ml Fas agonist antibody. B, MDA-MB-231 cells were treated with 50 ng/ml Fas agonist antibody plus 15 μ M LY294002. C, MCF-7 cells were treated with 25 ng/ml Fas neutralizing antibody. D, MDA-MB-231 cells were treated with 25 ng/ml Fas neutralizing antibody. D, MDA-MB-231 cells were treated with 25 ng/ml Fas neutralizing antibody. D, MDA-MB-231 cells were treated with 25 ng/ml Fas neutralizing antibody plus 15 μ M LY294002. For each experiment, irrelevant mouse IgG was used as control. Apoptosis was evaluated after Hoechst staining. Columns, mean percentage of apoptosis of three independent experiments. Bars, SD, *, p<0.01.

MCF-7 cells



MDA-MB-231 cells



Figure 7 : NBEC modulated levels of Fas/Fas L in breast cancer cells. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with 50% NBEC-CM in the presence or absence of 15μ M LY294002 for 24 h in serum-free medium. Proteins from membrane preparations (100 µg) or whole-cell extracts (50 µg) were electrophoresed, immunoblotted and analysed by western blots as described in materials and methods. The loading and transfer of equal amounts of protein were confirmed by staining the membranes with red Ponceau.

Partie 2 : Purification et caractérisation des facteurs pro-apoptogènes produits par les CEMN Nous avons montré que les CEMN induisent l'apoptose des cellules cancéreuses de sein en augmentant Fas et Fas L. Afin d'identifier les facteurs pro-apoptogènes produits par les CEMN, nous avons utilisé les stratégies suivantes :

-étude de l'implication des facteurs pro-apoptogènes déjà connus,

-purification et caractérisation des facteurs pro-apoptogènes par chromatographie et spectrométrie de masse.

I- Implication de facteurs pro-apoptogènes connus

L'IFN γ et le TNF α ont été décrits comme étant capables d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses de sein en augmentant Fas et/ou Fas L (Keane *et al*, 1996 ; Naujokat *et al*, 1999). Afin de déterminer si ces deux cytokines sont responsables de l'apoptose induite par les CEMN, nous avons comparé l'apoptose des cellules MCF-7 traitées par l'IFN γ , le TNF α et le MC-CEMN en présence d'anticorps anti-IFN γ ou anti-TNF α neutralisants. L'IFN γ et le TNF α induisent l'apoptose des cellules MCF-7 de façon dose et temps dépendante (résultats non montrés). Après 24 h de traitement, 1 ng/ml d'IFN γ induit 26% d'apoptose et 0,1 ng/ml de TNF α induit 30 % d'apoptose (Fig. 18). L'induction de l'apoptose par l'IFN γ et le TNF α est totalement abolie par l'addition simultanée de 1 mg/ml d'anticorps neutralisant respectif. Par contre, l'ajout simultané de ces anticorps neutralisants ne modifie pas l'apoptose induite par les CEMN. Ces résultats suggèrent que l'IFN γ et le TNF α ne sont pas impliqués dans l'effet pro-apoptogène des CEMN.

Par ailleurs, il a été reporté que les CEMN produisent les IL-6 et -8 et que l'IL-6 est capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses de sein (Chiu *et al*, 1996). Cependant, l'ajout d'anticorps neutralisants anti IL-6 ou IL-8 ne modifie pas l'effet apoptogène des CEMN, suggérant que ces deux interleukines ne sont pas non plus impliquées (Fig. 19).



<u>Figure 18</u> : Effets des anticorps neutralisants anti-IFN γ et anti-TNF α dans l'apoptose induite par le MC-CEMN.

Les cellules MCF-7 sont traitées pendant 24 h avec 50% de MC-CEMN, en présence d'anticorps neutralisant anti-IFN γ (1 mg/ml) et/ou anti-TNF α (1 mg/ml). L'apoptose est estimée après marquage au Hoechst. Les résultats sont issus d'une expérience réalisée en triplicate et représentatifs de 3 expériences indépendantes.



Figure 19 : Effets des anticorps neutralisants anti-II-6 et anti-II-8 dans l'apoptose induite par le MC-CEMN.

Les cellules MCF-7 sont traitées pendant 24 h avec 50% MC-CEMN en présence d'anticorps neutralisants anti-IL-6 (0,15 μ g/ml) ou anti-IL-8 (1 μ g/ml). L'apoptose est estimée après marquage au Hoechst. Les résultats sont issus d'une expérience réalisée en triplicate et représentatifs de 3 expériences indépendantes.

L'IGFBP-3 induit également l'apoptose des cellules cancéreuses de sein (Nickerson *et al*, 1997). Cet effet pro-apoptogène peut être dépendant ou non des IGFs. En effet, l'IGFBP-3 induit l'apoptose en séquestrant les IGFs (Kelley *et al*, 1996) ; d'autre part, l'IGFBP-3 se fixerait à un récepteur encore inconnu pour induire l'apoptose (Oh *et al*, 1993 et 1998). Nous avons recherché la présence des IGFBPs dans les milieux conditionnés par les cellules normales et cancéreuses par Western ligand blot. Ainsi, nous avons montré que les CEMN produisent de l'IGFBP-3 en grande quantité ; alors que les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 produisent respectivement peu ou pas d'IGFBP-3 (Fig. 20). Par ailleurs, les CEMN produisent des IGFBPs-2 et -4 ; les cellules MDA-MB-231 produisent de l'IGFBP-4 et pas d'IGFBP-21.

Malgré la présence en grande quantité de l'IGFBP-3 dans le MC-CEMN, nous ne savons pas si ce facteur est responsable de l'effet pro-apoptogène observé. Par ailleurs, d'autres IGFBPs tel que l'IGFBP-5 induisent l'apoptose lors de l'involution de la glande mammaire (Tonner *et al*, 1997 et 2000). Nos travaux en Western ligand blot ne permettent pas de détecter cet IGFBP.

II- Purification et caractérisation des facteurs pro-apoptogènes produits par les CEMN

II.1- Pré-caractérisation des facteurs pro-apoptogènes

L'activité apoptogène du MC-CEMN a été testée sur des lignées cancéreuses provenant de tissus différents (tableau 3). Le MC-CEMN n'induit l'apoptose que dans les lignées cancéreuses de sein et n'a aucun effet sur les lignées provenant de la prostate, de l'ovaire, de l'endomètre, du cerveau, du foie et du poumon. L'activité pro-apoptogène du MC-CEMN est donc spécifique aux lignées cancéreuses de sein.



Figure 20 : Détection des IGFBPs par Western Ligand Blots.

Les expériences ont été réalisées sur du milieu conditionné de CEMN, de MCF-7 et de MDA-MB-231 cultivées pendant 48 h dans du DME/ HAM F12. Les IGFBPs révélées sont annotées à droite du gel et sont déterminées par comparaison avec les gels effectués dans le laboratoire du Pr. Y. Le Bouc (INSERM U 515, Paris). Les dépots ont été effectués en double pour les milieux conditionnés par les cellules cancéreuses.

<u>Tableau 3</u> : Effet du MC-CEMN sur la croissance, la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses.

Tissu	Lignée	Effet du MC-CEMN		
		Croissance	Prolifération	Apoptose
Sein	MCF-7		=	++
	T47-D		=	++
	MDA-MB-231		-	-
	BT-20		-	-
	MCF-7 ras		ND	+
Prostate	LNCAP		ND	
	DU-145	<u></u>	ND	
	PC3	=	ND	
Cerveau	IGRN91		ND	=
Ovaire	Ov1		ND	
Poumon	Calu-6	ND	ND	=
an dal ar conserva a sucche con descrito a dal anti-	MRC-5		ND	
Endomètre	Hec 1B		ND	=
Foie	HepG3	<u> </u>	ND	
	Hep G2		ND	

La croissance est mesurée par comptage au bleu trypan après 24 ou 48 h de culture en présence de 50% MC-CEMN. La prolifération est mesurée par analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux. L'apoptose est mesurée après marquage au Hoechst 33258. Les résultats sont issus de deux expériences indépendantes.

= : pas d'effets; - : faible diminution (< 25%); -- : diminution (25 à 50 %); forte diminution (>50 %); + : faible induction (<25%); ++: induction (25 à 50 %); ND : non déterminée.



Figure 21 : Effets de la température sur l'activité apoptogène du MC-CEMN.

Les cellules MCF-7 sont traitées pendant 24 h par le MC-CEMN ayant subit un chauffage à 56°C ou 100°C ou une conservation à température ambiante. L'apoptose est déterminée après marquage au Hoechst. Les résultats sont issus d'une expérience réalisée en triplicate.

L'activité apoptogène du MC-CEMN est abolie par chauffage à 56°C (Fig. 21) ou digestion trypsique (Fig. 22). D'autre part, l'activité apoptogène est retenue par filtration sur une membrane de type centricon de 30 kDa de seuil de coupure, elle n'est pas retenue sur une membrane de type centricon de 50 kDa de seuil de coupure (résultats non montrés). Ces résultats montrent que les facteurs pro-apoptogènes sont des protéines (sensibles à la trypsine), thermolabiles et présentent une masse moléculaire apparente de 30 à 50 kDa.

II.2- Purification des facteurs pro-apoptogènes produits par les CEMN

Les différentes étapes de la purification sont résumées dans la figure 23. La concentration sur un système d'ultrafiltration de type ultrassette (Filtron, Pall Gelman Science), ayant un seuil de coupure de 30 kDa, permet de concentrer jusqu'à 1200 fois le MC-CEMN tout en conservant l'activité pro-apoptogène (80 ml final pour 10 litres de milieu). Le milieu conditionné est ensuite passé sur colonnes Sep-Pak C18 et élué à 50%, 80% et 100% d'ACN (Fig. 24). Cette séparation permet d'éviter la saturation des colonnes d'HPLC. Les fractions éluées sur les colonnes Sep-Pak C18 sont alors passées sur une colonne d'HPLC préparative. Les élutions sont réalisées à vitesse constante (2 ml/min), les gradients d'élution sont continus et adaptés à l'hydrophobicité relative des fractions récupérées sur la colonne Sep-Pak C18. Chaque pic est récupéré manuellement et testé pour sa capacité à induire l'apoptose des cellules MCF-7. La figure 25 montre le profil d'une HPLC préparative de la fraction éluée à 50% d'ACN sur Sep-Pak C18. Quatre fractions issues de cette HPLC présentent une activité apoptogène. Les profils obtenus en HPLC préparative pour les fractions éluées à 80% et 100% d'ACN sont similaires (résultats non montrés). La comparaison des profils obtenus en HPLC préparative et leur recoupement nous ont permis de discriminer 2 autres fractions actives. Ainsi, 6 fractions actives ont été isolées par HPLC préparative. Ces fractions ont été ensuite soumises à une HPLC analytique dans des conditions analogues aux HPLC préparatives ou directement passées en gel de polyacrylamide.



Figure 22 : Effet de la trypsine sur l'activité apoptogène du MC-CEMN.

Le MC-CEMN est incubé en présence ou en absence de trypsine (37°C, 1 h), l'action de la trypsine est arrêtée par un inhibiteur issu du soja (37°C, 30 min) et les cellules MCF-7 sont traitées pendant 24 h. L'apoptose est déterminée après marquage au Hoechst. Les résultats sont issus de trois expériences indépendantes, réalisées en duplicate.



<u>Figure 23</u> : Principales étapes de la purification et de la caractérisation des facteurs proapoptogènes produits par les CEMN.



Figure 24 : Activité apoptogène du MC-CEMN après passage sur colonne Sep pak C18. Les cellules MCF-7 sont traitées pendant 24 h par les fractions recueillies après élution par 50%, 80% et 100% d'ACN. L'apoptose est déterminée après marquage au Hoechst. Ce test a été effectué en duplicate.



Figure 25 : Purification des facteurs pro-apoptogènes par HPLC.

Le profil d'HPLC préparative est celui obtenu après passage de la fraction Sep Pak 50%. Les pics présentant une activité apoptogène () sont ensuite passés en HPLC analytique (le profil présenté est celui de la fraction C).



Figure 26 : Facteurs pro-apoptogènes produits par les CEMN.

Les fractions issues d'HPLC sont séparées par SDS-PAGE et colorées à l'argent. Les poids moléculaires (PM) sont reportés à droite du gel.

II.3- Caractérisation des fractions obtenues par HPLC

Les fractions issues des HPLC préparatives et analytiques ont été analysées par SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (Fig. 26). Après coloration à l'argent, l'analyse des gels a révélé que la fraction A est un mélange de plusieurs protéines avec une protéine majeure de 55 kDa environ et 3 bandes mineures de 12,6 ; 15,8 et 25,7 kDa. La fraction B se présente sous forme d'une bande d'environ 110 kDa. La fraction C se présente sous forme d'un doublet autour de 30 kDa (31,7 et 35,5 kDa) et la fraction D est formée d'une seule bande de 46,3 kDa. Les deux autres fractions notées E, F n'ont pas donné de bandes visibles après coloration à l'argent.

Après digestion trypsique des bandes dans les gels, l'analyse en spectrométrie de masse montre que les bandes majeures de la fraction A sont des fragments de la sérum albumine. Les fractions B, C et D n'ont pas donné de spectre spécifique.

II.4- Discussion

La caractérisation préliminaire indique que les facteurs pro-apoptogènes sont des protéines thermolabiles, présentant pour la plupart une masse moléculaire de 30 à 50 kDa. Nous avons discriminé 6 fractions actives issues d'HPLC préparative qui ont donné pour 4 d'entre elles, un profil électrophorétique particulier.

La fraction A est composée de sérum albumine, qui est une protéine porteuse se liant à de nombreuses autres protéines. La possibilité d'une contamination par la sérum albumine du sérum de veau reste la première hypothèse : l'origine bovine ou humaine n'a pu être confirmée, les deux protéines ne diffèrent que d'un seul résidu d'acide aminé. Cependant, l'ajout de sérum albumine bovine n'induit pas l'apoptose des cellules cancéreuses de sein en culture. Au contraire, la sérum albumine aurait un effet stimulateur de la croissance des lignées cancéreuses de sein (Ogasawara et Sirbasku, 1988 ; Singh *et al*, 1992). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer un effet pro-apoptogène de la sérum albumine. En effet, la

sérum albumine pourrait séquestrer les facteurs de survie produits par les cellules cancéreuses de sein tel que des facteurs de croissance. D'autre part, il a été démontré que des changements dans la conformations ou des clivages de protéines dans le milieu extracellulaire peuvent générer des formes pro-apoptogènes. Ainsi, les cellules myoépithéliales de sein produisent des protéases qui transforment le CD44 en une forme soluble tronquée qui entre en compétition avec la forme native du CD44 pour les composants de la matrice extracellulaire ; il en résulte une inhibition de la migration et de la croissance des cellules cancéreuses et des cellules endothéliales (Alpaugh *et al*, 2000 ; Nguyen *et al*, 2000). D'autre part, il a été reporté que l'alpha-lactalbumine produite par les CEMN peut induire l'apoptose des cellules cancéreuses de sein après passage sur colonne d'hydrophibicité de type C-18 (Hakansson *et al*, 1995 et 1999 ; Svensson *et al*, 2000). Il n'est donc pas impossible que des mécanismes similaires soient mis en jeu pour convertir les protéines natives en une forme pro-apoptogène.

Discussion générale

Les CEMN induisent l'apoptose des cellules cancéreuses de sein via Fas.

Dans ce travail, nous avons montré que les CEMN inhibent la croissance des cellules cancéreuses de sein dans différentes conditions de culture. De plus, pour les lignées MCF-7 et T47-D qui sont hormono-sensibles et possèdent une protéine P53 fonctionnelle, l'inhibition de la croissance est due à une induction de l'apoptose.

Song et al (2000) ont démontré que la régression par apoptose des hyperplasies mammaires physiologiques (après la grossesse, l'allaitement) est dépendante du système Fas/Fas L. Lors de cette induction de l'apoptose, les cellules expriment Fas L et l'expression de Fas est augmentée. Ces résultats sont corroborés par les travaux de Ragnarsson et al (2000), indiquant que les CEMN ne produisent pas de Fas L membranaire ou soluble. Nos travaux montrent que les cellules cancéreuses MCF-7 et T47-D expriment Fas fonctionnel, puisqu'un anticorps anti-Fas agoniste induit l'apoptose de ces cellules. L'induction de l'apoptose par le MC-CEMN est abolie par un anticorps neutralisant anti-Fas ; par ailleurs, le MC-CEMN augmente Fas et Fas L membranaires. Ces résultats suggèrent que les CEMN induisent l'apoptose des cellules cancéreuses en augmentant Fas et Fas L. D'autre part, par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de P53 et par des transfections transitoires, nous avons montré que l'induction de l'apoptose est sous le contrôle de P53. En effet, il a été décrit que P53 augmente l'expression et la translocalisation membranaire de Fas dans des cellules endothéliales (Bennett et al, 1998). Il est possible que P53 puisse exercer des régulations similaires pour Fas L. Ainsi, il a été reporté que P53 augmente l'expression des ARNm de Fas L dans les cellules prostatiques (Hara et al, 2000). L'ensemble de ces résultats suggère que P53 régule le système Fas/Fas L dans les cellules cancéreuses.

La PI3 kinase et NF-KB confèrent aux cellules cancéreuses la résistance à l'action apoptogène des CEMN.

Nous avons montré que les CEMN ralentissent la prolifération des cellules MDA-MB-231 et BT-20 sans induire l'apoptose. Ces deux lignées sont hormono-insensibles, elles ne possèdent pas de protéine P53 fonctionnelle et représentent un stade plus avancé du développement tumoral. Par ailleurs, les cellules cancéreuses aux stades plus avancés présentent une capacité de survie accrue, notamment par suractivation de la PI3 kinase et de NF- κ B (Stambolic *et al*, 1999 ; Nakashatri *et al*, 1997). NF- κ B peut être activé par la PI3 kinase : la PI3 kinase phosphoryle directement ou indirectement IKK ; IKK phosphorylée phosphoryle à son tour I κ B, entraînant la libération de NF- κ B et sa translocation dans le noyau. Dans le noyau, NF- κ B régule l'expression de nombreux gènes intervenant dans la survie et l'apoptose (Barkett et Gilmore, 1999).

Nous avons montré que l'inhibition de la PI3 kinase ou de NF- κ B par des inhibiteurs pharmacologiques et des transfections transitoires restaure l'effet apoptogène des CEMN dans les cellules MDA-MB-231. Par la suite, nous avons démontré que NF- κ B est nécessaire et suffisant à la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par les CEMN. En effet, dans les cellules MDA-MB-231, l'inhibition de la PI3 kinase par des inhibiteurs pharmacologiques et des dominants négatifs diminue l'activation de NF- κ B ; l'inhibition de NF- κ B par le SN50 ou un dominant négatif permet l'induction de l'apoptose par les CEMN. Enfin, la surexpression de Rel A par transfection transitoire dans les cellules MCF-7 confère une résistance à l'apoptose induite par les CEMN.

Les cellules MDA-MB-231 ne sont pas induites en apoptose par un anticorps anti-Fas agoniste ; elles expriment beaucoup de Fas L et pas de Fas. Lorsque NF-κB est inhibé, les cellules MDA-MB-231 restent insensibles à l'apoptose induite par l'anticorps agoniste anti-Fas ; Fas est détecté dans le lysat total mais peu ou pas dans la fraction membranaire. Ces

résultats montrent que l'inhibition de NF- κ B n'est pas suffisante pour restaurer la sensibilité des cellules MDA-MB-231 vis-à-vis de Fas. En revanche, en présence de MC-CEMN, lorsque NF- κ B est inhibé, les cellules MDA-MB-231 sont induites en apoptose ; l'expression de Fas membranaire est augmentée et l'apoptose induite par les CEMN est abolie par un anticorps neutralisant anti-Fas.

L'ensemble de nos résultats montre que les CEMN peuvent induire l'apoptose des cellules MDA-MB-231 *via* l'expression de Fas à la surface cellulaire. Les cellules MDA-MB-231 échappent à ce contrôle par une suractivation de la PI3 kinase et de NF-kB.

Quelle est l'incidence des mutations de p53 dans la suractivation de la PI3 kinase et de NF- κ B ?

L'expression d'une protéine P53 fonctionnelle contribue à l'apoptose induite par les CEMN. En revanche, l'absence de P53 fonctionnelle est associée à une suractivation de la PI3 kinase et de NF- κ B. On peut donc s'interroger sur l'incidence des mutations de *p53* dans cette suractivation.

Il a été reporté que P53 diminue l'expression de l'IGF-R1 et augmente la synthèse d'IGFBP-3, ce qui diminue l'activation de la PI3 kinase par les IGFs (Kulik *et al*, 1997). Les mutations de *p53* entraîneraient une augmentation de l'expression de l'IGF-R1 et une diminution de la synthèse d'IGFBP-3, favorisant ainsi la survie exercée par les IGFs *via* l'activation de la PI3 kinase.

Par ailleurs, l'inactivation de p53 entraîne une plus grande instabilité du génome (Miyoshi *et al*, 2000) ; les mutations des voies de survie quant à elles permettent une survie accrue des cellules en inhibant l'apoptose. Les cellules possédant à la fois les mutations de p53 et une suractivation des voies de survie vont donc être sélectionnées. En effet, la suractivation de la PI3 kinase est reportée dans de nombreux cancers (Stambolic *et al*, 1999) ; elle résulte de

mutations de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans la cascade de transduction de cette kinase (Ras, Akt, PTEN...) (Stambolic *et al*, 1999). D'autre part, l'activation constitutive de NF- κ B est observée dans la lignée MDA-MB-231 qui représente un stade plus avancé de cancer du sein (Nakhastri *et al*, 1997).

Enfin, P53 et NF- κ B pourraient entrer en compétition vis-à-vis des sites de fixation sur l'ADN et vis-à-vis de l'ARN polymérase (Wadgaonkar *et al*, 1999). La perte de P53 par mutation entraînerait un déséquilibre dans cette compétition en faveur de NF- κ B, ce qui permettrait une surexpression de gènes de survie. Un des exemples potentiels de ces régulations est *fas*, qui est un gène à la fois sous le contrôle de P53 et de NF- κ B. On peut supposer que NF- κ B se fixe sur le promoteur de *fas* pour diminuer la transactivation alors que P53 entraîne une augmentation de son expression. Toutefois, des études de liaison et de transactivation de NF- κ B et de P53 sur le promoteur de *fas* seraient nécessaires pour valider cette hypothèse.

Quels sont les facteurs pro-apoptogènes produits par les CEMN?

Nous avons montré que les CEMN inhibent spécifiquement la croissance des lignées cancéreuses de sein, puisque la croissance de lignées cancéreuses d'autres tissus (prostate, ovaire, endomètre, cerveau, foie et poumon) n'est pas inhibée. Par l'utilisation d'anticorps neutralisants, nous avons exclu des facteurs apoptogènes déjà connus tels que l'IFN γ , le TNF α , les interleukines-6 et -8. L'action apoptogène ne semble pas non plus impliquer le TGF β qui est résistant à la température. Nous pouvons également exclure le MDGI qui inhibe plus fortement la croissance des CEMN que celle des cellules cancéreuses (Lehmann *et al*, 1989), puisque le MC-CEMN n'inhibe pas la croissance des CEMN. D'autre part, nous avons montré que les CEMN produisent en grande quantité l'IGFBP-3 alors que les cellules cancéreuses en produisent peu ou pas. Cependant, l'implication de l'IGFBP-3 dans l'action

apoptogène des CEMN reste à définir. Toutefois, la caractérisation préliminaire indique que les facteurs pro-apoptogènes sont des protéines thermolabiles, présentant pour la plupart une masse moléculaire de 30 à 50 kDa. Nous avons discriminé six fractions actives issues d'HPLC préparative qui ont donné pour quatre d'entre elles, un profil électrophorétique particulier. L'analyse en spectrométrie de masse d'une quantité suffisante de ces fractions devrait permettre leur identification.

En conclusion, l'ensemble de nos travaux montre que les CEMN induisent l'apoptose des lignées cancéreuses de sein *via* Fas. Cependant, l'action des CEMN est abolie par la suractivation de NF- κ B dans les cellules cancéreuses représentant des stades tardifs du développement tumoral. La caractérisation des facteurs pro-apoptogènes reste encore préliminaire ; toutefois, l'analyse en spectrométrie de masse d'une quantité suffisante des fractions apoptogènes issues d'HPLC devrait permettre leur identification. Une fois identifiés, nous pourrons rechercher leur expression dans les cellules normales et cancéreuses, étudier la régulations de leurs expression et leurs mécanismes d'action *in vitro* et *in vivo*. L'ensemble de ces travaux pourraient aboutir à une utilisation de ces facteurs dans les stratégies thérapeutiques contre le cancer du sein.
Bibliographie

- Adams, J.M., Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science, 281 : 1322-1326.
- Alcami, A., Koszinowski, U.H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Trends* Microbiol., 8: 410-418.
- Alpaugh, M.L., Lee, M.C., Nguyen, M., Deato, M., Dishakjian, L., Barsky, S.H. (2000). Myoepithelial-specific CD44 shedding contributes to the anti-invasive and anti-angiogenic phenotype of myoepithelial cells. *Exp. Cell. Res.*, 261 : 150-158.
- Antonsson, B., Martinou, J.C. (2000a). The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.*, 256
 : 50-57.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., Martinou, J-C. (2000b). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J.*, 345 : 271-278.
- Arends, M.J., Wyllie A.H. (1991). Apoptosis : mechanism and role in pathology. Int Rev. Exp. Pathol., 32 : 223-254.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1999). Death receptors: signalling and modulation. Science, 281 : 1305-1308.
- Bansal, G.S., Cox, H.C., Marsh, S., Gomm, J.J., Yiangou, C., Luqmani, Y.A., Coombes, R.C., Johnston, C.L. (1997). Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, 75: 1567-1574.
- Barkett, M., Gilmore, T.D. (1999). Control of apoptosis by rel/NF-kB transcription factor. Oncogene, 18: 6910-6924.
- Basanez, G., Nechustan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K.A., Hsu, Y., Zimmerberg, J., Youle, R.J. (1999). Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 5492-5497.

- Basanez, G., Zhang, J., Chau, B.N., Maksaev, G.I., Frolov, V., Brandt, T.A., Burch, J., Hardwick, J.M., Zimmerberg, J. (2001). Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-{subL} form cytochrome c-conducting pore in pure lipid bilayers. J. Biol. Chem., sous presse.
- Basu, S., Kolesnick, R. (1998). Stress signals for apoptosis: ceramide and c-jun kinase. Oncogene, 17: 3277-3285.
- Bautista, S., Theillet, C. (1997). P53 mutations in breast cancer: incidence and relations to tumor aggressiveness and evolution of the disease. *Pathol. Biol.*, 10: 882-892.
- Bennett, M., MacDonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R., Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, 282 : 290-293.
- Bernard, D., Quatannens, B., Vandenbunder, B., Abbadie, C. (2001). Rel/NFkappaB transcription factors protect from TRAIL-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1. J. Biol. Chem., sous presse.
- Bissel, M.J., Weaver, V.M., Lelièvre, S.A., Wang, F., Petersen, O.W., Schmeichel, K.L. (1999). Tissue structure, nuclear organisation, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res.*, 59 : 1757s-1764s.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, T.M., Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 85: 803-815.
- Budihardjo, I., Olivier, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15 : 269-290.
- Burkitt, H.G., Young, B., Heath, J.W. (1995). Histologie fonctionnelle. Eds Arnette Blackwell (3^{ième} édition).

- Burns, T.F., El-Deiry, W.S. (1999). The p53 pathways and apoptosis. J. Cell. Physiol., 181: 231-239.
- Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., Cohen, G.M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into a biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complex. J. Biol. Chem., 275 : 6070-6070.
- Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C., Cohen, G.M. (1999). Caspase activation involves the formation of apoptosome, a large (approximately 700-kDa) caspaseactivating complex. J. Biol. Chem., 274 : 22686-22692.
- Charette, S.J., Lavoie, J.N., Lambert, H., Landry, J. (2000). Inhibition of Daxxmediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol. Cell Biol.*, 20: 7602-7612.
- Chinnaiyan, A.M., Tepper, C.G., Seldin, M.F., O'Rourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krummer, P.H., Peter, M.E., Dixit V.M. (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and Tumor Necrosis Factor Receptorinduced apoptosis. J. Biol. Chem., 271: 4961-4965.
- Chiu, J.J., Sgagias, M.K., Cowan, K.H. (1996). Interleukin 6 acts as a paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res.*, 2 : 215-221.
- Choisy-Rossi, C., Reisdorf, P., Yonish-Rouach E. (1998). The p53 tumor suppressor gene: structure, function and mechanism of action. *Apoptosis : biology and mechanisms*, Eds Springer (Berlin).
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A., David, C.N. (1999).
 Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan hydra. *Curr. Biol.*, 9: 959-962.
- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J., 326 :1-16.

- Colomer, R., Aparicio, J., Montero, S., Guzman, C., Larrodera, L., Cortés-Funes,
 H. (1997). Low levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with a poor prognosis in human breast carcinoma. *Br. J. Cancer*, 76 : 1215-1220.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.*, 341 : 233-249.
- De Maria, R., Lenti, L., Malisan, F., d'Agostino, F., Tomassini, B., Zeuner, A, Rippo, M.R., Testi, R. (1997). Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science*, 277 : 1652-1655.
- Deming, S.L., Nass, S.J., Dickson, R.B., Trock, B.J. (2000). C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognosis relevance. *Br. J. Cancer*, 83 :1688-1695.
- Deveraux, Q.L., Leo, E., Stennicke, H.R., Welsh, K., Salvensen, G.S., Reed, J.C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.*, 18 : 5242-5251.
- Deveraux, Q.L., Reed, J.C. (1999). IAP family proteins-suppressors of apoptosis. Genes Dev., 13: 239-252.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.*, 17 : 2215-2223.
- Elenbass, B., Weinberg, R.A. (2001). Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.*, 264 : 169-184.
- Enari, M., Hug, H., Nagata, S. (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fasmediated apoptosis. *Nature*, 375: 78-81.
- Eppenberger, U., Kueng, W., Schlaeppi, J.M., Roesel, J.L., Benz, C., Mueller, H., Matter, A., Zuber, M., Luescher, K., Litschgi, M., Schmitt, M., Foekens, J.A., - 148 -

Eppenberger-Castori, S. (1998). Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, **16** : 3129-3136.

- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., Martinou, J.C. (2000). Bid induces the oligomerization of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.*, 20: 929-935.
- Espie, M., Gorins, A. (1995). Le sein. Eds Eska, Paris.
- Fong, W.G., Liston, P., Rajcan-Separovic, E., St Jean, M., Craig, C., Korneluk, R.G. (2000). Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics*, 70 : 113-122.
- Frierson, H.F., Gaffey, M.J., Zukerberg, L.R., Arnold, A., Williams, M.E. (1996).
 Immunohistochemical detection and gene amplification of cyclin D1 in mammary infiltrating carcinoma. *Mol. Pathol.*, 9: 725-730.
- Garrido, C., Bruey, J.M., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A.P., Solary, E. (1999). HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of pro-caspase-9. *FASEB J.*, 13 : 2061-2070.
- Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A.P., Mehlen, P., Solary, E. (1998). Heat shock protein 27 enhances tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res.*, 58 : 5495-5499.
- Gomm, J.J., Browne, P.J., Coope, R.C., Yiangou, C., Bansal, G.S., Yiangou, C., Johnston, C.L., Mason, R., Coombes, R.C. (1997). A paracrine role for myoepithelial cell-derived FGF2 in the normal human breast. *Exp. Cell Res.*, 234 : 165-173.
- Gomm, J.J., Smith, J., Ryall, G.K., Baillie, R., Turnbull, L., Coombes, R.C. (1991). Localization of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta 1 in human mammary gland. *Cancer Res.*, 51 : 4685-4692.

- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its tranlocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.*, 17 : 3878-3885.
- Hagios, C., Lochter, A., Bissell, M.J. (1998). Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 353: 857-870.
- Hakansson, A., Andreasson, J., Zhivovsky, B., Karpman, D., Orrenius, S., Svanborg, C. (1999). Multimeric alpha-lactalbumin from human milk induces apoptosis through a direct effect on cell nuclei. *Exp. Cell Res.*, 246: 451-460.
- Hakansson, A., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Sabharwal, H., Svanborg, C. (1995). Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 : 8064-8068.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell, 100 : 57-70.
- Hara, I., Miyake, H., Hara, S., Arakawa, S., Kamidono, S. (2000). Differential involvement of the Fas receptor/ligand system in p53-dependent apoptosis in human prostate cancer cell. *Prostate*, 45: 341-349.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407 : 770-776.
- Heppner, K.J., Matrisian, L.M., Jensen, R.A., Rodgers, W.H. (1996). Expression
 of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumorinduced host response. *Am. J. Pathol.*, 149 : 273-282.
- Hosokawa, Y., Arnold, A. (1998). Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells : analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer*, 2 : 66-71.
- Houdebine, L.M. (1997). Biologie de la lactation. Encycl. Med. Chir, Gynécologie Obstétrique. Eds Elsevier.
- Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell*, 88 : 333-346.

- Hynes, N.E., Stern, D.F. (1994). The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1198: 165-184.
- Imagawa, W., Cunha, G.R., Young, P., Nandi, S. (1994). Keratinocyte growth factor and acidic fibroblast growth factor are mitogens for primary cultures of mammary epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204 : 1165-1169.
- Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K., Yonehara, S. (1999). The ced-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*, 398 : 775-785.
- Jäättelä, M. (1995). Overexpression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int. J. Cancer*, 60: 689-696.
- Jäättelä, M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.*,
 248: 30-43.
- Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347-354.
- Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W., Goeddel, D.V. (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*, 283 : 543-546.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 4997-5002.
- Karin, M. (1999). How NF-κB is activated: the role of IκB kinase (IKK) complex.
 Oncogene, 18: 6867-6874.
- Keane, M.M., Ettenberg, S.A., Lowrey, G.A., Russell, E.K., Lipkowitz, S. (1996).
 Fas expression and function in normal and malignant breast cell lines. *Cancer Res.*, 56
 : 4791-4798.

- Kelley, K.M., Oh, Y., Gargosky, S.E., Gucev, Z., Matsumoto, T., Hwa, V., Ng, L., Simpson, D.M., Rosenfeld, R.G. (1996). Insulin-like growth factor-binding proteins and their regulatory dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 28: 619-637.
- Keppler, O.T., Peter, M.E., Hinderlich, S., Moldenhauer, G., Stehling, P., Schmitz, I., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W., Pawlita, M. (1999). Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology*, 9: 557-569.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
- Kim, K., Fisher, M.J., Xu, S.Q., El-Deiry W.S. (2000). Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 6: 335-346.
- Klapper, L.N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N.E., Andrews, G.C., Sela, M., Yarden, Y. (1999). The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 : 4995-5000.
- Klapper, L.N., Kirschbaum, M.H., Sela, M., Yarden, Y. (2000). Biochemical and clinical implications of ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv. Cancer Res.*, 77 : 25-79.
- Kulik, G., Klipppel, A., Weber, M.J. (1997). Antiapoptotic signalling by the insulin growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 1595-1606.
- LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., MacKenzie, A.E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17: 3247-3259.

- Lazaris, A.C., Chatzigianni, E.B., Panoussopoulos, D., Tzimas, G.N., Davaris,
 P.S., Golematis, B.C. (1997). Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein
 70 immunulocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Res. Treat.*, 43 : 43-51.
- Le Bourhis, X., Berthois, Y., Millot, G., Degeorges, A., Sylvi, M., Martin, P.M., Calvo, F. (1997). Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumourous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in coculture. *Int. J. Cancer*, 71: 42-48.
- Le Bourhis, X., Toillon, R.A., Boilly, B., Hondermarck, H. (2000). Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 60 : 251-258.
- Lehmann, W., Widmaire, R., Langen, P. (1989). Response of different epithelial cell lines to a mammary derived growth inhibitor (MDGI). *Biomed. Biochim. Acta*, 48 : 143-151.
- Li, H., Zhu, H., Xu, J., Yuan, J. (1998). Cleavage of Bid by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94 : 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budiharjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of APAF-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91 : 479-489.
- Lin, K.I., Lee, S.H., Narayanan, R., Baraban, J.M., Hardwick, J.M., Ratan, R.R. (1995). Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kappa B. J. Cell Biol., 131 : 1149-1161.
- Lindquist, S., Graig, E.A. (1988). The heat shock proteins. Annu. Rev. Genet., 22: 631-677.

- Liu, F.F., Miller, N., Levin, W., Zanke, B., Cooper, B., Henry, M., Sherar, M.D., Pintillie, M., Hunt, J.W., Hill, R.P. (1996). The potential role of HSP70 as an indicator of response to radiation and hyperthermia treatments for recurrent breast cancer. *Int. J. Hyperthermia*, 12: 197-208.
- Locksley, R.M., Killen, N., Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104 : 487-501.
- Loeffler, M., Kroemer, G. (2000). The mitochondrion in cell death control: Certainties and incognita. *Exp. Cell Res.*, 256 : 19-26.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zhou, I., Slaughter, C., Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94 : 481-490
- Macleod, K. (2000). Tumor suppressor genes. Curr Opin. Genet. Devel., 10: 81-93.
- Malisan, F., Testi, R. (1999). Lipid signaling in CD95-mediated apoptosis. FEBS lett., 452: 100-103.
- Martinou, I., Desagher, S., Eskes, R., Antonsson, B., Andre, E., Fakan, S., Martinou, J.C. (1999). The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. J. Cell Biol., 144 : 883-889.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, 281 : 2027-2031.
- Meng, R.D., McDonald, E.R., Sheikh, M.S., Fornace, A.J., El-Deiry, W.S. (2000). The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirusp53 overexpression and can delay TRAIL-, p53- and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Mol. Ther.*, 1 : 130-144.

- Mercurio, F., Manning, A.M. (1999). Multiple signals converging on NF-κB. Curr.
 Opin. Cell Biol., 11 : 226-232.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer gene susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266 : 66-71.
- Miyoshi, Y., Iwao, K., Takahashi, Y., Egawa, C., Nogushi, S. (2000). Acceleration
 of chromosomal instability by loss of BRCA1 expression and p53 abnormality in
 sporadic breast cancers. *Cancer lett.*, 159: 211-216.
- Momand, J., Wu, H.H., Dasgupta, G. (2000). MDM2-master regulator of p53 tumor suppressor protein. *Gene*, 242 : 15-29.
- 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.L., Fesik, S.W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381 : 335-341.
- Muslin, A.J., Xing, H. (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal.*, 12: 703-709.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED3 protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 85 : 817-827.
- Nakamura, T., Matsumoto, K., Kiritoshi, A., Tano, Y., Nakamura, T. (1997). Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: *in vitro* analysis of tumor-stromal interactions. *Cancer Res.*, 57 : 3305-3313.

- Nakashatri, H., Bhat-Nakashatri, P., Martin, D.A., Goulet, R.J., Sledge, G.W. (1997). Constitutive activation of NF-κB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol. Cell. Biol.*, 17 : 3629-3639.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 14681-14686.
- Naujokat, C., Sezer, O., Possinger, K. (1999). Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma induce expression of functional Fas ligand on HT29 and MCF7 adenocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264 : 813-819.
- Neiman, P.E. (1998). Integration of the central death pathway in cellular decisionmaking. J. Cell Physiol., 177: 518-524.
- Nguyen, M., Lee, M.C., Wang, J.L., Tomlinson, J.S., Shao, Z.M., Alpaugh, M.L., Barsky, S.H. (2000). The human myoepithelial cell displays a multifaceted antiangiogenic phenotype. *Oncogene*, 19: 3449-3459.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.*, 6: 1028-1042.
- Nickerson, T., Huynh, H., Pollak, M. (1997). Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 237: 690-693.
- Ogasawara, M., Sirbasku, D.A. (1988). A new serum-free method of measuring growth factor activities for human breast cancer cells in culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 24: 911-920.
- Oh, Y. (1998). IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding protein. *Breast Cancer Res. Treat.*, 47 :283-293.

- Oh, Y., Müller, H.L., Lamson, G., Rosenfeld, R.G. (1993). Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. J. Biol. Chem., 268: 14964-14971.
- Paik, S. (1992). Expression of IGF-I and IGF-II mRNA in breast tissue. Breast Cancer Res. Treat., 22: 31-38.
- Pan, G., O'Rourke, K., Dixit, V.M. (1998). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. J. Biol. Chem., 273: 5841-5845.
- Panka, D.J., Mano, T., Suhara, T., Walsh, K., Mier, J.W. (2001).
 Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells.
 J. Biol. Chem., 276 : 6893-6896.
- Pastorino, J.G., Tafani, M., Farber, J.L. (1999). Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of Bad through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway. J. Biol. Chem., 274: 19411-19416.
- Peter, M.E., Hellbardt, S., Schwartz-Albiez, A., Westendorp, M.O., Walczak, H., Moldenhauer, G., Grell, M., Krammer, P.H. (1995). Cell surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Differ.*, 2: 163-171.
- Peter, M.E., Scaffidi, C., Medema, J.P., Kischkel, F., Krammer, P.H. (1998). The death receptors. *Apoptosis : biology and mechanisms*, Eds Springer (Berlin).
- Peyrat, J-P., Bonneterre, J., Hecquet, B., Vennin, P., Louchez, M.M., Fournier, C., Lefebvre, J., Demaille, A. (1993). Plasma insulin-like Growth factor-1 (IGF-1) concentrations in human breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 29: 492-497.
- Pitti, R.M., Marsters, D.A., Lawrence, D.A., Roy, M., Kischkel, F.C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C.J., Sherwood, S.W., Baldwin, D.T., Godowski, P.J., Wood, W.I., Gurney, A.L., Hillan, K.J., Cohen, R.L., Goddard, A.D., Botstein, D.,

Ashkenazi, A. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, **396** : 699-703.

- Porter, A.G. (1999). Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 9: 394-401.
- Prendergast, G.C. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. Oncogene, 18: 2967-2987.
- Ragnarsson, G.B., Mikaelsdottir, E.K., Vidarsson, H., Jonasson, J.G., Olafsdottir, K., Kristjansdottir, K., Kjartansson, J., Ogmundsdottir, H.M., Rafnar, T. (2000).
 Intracellular Fas ligand in normal and malignant breast epithelium does not induce apoptosis in Fas-sensitive cells. *Br. J. Cancer.*, 83 : 1715-1721.
- Rasmussen, A.A., Cullen, K.J. (1998). Paracrine/autocrine regulation of breast cancer by the insulin-like growth factors. *Breast Cancer Res. Treat.*, 47: 219-233.
- Resnicoff, M., Abraham, D., Yutunawibonchai, W., Rotman, H.J., Kajstura R.J., Rubin, R., Zoltik, P., Baserga, R. (1995). The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cell from apoptosis in vivo. *Cancer Res.*, 55 : 2463-2469.
- Resnik, J.L., Reichart, D.B., Huey, K., Webster, N.J.G., Seely, B.L. (1998).
 Elevated insulin-like growth factor I receptor autophosphorylation and kinase activity in human breast cancer. *Cancer Res.*, 58: 1159-1164.
- Rodriguez, J., Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.*, 13: 3179-3184.
- Roth, W., Isenmann, S., Nakamura, M., Platten, M., Wick, W., Kleihues, P., Bahr, M., Ohgaki, H., Ashkenazi, A., Weller, M. (2001). Soluble decoy receptor 3 is expressed by gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. *Cancer Res.*, 61 : 2759-2765.
- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.*, 16: 6914-6925.

- Rudin, C.M., Thompson, C.B. (1997). Apoptosis and disease. Regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu. Rev. Med.*, 48: 267-281.
- Ryu, B.K., Lee, M.G., Chi, S.G., Kim, Y.W., Park, J.H. (2001). Increased expression of cFLIP(L) in colonic adenocarcinoma. J. Pathol., 194 : 15-19.
- Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 : 10964-10967.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinavasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K-M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, 17 : 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. J. Biol. Chem., 274 : 1541-1548.
- Schendel, S.L., Azimov, R., Pawlowski, K., Godzik, A., Kagan, B.L. (1999). Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. J. Biol. Chem., 274 : 21932-21936.
- Schendel, S.L., Montal, M., Reed, J.C. (1998). Bcl-2 family proteins as ionchannels. *Cell death differ.*, 5: 372-380.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., Krammer, P.H. (2000). Regulation of death receptormediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 32 : 1123-1136.
- Sheikh, M.S., Fornace, A.J. (2000a). Role of p53 family members in apoptosis. J. Cell Physiol., 182 : 171-181.
- Sheikh, M.S., Fornace, A.J. (2000b). Death and decoy receptor and p53-mediated apoptosis. *Leukemia*, 14: 1509-1513.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68: 850-858.

- Shimizu, S., Shinohara, Y., Tsujimoto, Y. (2000). Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene*, 19: 4309-4318.
- Singh, A., Blench, I., Morris, H.R., Savoy, L.A., Reed, M.J. (1992). Synergistic interaction of growth factors and albumin in regulating estradiol synthesis in breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 85: 165-173.
- Smith, K., Fox, S.B., Whitehouse, R., Taylor, M., Greenall, M., Clarke, J., Harris, A.L. (1999). Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann. Oncol.*, 10 : 707-713.
- Song, J., Sapi, E., Brown, W., Nilsen, J., Tartaro, K., Kacinski, B.M., Craft, J., Naftolin, F., Mor, G. (2000). Role of Fas and Fas ligand during mammary gland remodelling. J. Clin. Invest., 106 : 1209-1220.
- Soule, H.D., Mc Grath, C.M. (1986). A simplified method for passage and long-term growth of human mammary epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 22 :6-12.
- Stambolic, V., Mak, T.W., Woodget, J.R. (1999). Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis. *Oncogene*, 18: 6094-6103.
- Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M., Salvesen,
 G.S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. J. Biol.
 Chem., 274 : 8259-8362.
- Stevens, A., Lowe, J. (1992). Histologie. Eds Pradel/Edisem.
- Stewart, A.J., Johnson, M.D., May, F.E., Westley, B.R. (1990). Role of insulin-like growth factors and type I insulin-like growth factor receptor in the estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells. J. Biol. Chem., 265: 21171-21178.
- Sun, C., Cai, M., Gunasekera, A.H., Meadows, R.P., Wang, H., Chen, J., Zhang, H., Wu, W., Xu, N., Ng, S.C., Fesik, S.W. (2000). NMR structure and mutagenesis 160 -

of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. J. Biol. Chem., 275 : 33777-33781.

- Suzuki, A., Obata, S., Hayashida, M., Kawano, H., Nakano, T., Shiraki, K. (2001). SADS: A new component of Fas-DISC is the accelerator for cell death signaling and is downregulated in patients with colon carcinoma. *Nat. Med.*, 7: 88-93.
- Svensson, M., Hakansson, A., Mossberg, A-K., Linse, S., Svanborg, C. (2000).
 Conversion of α-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 97 : 4221-4226.
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scuderio, D.A., Vigna, N., Oltersdorf, T., Reed, J.C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.*, 58 : 5315-5320.
- Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M., Nagata, S. (1998). Down regulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.*, 4: 31-36.
- Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi,
 K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., Hatake, K., Drummond, A.H., Nagata, S.
 (1996). Fas ligand in human serum. *Nat. Med.*, 2 : 317-322.
- Tlsty, T.D., Hein, P.W. (2001). Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Cur. Opin. Genet. Devel.*, 11: 54-59.
- Toi, M., Taniguchi, T., Ueno, T., Asano, M., Funata, N., sekiguchi, K., Iwanari, H., Tominaga, T. (1998). Significance of circulating hepatocyte growth factor level as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 4: 659-664.
- Toillon, R-A., Adriaenssens, E., Wouters, D., Lottin, S., Boilly, B., Hondermarck, H., Le Bourhis, X. (2000). Normal breast epithelial cells induce apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through a p53-mediated pathway. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 3: 338-344.

- Tonner, E., Allan, G., Shkreta, L., Webster, J., Whitelaw, C.B., Flint, D.J. (2000). Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) potentially regulates programmed cell death and plasminogen activation in the mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 480 : 45-53.
- Tonner, E., Barber, M.C., Travers, M.T., Logan, A., Flint, D.J. (1997). Hormonal control of insulin-like growth factor-binding protein-5 production in the involuting mammary gland of the rat. *Endocrinology*, 138 : 5101-5107.
- Tschopp, J., Martinon, F., Hofmann, K. (1999). Apoptosis: silencing the death receptor. Curr. Biol., 9: R381-R384.
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: Life-or-death switch. FEBS lett.,
 466: 6-10.
- Van Echten, G., Sandhoff, K. (1993). Ganglioside metabolism. Enzymology, topology and regulation. J. Biol. Chem., 268: 5341-5344.
- Van Golen, K., Milliron, K., Davies, S., Merajver, S.D. (1999). BRCA-associated cancer risk: molecular biology and clinical practice. J. Lab. Clin. Med., 134 : 11-18.
- Van Roozendal, C.E.P., Van Ooijen, B., Klijn, J.G.M., Claassen, C., Eggermont, A.M.M., Henzen-Logmans, S.C., Foekens, J.A. (1992). Stromal influences on breast cancer cell growth. *Br. J. Cancer*, 65 : 77-81.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Li, X.X., Schumacker, P.T., Colombini, M., Thompson, C.B. (2000). Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 : 4666-4671.
- Vander Heiden, M.G., Thompson, C.B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat. Cell Biol.*, 8 : E209-E216.
- Vargas-Roig, L.M., Fanelli, M.A., Lopez, L.A., Gago, F.E., Tello, O., Aznar, J.C., Ciocca, D.R. (1997). Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples. *Cancer Detect. Prev.*, 21 : 441-451.

- Vargas-Roig, L.M., Gago, F.E., Tello, E., Aznar, J.C., Ciocca, D.R. (1998). Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 73: 468-475.
- Vaux, D.L., Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. Cell, 96: 245-254.
- Vogel, P.M., Georgiade, N.G., Fetter, B.F., Vogel, F.S., McCarty, K.S. Jr. (1981).
 The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle.
 Am. J. Pathol., 104 : 23-34.
- Wadgaonkar, R, Phelps, K.M., Haque, Z., Williams, A.J., Silverman, E.S., Collins, T. (1999). CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-κB and p53 signaling. J. Biol. Chem., 274 : 1879-1882.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki,
 F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., Reed, J.C. (1999). Ca2+-induced apoptosis
 through calcineurin dephosphorylation of Bad. *Science*, 284 : 339-343.
- Wang, Q., Zhang, H., Fishel, R., Greene, M.I. (2000). BRCA1 and cell signaling. Oncogene, 19: 6152-6158.
- Weaver, V.M., Fischer, A.H., Petersen, O.W., Bissell, M.J. (1996). The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using unique human mammary epithelial cell model and three dimensional culture assay. *Biochem. Cell Biol.*, 74: 833-851.
- Webster, N.J.G., Resnik, J.L., Reichard, D.B., Strauss, B., Haas, M., Seely, B.L. (1996). Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: A possible mechanism for receptor overexpression in breast cancer. *Cancer Res.*, 56 : 2781-2788.
- Welcsh, P.L., Owens, K.N., King, M.C. (2000). Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet.*, 16: 69-74.

- Werner, H., Karnieli, E., Rauscher, F.J., Leroith, D. (1996). Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor receptor I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 7001-7005.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378 : 789-792.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R. (1980). Cell death : the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol., 68 : 251-306.
- Xiao, G., Liu, Y.E., Gentz, R., Sang, Q.A., Ni, J., Goldberg, I.D., Shi, Y.E. (1999).
 Suppression of breast cancer growth and metastasis by a serpin myoepitheliumderived serine proteinase inhibitor expressed in the mammary myoepithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96 : 3700-3705.
- Yamashita, J., Ogawa, M., Yamashita, S., Nomura, K., Kuramoto, M., Saijshoji, T., Shin, S. (1994). Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res.*, 54 : 1630-1633.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y., Baltimore, D. (1997). Daxx, a novel Fasbinding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, 89 : 1067-1076.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M., Ashwell, J.D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasome in response to apoptotic stimuli. *Science*, 288 : 874-877.
- Yee, D., Paik, S., Lebovic, G.S., Marcus, R.R., Favoni, R.E., Cullen, K.J., Lippman, M.E., Rosen, N. (1989). Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol. Endocrinol.*, 3 : 509-517.

- Yeh, J.H., Hsu, S.C., Han, S.H., Lai, M.Z. (1998). Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized Fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. J. Exp. Med., 188: 1795-1802.
- Yu, K.Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Kwon, B.S. (1999). A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. J. Biol. Chem., 274: 13733-13736.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 87 : 619-628.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. (1999). An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J. Biol. Chem., 274: 11549-11556.

