



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

2002

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 3 avril 2002

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ - NANCY I

Mention Sciences du Médicament

par

Céline DIDELOT

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
de Pharmacologie clinique

B 2624

**ARRETS DU CYCLE CELLULAIRE ET INDUCTION D'APOPTOSE
POUR DES LIGNEES DE CARCINOME HUMAIN DE LA TETE ET DU
COU HPV-18 POSITIVES, APRES EXPOSITION AU
5-FLUOROURACILE ET AUX RADIATIONS IONISANTES.
Implication de NF- κ B dans la radiosensibilité et l'apoptose spontanée.**

MEMBRES DU JURY

Juges	:	Madame le Docteur M. BARBERI-HEYOB Monsieur le Professeur M. DAUCA Monsieur le Docteur J.L. MERLIN Monsieur le Docteur G. MILANO
Rapporteurs	:	Monsieur le Docteur P. JACQUET Monsieur le Professeur P. VERRELLE



***Il y a ceux qui disent «A quoi Bon?», et qui ne voient que les obstacles
à surmonter ; et puis il y a ceux qui disent «Pourquoi pas?», et qui ne
voient que le but à atteindre.
Le sens de ta vie? Voici le secret:
«Fais de ton mieux. Puis laisse faire Dieu».***

Jade

François Garagnon.

Papa et Maman

Vous êtes le plus beau cadeau que la vie m'ait accordé. Merci pour votre éducation, votre patience, votre écoute, vos privations et surtout pour votre amour sans limite. Vous êtes pour moi un exemple...et il me reste du boulot ! Ce travail est entièrement pour vous.

Nadège

Comment pourrais-je me passer de toi ? Durant ces "quelques" années d'études, tu as toujours été présente pour apporter de la couleur à ma vie, comme tu sais si bien le faire. Tu es décidément ma sœur préférée !!!

Jean-François

Notre rencontre est la plus belle chose que cette thèse m'ait apportée. Merci pour ta présence, ta patience dans les moments "un peu" difficiles. Merci d'exister.

J'espère qu'à présent la vie sera plus douce pour nous deux.

Mes deux Mères

Merci pour vos prières qui illuminent nos vies et qui m'ont soutenu dans ce travail.

Mes amis

J'ai beaucoup de chance car vous êtes nombreux. Vous saurez vous reconnaître. Merci pour l'amitié que vous m'accordez en m'acceptant comme je suis. Vous m'avez appris qu'il n'est pas nécessaire d'être toujours ensemble pour rester proche.

Monsieur de Docteur Jean-Louis Merlin

Voilà 6 ans que vous m'avez accueillie dans votre laboratoire. Tout d'abord pour mon stage de maîtrise puis celui de DEA et enfin cette thèse. Ces nombreuses années m'ont permis de me familiariser avec plusieurs techniques, notamment la cytométrie en flux pour laquelle vous m'avez accordé une formation spécialisée.

Je vous remercie de votre confiance en me proposant de travailler en collaboration avec d'autres équipes ainsi que de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes résultats à des congrès nationaux et internationaux.

Madame le Docteur Muriel Barberi-Heyob

Vous avez encadré ce travail depuis le début de mon DEA. Durant ces quatre années, nous avons partagé les problèmes techniques, les déceptions, mais également la satisfaction des résultats publiés. Tout au long de ce travail, vous avez su me communiquer votre enthousiasme scientifique et votre optimisme.

Merci pour le temps que vous m'avez consacré durant cette thèse, ainsi que pour les corrections de ce manuscrit, réalisées malgré votre état grippal.

Monsieur le Professeur François Guillemin

Je vous remercie pour votre confiance et votre écoute, ainsi que pour votre aide financière qui m'a permis de terminer ce travail dans les meilleures conditions.

Monsieur le Docteur Paul Jacquet et Monsieur le Professeur Pierre Verrelle

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Monsieur le Professeur Michel Dauça

Je vous remercie tout d'abord pour le Professeur que vous avez été durant mes années d'études à la faculté des Sciences. Vous étiez toujours agréable, disponible et passionnant : vous êtes une perle pour les étudiants.

Je vous remercie pour les corrections que vous avez apportées à ce manuscrit ainsi que pour votre accueil chaleureux au sein de votre laboratoire où je suis venue de nombreuses fois durant ces deux dernières années.

Monsieur le Docteur Gérard Milano

Je vous remercie pour votre accueil lors de mon stage dans votre laboratoire. Je garde un agréable souvenir de ce séjour qui m'a permis notamment, de me familiariser avec la technique ELISA.

Monsieur le Docteur Philippe Becuwe

Je te remercie pour ton aide précieuse dans ce travail. Ton esprit scientifique m'a aidé à voir certains résultats d'une façon différente et surtout intéressante. Notre collaboration fût très enrichissante.

Arnaud Bianchi

Souvent, je t'ai pris de ton temps précieux ! Merci pour ton savoir faire, ta patience et ta bonne humeur intarissable.

Monsieur Pierre Aletti et Monsieur Alain Noël

Je vous remercie de votre confiance et d'avoir accepté que j'utilise le Thératron à des heures parfois marginales...

Monsieur le Docteur Gilles Dolivet

Je vous ai dérangés bien des fois durant ces années au laboratoire. Je vous remercie d'avoir pris au sérieux mes "bobos" et frayeurs. Vous êtes un couturier hors pair, dont je garde au bout du doigt un souvenir discret...

Jean-François

Durant ces années, nous avons beaucoup travaillé ensemble. Je te remercie pour tout le temps que tu m'as consacré depuis l'apprentissage des techniques jusqu'à la relecture de ce manuscrit, sans oublier la résolution de mes nombreux problèmes informatiques. Ta rigueur scientifique et ton amour du travail bien fait est pour moi un exemple.

Carole

Je vais m'abstenir de faire une page entière, mais le cœur y est ! Quand je suis arrivée au laboratoire, on t'a présenté comme la maman des cellules. En fait, tu es bien plus que ça. Durant ces quatre années tu as été une aide précieuse pour l'obtention de certains résultats, mais aussi une confidente, un rayon de soleil, bref, une amie. Merci pour tout.

Cédric et Sandra

Je vous remercie pour votre travail effectué durant vos stages.

Dominique

Je te remercie pour ta disponibilité. Tu m'as été d'une aide précieuse durant ces derniers mois.

Tous les membres du Laboratoire de Recherche en Oncologie

Il y a de nombreuses personnes qui ont défilé durant ces années : des nouveaux visages, de nouvelles personnalités, de nouvelles façons de penser. C'est enrichissant de connaître la diversité. Je vous souhaite à tous le bonheur professionnel que vous désirez.

Les membres du personnel du CAV

Nous nous sommes croisés, souris, ou même arrêtés un instant pour se parler. Merci à tous ceux qui ont contribué à rendre agréable ces années au CAV, notamment aux brancardiers et aux gardiens qui ont toujours un petit mot gentil pour nous redonner le sourire et qui prennent soin « des filles » quand elles restent tard au labo.

Monsieur Martel

Je sais que les étudiants du laboratoire sont un calvaire pour vous ! Pourtant, vous avez toujours accepté de faire des travaux qui étaient pour la veille. Merci pour la rapidité d'un travail si bien fait.

Les comités Lorrains de la Ligue contre le Cancer

Merci pour le soutien financier que vous m'avez accordé durant ces 3 années.

Je tiens aussi à remercier les fidèles donateurs sans qui ce travail n'aurait pu être possible.

La Société Française contre le Cancer

Merci pour votre aide financière qui m'a permis de présenter mes résultats au congrès de l'AACR à la Nouvelle Orléans. Sans vous je n'aurais pas pu réaliser cette expérience enrichissante.

SOMMAIRE

the 1990s, the number of people in the UK who are aged 65 and over has increased by 1.5 million, and the number of people aged 75 and over has increased by 1 million (Office for National Statistics 1999). The number of people aged 85 and over has increased by 0.5 million.

There is a growing awareness of the need to develop services to meet the needs of the ageing population. The Department of Health (1999) has set out a strategy for the future of health care for older people. The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable.

The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable. The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable.

The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable. The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable.

The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable. The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable.

The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable. The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable.

The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable. The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable.

The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable. The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable.

The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable. The strategy is based on the following principles: (1) to ensure that older people have access to the services they need; (2) to ensure that services are of high quality; (3) to ensure that services are cost-effective; and (4) to ensure that services are sustainable.



TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1 **Effets cellulaires du 5-fluorouracile ou
des radiations ionisantes**

CHAPITRE 2 **P53**

CHAPITRE 3 **HPV**

CHAPITRE 4 **NF- κ B**

CHAPITRE 5 **Matériels et méthodes**

CHAPITRE 6 **Résultats et discussion**

CHAPITRE 7 **Conclusions et perspectives**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

TABLE des MATIERES

the 1990s, the number of people in the world who are under 15 years of age has increased by 1.2 billion, from 1.1 billion in 1980 to 2.3 billion in 1999 (United Nations 2000). The number of children in the world is projected to increase to 3.5 billion by 2025 (United Nations 2000).

There is a growing awareness of the need to address the needs of children in the world. The United Nations has established the Convention on the Rights of the Child (United Nations 1989) and the World Health Organization (WHO) has established the International Classification of Diseases for Children (ICD-10) (WHO 1992). The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents.

The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents. The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents.

The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents. The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents.

The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents. The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents.

The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents. The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents.

The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents. The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents.

The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents. The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents.

The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents. The ICD-10 is a classification system for mental and physical disorders in children and adolescents. It is used by health professionals to diagnose and record mental and physical disorders in children and adolescents.

TABLE des MATIERES

1. EFFETS CELLULAIRES DU 5-FLUOROURACILE OU DES RADIATIONS IONISANTES 19

1.1. Le 5-fluorouracile (5FU)	19
1.1.1. Action sur l'ADN	19
1.1.1.1. Incorporation de la 5-fluorodésoxyuridine triphosphate (FdUTP) dans l'ADN	19
1.1.1.2. Inhibition de la TS	20
1.1.2. Arrêts dans le cycle et mort cellulaire induits par le 5FU	20
1.2. La radiothérapie	21
1.2.1. Action sur l'ADN	21
1.2.2. Arrêts dans le cycle et mort cellulaire induits par la radiothérapie	21
1.3. Conclusion	23

2. P53 27

2.1. Structure de la protéine P53	27
2.2. Régulation de P53	28
2.2.1. Transcriptionnelle	28
2.2.2. Traductionnelle	28
2.2.3. Post-traductionnelle	28
2.2.3.1. Boucle d'autorégulation négative Mdm2/P53	29
2.2.3.2. Maintien du niveau constitutif de P53 par JNK	30
2.2.3.3. Phosphorylations	31
2.2.3.3.1. Phosphorylations au niveau de la région N-terminale	31
2.2.3.3.2. Phosphorylations au niveau de la région C-terminale	31
2.2.3.4. Déphosphorylation	32
2.2.3.5. Acétylation	32
2.2.3.6. O-glycosylation	32
2.2.3.7. Localisation subcellulaire	32
2.3. Fonctions et modes d'action de P53	33
2.3.1. Induction de P53	33
2.3.1.1. Les cassures double-brin	34
2.3.1.1.1. La DNA-PK	34
2.3.1.1.2. ATM	34
2.3.1.1.3. ATR	35
2.3.1.2. Cassures simple-brin et insertions ou délétions de séquences	35
2.3.2. Arrêts dans le cycle	35
2.3.2.1. Arrêt en G ₁ /S	35
2.3.2.2. Arrêt en G ₂ /M	36
2.3.3. Réparation de l'ADN (maintien de l'intégrité du génome)	38
2.3.4. Induction de l'apoptose	39
2.3.4.1. Apoptose induite par P53 via une régulation transcriptionnelle de gènes cibles.	40
2.3.4.1.1. Bax/Bcl2	40
2.3.4.1.2. Fas/Apo-1/CD95	41
2.3.4.1.3. IGF-BP3	41
2.3.4.1.4. KILLER/DR5	41



TABLE des MATIERES

2.3.4.1.5. PAG608	41
2.3.4.1.6. P53AIP1	41
2.3.4.1.7. Autres gènes induits par P53	42
2.3.4.2. Apoptose induite par P53 via d'autres mécanismes que l'induction transcriptionnelle	43
2.3.5. Différenciation	44
2.4. Perte de fonction de P53	44
2.5. Conclusion	46
 3. HPV	 49
3.1. Organisation du génome de HPV	49
3.1.1. URR	50
3.1.2. E1	50
3.1.3. E2	50
3.1.4. E4	52
3.1.5. E5	52
3.1.5.1. E5 et le récepteur à l'EGF	52
3.1.5.2. E5 et le récepteur au PDGF	52
3.1.5.3. E5 et le contrôle du cycle cellulaire	53
3.1.6. E6	53
3.1.6.1. Dégradation de P53 induite par E6	53
3.1.6.2. E6, apoptose et cycle cellulaire	55
3.1.7. E6*	55
3.1.8. E7	55
3.1.9. L1 et L2	56
3.2. Influence de HPV sur la sensibilité des cellules aux traitements anticancéreux	57
3.3. Conclusion	59
 4. NF-kappa B	 63
4.1. Structure du complexe NF-κB	63
4.2. Structure du complexe NF-κB/ADN	64
4.3. Régulation de l'activité de NF-κB	66
4.3.1. Inhibition de l'activité de NF-κB par IκB	66
4.3.2. Régulation de l'activité de NF-κB par phosphorylation	70
4.3.3. Activation de NF-κB par le TNFα ou par les radiations ionisantes	71
4.3.3.1. Les voies d'induction déclenchée par le TNF	71
4.3.3.2. Voie d'induction déclenchée par les radiations ionisantes	73
4.3.4. Inhibition de NF-κB	74
4.3.4.1. Les anti-oxydants	74
4.3.4.2. Les inhibiteurs de protéasomes	75
4.3.4.3. Les inhibiteurs de phosphorylation de IκBα	75
4.3.4.4. Les inhibiteurs du transport nucléaire de NF-κB	76
4.3.4.5. Les inhibiteurs de la liaison de NF-κB à l'ADN ou de la transactivation	76
4.3.4.6. IκBα super-répresseur	76
4.4. Rôles de NF-κB	77

TABLE des MATIERES

4.4.1. Fonctions de NF- κ B dans l'inflammation et la réponse immunitaire	77
4.4.2. Fonctions de NF- κ B dans la mise en place de l'apoptose	77
4.4.2.1. NF- κ B: facteur de transcription de gènes anti-apoptotiques	78
4.4.2.2. NF- κ B : facteur de transcription de gènes pro-apoptotiques	79
4.4.2.3. NF- κ B : régulateur du cycle cellulaire	79
4.4.2.4. NF- κ B interagit avec des protéines cellulaires impliquées dans la régulation de l'apoptose	80
4.4.2.5. NF- κ B : substrat des caspases	80
4.4.2.6. Conclusion NF- κ B et apoptose	81
4.5. NF-κB interagit avec d'autres facteurs et co-facteurs de transcription	81
4.5.1. Facteurs de transcription	82
4.5.2. Co-facteurs transcriptionnels	82
4.6. NF-κB : radio- et chimiosensibilité	83
4.6.1. NF- κ B est la radiosensibilité	83
4.6.2. NF- κ B et la chimiosensibilité	84
4.7. Conclusion	86
 5. MATERIELS ET METHODES	 89
5.1. Lignées cellulaires	89
5.2. Analyse du temps de doublement	90
5.3. Etudes de la survie cellulaire	90
5.3.1. Sensibilité au 5FU	90
5.3.2. Sensibilité aux radiations ionisantes (^{60}Co)	91
5.4. Analyse du cycle cellulaire	92
5.5. Détection de l'apoptose	93
5.6. Analyse de l'expression des gènes	95
5.6.1. Extraction des ARN totaux	95
5.6.2. Transcription inverse (RT)	96
5.6.3. Amplification en chaîne de l'ADN (PCR)	96
5.6.4. Analyse des produits d'amplification	98
5.7. Analyse de l'expression de protéines par western blot	99
5.7.1. Extraction des protéines totales	100
5.7.2. Séparation des protéines sur gels de polyacrylamide	100
5.7.3. Transfert sur membranes	102
5.7.4. Immunomarquage des protéines étudiées	103
5.7.5. Révélation	103
5.8. Analyse de la fixation spécifique du facteur de transcription NF-κB sur l'ADN : gel retard	104
5.8.1. Extraction des protéines nucléaires	104
5.8.2. Marquages des sondes de NF- κ B au ^{32}P	105
5.8.3. Préparation des échantillons	106
5.8.4. Electrophorèse et séchage	107
5.8.5. Révélation	107
5.9. Détermination des protéines du complexe NF-κB : Gel super-retard	108
5.10. Modulation de l'activité NF-κB	108
5.10.1. Diminution de l'activité de NF- κ B par dexaméthasone (DEX)	108
5.10.2. Augmentation de l'activité de NF- κ B par le "Tumor Necrosis Factor alpha" (TNF α)	109

TABLE des MATIERES

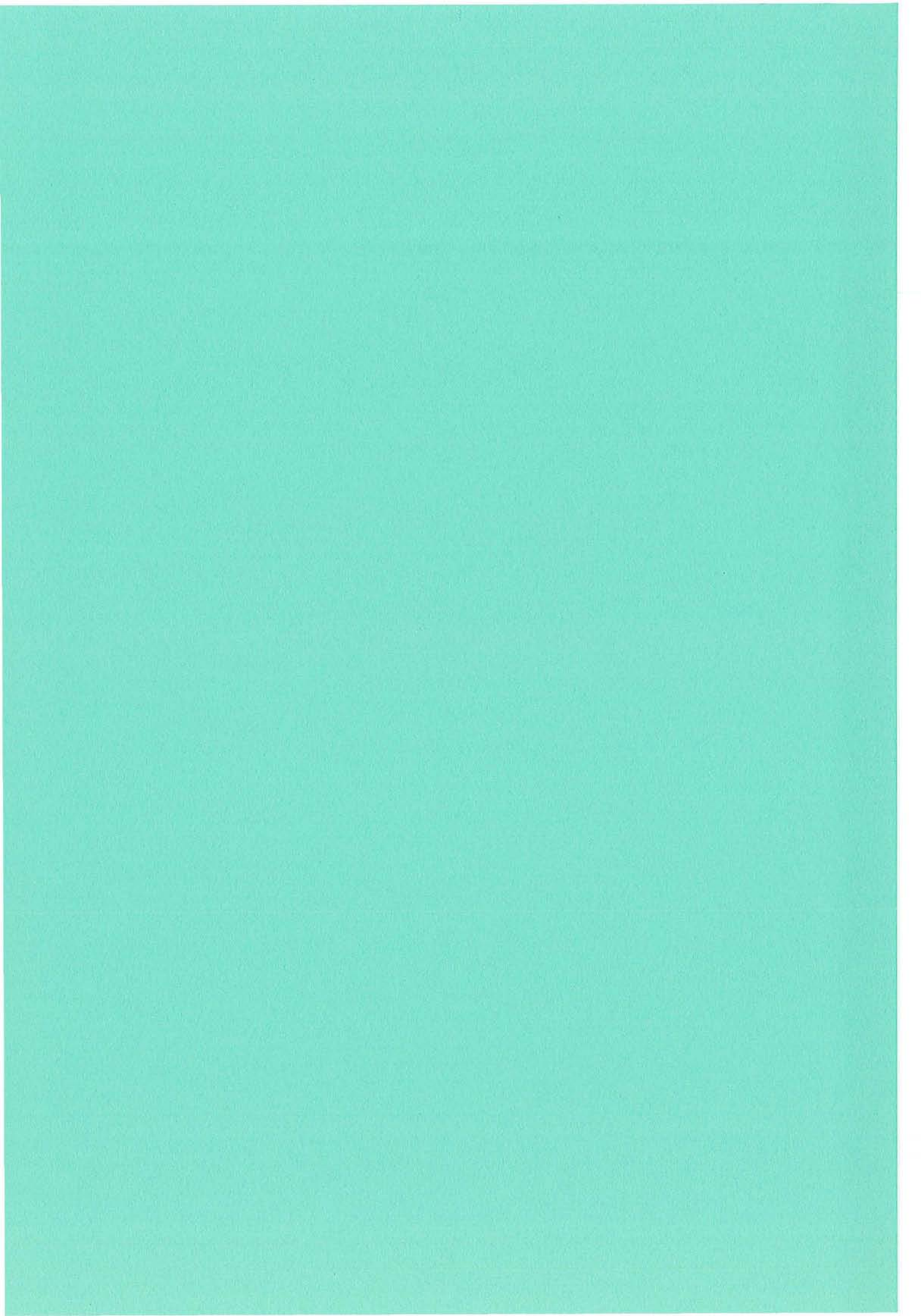
5.11. Analyse statistique	109
6. RESULTATS ET DISCUSSION	115
6.1. Caractérisation des lignées	115
6.1.1. <i>Courbes de croissance et temps de doublement</i>	115
6.1.2. <i>Sensibilité des cellules au 5FU</i>	116
6.1.3. <i>Radiosensibilité des cellules</i>	117
6.1.4. <i>Corrélation entre la radio- et la chimiosensibilité</i>	118
6.1.5. <i>Conclusion</i>	119
6.2. Premier type de stress génotoxique : traitement par 5FU	121
6.2.1. <i>Répartition des cellules dans le cycle cellulaire après exposition au 5FU</i>	121
6.2.2. <i>Cinétique d'expression des transcrits et des protéines P53 après exposition au 5FU</i>	122
6.2.3. <i>Effet du 5FU sur l'expression des transcrits et des protéines virales E6 et E7</i>	125
6.2.4. <i>Effet du 5FU sur l'expression des transcrits p21</i>	127
6.2.5. <i>Induction de l'apoptose par le 5FU</i>	129
6.2.6. <i>Conclusion</i>	131
6.3. Second type de stress génotoxique : radiothérapie	133
6.3.1. <i>Répartition des cellules dans le cycle cellulaire après radiothérapie</i>	133
6.3.2. <i>Cinétique d'expression de la protéine P53 après radiothérapie</i>	135
6.3.3. <i>Effet de la radiothérapie sur l'expression des transcrits et des protéines virales E6 et E7</i>	136
6.3.4. <i>Effet de la radiothérapie sur l'expression des transcrits p21</i>	139
6.3.5. <i>Effet de la radiothérapie sur le pourcentage de cellules en apoptose</i>	140
6.3.6. <i>Conclusion</i>	143
6.4. Implication de l'activité constitutive de NF-κB dans le niveau basal d'apoptose et la radiosensibilité	145
6.4.1. <i>Activité constitutive de NF-κB dans KB et KB3</i>	145
6.4.2. <i>Nature du complexe NF-κB dans KB et KB3</i>	146
6.4.3. <i>Modulation de l'activité de NF-κB</i>	147
6.4.4. <i>Impact de la modulation de NF-κB sur le pourcentage de cellules en apoptose</i>	148
6.4.5. <i>Impact de la modulation de NF-κB sur la radiosensibilité</i>	150
6.4.6. <i>Conclusion</i>	155
7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165

TABLE des MATIERES

ANNEXES	191
Liste des abréviations	193
Liste des figures	197
Liste des tableaux	201
Liste des publications et communications orales	203



INTRODUCTION
GENERALE



INTRODUCTION GENERALE

Dans le cadre de l'étude de la réponse aux traitements anticancéreux, comme le 5FU et radiothérapie, de nombreuses équipes se sont intéressées aux comportements cellulaires après exposition à ces stress génotoxiques. Les mécanismes cellulaires qu'ils induisent, tels que des blocages dans le cycle ou la mise en place de l'apoptose, ainsi que la sensibilité des cellules, varient selon la nature de ces stress. La protéine P53 occupe un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire ainsi que dans la régulation de l'apoptose. Cependant, dans de nombreux cancers, la fonctionnalité de cette protéine est abrogée. Cette perte de fonction peut avoir diverses origines telles que des mutations ou des délétions du gène. De plus, d'autres facteurs peuvent être impliqués. En effet, de nombreuses protéines virales sont responsables de l'inhibition de l'activité de P53. Plus particulièrement, le virus du papillome humain (HPV) code pour la protéine E6, responsable entre autres, de la dégradation de P53. Ce virus peut également être à l'origine de cancers du col utérin et ORL. Les études portant sur le comportement de cellules HPV positives exposées à des stress génotoxiques comme le 5FU ou les radiations ionisantes restent rares.

Toutefois, la protéine P53 n'est pas la seule à posséder un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. En effet, le facteur de transcription NF- κ B a été décrit comme étant impliqué dans ces mécanismes cellulaires ainsi que dans la sensibilité des cellules à un stress tel qu'une irradiation.

Les objectifs de ce travail étaient :

- 1) la caractérisation de la sensibilité au 5-fluorouracile et aux radiations ionisantes, d'une lignée cellulaire HPV-18 positive et de trois clones issus de celle-ci,
- 2) l'étude de l'implication de la protéine P53 et des protéines virales E6 et E7, dans la mise en place de blocages dans le cycle cellulaire et de l'apoptose après exposition au 5FU ou après irradiation ,
- 3) l'implication de l'activité constitutive de NF- κ B dans la radiosensibilité et l'apoptose spontanée

CHAPITRE 1

Effets cellulaires du 5-fluorouracile ou des radiations ionisantes

the 1990s, the number of people in the UK who are employed in the public sector has increased by 1.5 million, from 2.5 million in 1980 to 4 million in 1995 (Department of Health 1996). The number of people employed in the health service has increased by 1.2 million, from 1.8 million in 1980 to 3 million in 1995.

There is a growing emphasis on the need to improve the efficiency of the health service, and to ensure that the health service is able to meet the needs of the population. This has led to a number of initiatives, including the introduction of the Health Service Act 1990, the Health Service Act 1997, and the Health Service Act 2001. These initiatives have led to a number of changes in the way the health service is organised and managed, and to a number of changes in the way the health service is funded.

One of the key challenges facing the health service is the need to improve the efficiency of the health service, and to ensure that the health service is able to meet the needs of the population. This has led to a number of initiatives, including the introduction of the Health Service Act 1990, the Health Service Act 1997, and the Health Service Act 2001. These initiatives have led to a number of changes in the way the health service is organised and managed, and to a number of changes in the way the health service is funded.

One of the key challenges facing the health service is the need to improve the efficiency of the health service, and to ensure that the health service is able to meet the needs of the population. This has led to a number of initiatives, including the introduction of the Health Service Act 1990, the Health Service Act 1997, and the Health Service Act 2001. These initiatives have led to a number of changes in the way the health service is organised and managed, and to a number of changes in the way the health service is funded.

One of the key challenges facing the health service is the need to improve the efficiency of the health service, and to ensure that the health service is able to meet the needs of the population. This has led to a number of initiatives, including the introduction of the Health Service Act 1990, the Health Service Act 1997, and the Health Service Act 2001. These initiatives have led to a number of changes in the way the health service is organised and managed, and to a number of changes in the way the health service is funded.

One of the key challenges facing the health service is the need to improve the efficiency of the health service, and to ensure that the health service is able to meet the needs of the population. This has led to a number of initiatives, including the introduction of the Health Service Act 1990, the Health Service Act 1997, and the Health Service Act 2001. These initiatives have led to a number of changes in the way the health service is organised and managed, and to a number of changes in the way the health service is funded.

One of the key challenges facing the health service is the need to improve the efficiency of the health service, and to ensure that the health service is able to meet the needs of the population. This has led to a number of initiatives, including the introduction of the Health Service Act 1990, the Health Service Act 1997, and the Health Service Act 2001. These initiatives have led to a number of changes in the way the health service is organised and managed, and to a number of changes in the way the health service is funded.

One of the key challenges facing the health service is the need to improve the efficiency of the health service, and to ensure that the health service is able to meet the needs of the population. This has led to a number of initiatives, including the introduction of the Health Service Act 1990, the Health Service Act 1997, and the Health Service Act 2001. These initiatives have led to a number of changes in the way the health service is organised and managed, and to a number of changes in the way the health service is funded.

1. EFFETS CELLULAIRES DU 5-FLUOROURACILE OU DES RADIATIONS IONISANTES

1.1. Le 5-fluorouracile (5FU)

Le 5FU est un antimétabolite découvert il y a une cinquantaine d'années. Il est couramment utilisé comme agent antitumoral. Le 5FU, utilisé seul ou en combinaison, est administré pour le traitement des cancers gastro-intestinaux, des tumeurs des voies aérodigestives supérieures, ainsi que les tumeurs mammaires (Grem, 1990).

Le 5FU est une prodrogue qui nécessite une conversion métabolique intracellulaire pour exercer ses effets cytotoxiques.

1.1.1. Action sur l'ADN

Le 5FU génère un stress génotoxique à la cellule *via* deux mécanismes qui altèrent l'ADN :

- Incorporation d'une base fluorée durant la réplication ou la réparation de l'ADN,
- Inhibition de l'enzyme thymidylate synthase (TS) qui catalyse la méthylation réductrice de la désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP), essentielle à la synthèse de la base thymidine.

1.1.1.1. Incorporation de la 5-fluorodésoxyuridine triphosphate (FdUTP) dans l'ADN

Le FdUTP, un anabolite du 5FU, peut être incorporé dans l'ADN durant la synthèse de l'ADN au même titre que l'uridine triphosphate (UTP).

INTRODUCTION

1.1.1.2. Inhibition de la TS

La 5-fluorodésoxyuridine monophosphate (FdUMP), un anabolite du 5FU, inhibe la TS en formant un complexe ternaire avec l'enzyme et le co-facteur 5,10-méthylène tétrahydrofolate. La TS ne peut alors plus participer à la synthèse du nucléotide dTMP, essentiel à la synthèse de l'ADN (Parker et Cheng, 1990).

Les causes de l'apparition des cassures de l'ADN après un traitement par 5FU sont :

- un ratio élevé de désoxyuridine triphosphate / désoxythymidine triphosphate (dUTP/dTTP), provoqué par l'inhibition de la TS, entraîne la saturation des systèmes de réparation, provoquant des cassures dans les brins de l'ADN (Gouliau *et al.*, 1986),
- le déséquilibre de la quantité des désoxyribonucléosides triphosphates dû à une déplétion des dTTP, entraîne des cassures double-brin de l'ADN (Yoshioka *et al.*, 1987).
- l'incorporation d'une base fluorée (FUTP) dans l'ADN entraîne des cassures de l'ADN dues à l'inhibition de l'enzyme de réparation uracile-N-glycosylase (Lonn et Lonn, 1984; Parker et Cheng, 1990).

1.1.2. Arrêts dans le cycle et mort cellulaire induits par le 5FU

Le 5FU peut induire des blocages dans le cycle cellulaire au niveau G₀/G₁ (Pickard *et al.*, 1995), G₁/S (Huschtscha *et al.*, 1996; Piazza *et al.*, 1997), S (Pickard *et al.*, 1995; Yoneda *et al.*, 1998), et G₂/M (Pickard *et al.*, 1995). Le type de blocage observé semble dépendre de l'origine cellulaire, du statut P53 des cellules ainsi que de la concentration de 5FU (Pickard *et al.*, 1995).

Des détails sur les mécanismes de mise en place de l'apoptose sont développés dans le chapitre suivant.

L'induction d'apoptose par le 5FU a été observée à la fois sur des cellules exprimant une protéine P53 sauvage ou mutée (Yang *et al.*, 1996; Yoneda *et al.*, 1998). Cependant, l'apoptose induite par le 5FU semble difficile à détecter pour des cellules totalement déficientes en P53 (Piazza *et al.*, 1997). La voie d'induction de l'apoptose par le 5FU la plus décrite, passe par l'induction de l'expression de la protéine Bax et l'inhibition de la protéine Bcl2, par P53 (Koshiji *et al.*, 1997; Yoneda *et al.*, 1998).

1.2. La radiothérapie

1.2.1. Action sur l'ADN

Les dommages radio-induits de l'ADN sont divers. Les principaux dommages sont :

- des cassures simple-brin,
- des cassures double-brin,
- des dommages au niveau des bases et des sucres,
- des dommages multiples localisés,
- des dommages oxydatifs de bases,
- des pontages protéines-ADN,
- des pontages interbrins ADN-ADN.

Les dommages multiples localisés sont des cassures, des modifications de bases et de sucre et des dommages oxydatifs induits à proximité les uns des autres dans l'ADN. Ces dommages, ainsi que les cassures double-brin sont particulièrement dangereux pour la cellule et sont à l'origine d'effets létaux ou mutagènes pouvant aboutir à la cancérogénèse (Goodhead, 1994).

Ces lésions sont générées par des phénomènes d'excitation et d'ionisation de la matière par les radiations. Les effets directs sont causés par l'ionisation d'un atome d'une molécule, alors que les effets indirects nécessitent l'action de radicaux libres provenant de la radiolyse de l'eau.

D'après une étude récente, 1 Gray (Gy) induit dans une cellule environ 1000 cassures simple brin, 40 cassures doubles brins, 2000 dommages de bases sur simple-brin, 70 dommages multiples sur les deux brins, 160 pontages interbrins et 30 pontages protéines-ADN (Averbeck, 2000).

1.2.2. Arrêts dans le cycle et mort cellulaire induits par la radiothérapie

Après radiothérapie, les cellules peuvent s'arrêter dans le cycle cellulaire au niveau des interfaces G_1/S et/ou G_2/M , ainsi que s'accumuler dans la phase S en ralentissant la synthèse d'ADN.

L'arrêt en G_1/S dépend de la protéine P53 (Kuerbitz *et al.*, 1992) alors que l'arrêt en G_2/M peut être P53 indépendant.

Etant donné que les résultats décrits sont très contradictoires (McIlwrath *et al.*, 1994; Slichenmyer *et al.*, 1993) aucune corrélation entre la radiosensibilité et l'arrêt en G_1/S n'a pu être réellement établie. Par contre, la durée de l'arrêt en G_2/M semble corrélée avec la

INTRODUCTION

radiosensibilité des cellules sachant que plus cet arrêt est long, plus les cellules sont radiorésistantes (Powell *et al.*, 1995; Russell *et al.*, 1995).

Après irradiation, plusieurs types de mort cellulaire ont été observés tels que la mort mitotique, la nécrose ou encore l'apoptose (Favaudon, 2000). Ce dernier type de mort reste le plus largement étudié. Plusieurs voies d'induction de l'apoptose radio-induite ont été décrites telles que la voie activant la protéine P53 après reconnaissance des cassures double-brin, ou encore la voie des céramides (Favaudon, 2000).

1.3. Conclusion

Les traitements par 5FU et par radiations ionisantes sont des stress génotoxiques puisqu'ils induisent tous deux des dommages de l'ADN. Ces deux traitements entraînent des arrêts du cycle cellulaire afin de laisser le temps aux cellules de mettre en place des mécanismes de réparation.

En clinique, il est empiriquement admis qu'une tumeur chimiorésistante est également radiorésistante. Cependant, peu d'études ont pu mettre en évidence une telle corrélation *in vitro* entre la radio- et la chimiosensibilité de lignées cellulaires (Kelland et Tonkin, 1989). Ainsi, pour une même lignée cellulaire, différents types de stress génotoxique peuvent entraîner des mécanismes moléculaires et des comportements cellulaires différents.

CHAPITRE 2

P53

2. P53

Le facteur de transcription P53 a été décrit pour la première fois il y a plus de 20 ans. Depuis, cette protéine a fait l'objet de nombreuses études à cause de son implication dans divers processus biologiques tels que :

- les blocages des cellules dans le cycle cellulaire,
- les réparations des lésions de l'ADN,
- la mise en place de l'apoptose,
- et la différenciation cellulaire.

2.1. Structure de la protéine P53

P53 est une phosphoprotéine de 53 kDa composée de 393 acides aminés. Cette protéine a une structure typique d'un facteur de transcription :

- une région amino-terminale contenant les domaines majeurs (résidus 1 à 42) et mineurs (résidus 45 à 66) de transactivation,
- une région centrale contenant un domaine de fixation spécifique à l'ADN (résidus 98 à 296),
- une région carboxy-terminale contenant les motifs essentiels à la tétramérisation (résidus 364 à 393), à la localisation nucléaire ou cytoplasmique de la protéine, ainsi qu'à la fixation non-spécifique au niveau de lésions de l'ADN.

Sous sa forme latente, P53 est instable et inactive car la partie carboxy-terminale se replie sur le domaine de liaison à l'ADN et empêche ainsi la fixation spécifique de P53 sur l'ADN et la transactivation des gènes cibles. Au niveau latent, P53 est sous forme de monomère, alors que c'est sous forme de tétramère que P53 est active. Une fois activée, P53 change de

conformation et présente ainsi une affinité plus importante pour les séquences cibles de l'ADN (Hainaut et Hollstein, 2000).

2.2. Régulation de P53

2.2.1. Transcriptionnelle

Les variations de taux de transcrits du gène p53 jouent un rôle mineur dans l'induction de la protéine après un stress. Par conséquent, la régulation transcriptionnelle de p53 a attiré peu d'attention ces dernières années. Il semblerait que la transcription de p53 soit induite par c-Myc (Reisman *et al.*, 1993). La présence d'une importante quantité de transcrits p53 assure une réponse rapide et efficace suite à une stimulation, entraînant une augmentation de la concentration en protéines P53.

2.2.2. Traductionnelle

La traduction du transcrit p53 est directement régulée par son produit. Ainsi, la protéine P53 forme une boucle de rétrocontrôle négatif en se fixant de façon spécifique sur son ARNm (Mosner *et al.*, 1995). D'autre part, la traduction de l'ARNm de p53 peut être inhibée par l'enzyme la thymidylate synthase (TS) par complexation spécifique de celle-ci sur l'ARNm de p53 (Ju *et al.*, 1999).

2.2.3 Post-traductionnelle

Dans des conditions physiologiques normales, la protéine P53 n'est présente qu'en faible concentration dans la cellule en raison d'une demi-vie courte (environ 20 minutes). En réponse à différents stimuli tels que des agents génotoxiques, une déplétion en nucléotides, l'hypoxie, ou encore d'autres stress cellulaires, P53 est activée et accumulée puis transloquée dans le noyau où elle peut jouer son rôle de facteur de transcription (Giaccia et Kastan, 1998; Prives et Hall, 1999).

INTRODUCTION

Des modifications post-traductionnelles peuvent être des ubiquitinations, phosphorylations, déphosphorylations, acétylations, ou encore des O-glycosylations. Ces mécanismes peuvent intervenir à plusieurs niveaux et peuvent avoir différents rôles :

- le maintien d'un niveau constitutif faible et inactif (latent),
- l'accumulation et l'activation de P53 après un stress,
- et la régulation négative après un stress afin de retrouver un état latent.

2.2.3.1. Boucle d'autorégulation négative Mdm2/P53

La régulation par Mdm2 est un mécanisme clé dans le contrôle du taux intracellulaire de P53. Mdm2 se fixe sur la protéine P53 au niveau des résidus 17 à 22 (Kussie *et al.*, 1996), situés dans le domaine de transactivation en N-terminal (Lu et Levine, 1995; Thut *et al.*, 1995). Mdm2 inhibe ainsi la transcription induite par P53 (Thut *et al.*, 1997) et induit l'exportation de P53 du noyau vers le cytoplasme (Gu *et al.*, 2001; Tao et Levine, 1999). De plus, Mdm2 agit comme une E3-ubiquitine ligase sur P53 qui devient alors une cible de dégradation par le protéasome 26S.

D'autre part, P53 se fixe spécifiquement sur un promoteur du gène *mdm-2* situé dans le premier intron du gène (Juven *et al.*, 1993). Cette fixation induit la synthèse d'un transcrit codant principalement pour l'isoforme majeure (P90) de la protéine Mdm2 (Barak *et al.*, 1994). Cette isoforme est la protéine qui se lie à P53.

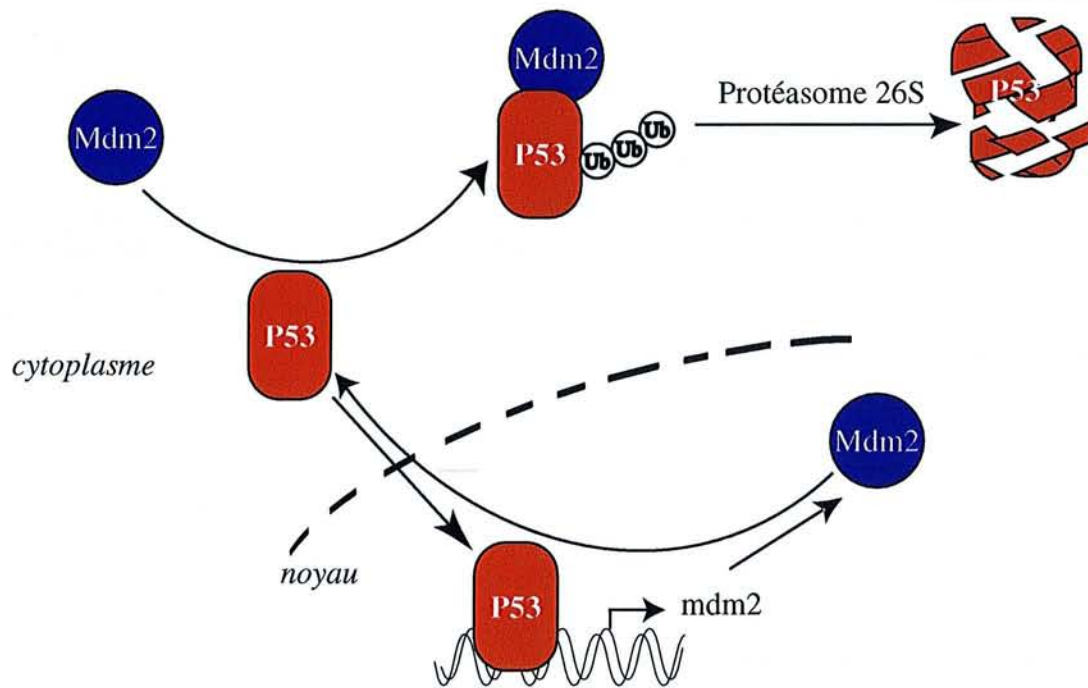


Figure 1 : Boucle de régulation négative P53 / Mdm2. Mdm-2 : Mouse Double Minute-2

L'activation de l'autre promoteur du gène *mdm-2*, localisé en amont du premier exon, induit la synthèse d'un transcrit codant principalement pour des isoformes de Mdm-2 (P76 et P74) incapables de se fixer sur P53. Ce promoteur est régulé par d'autres facteurs de transcription que P53.

Ainsi, Mdm-2 contrôle le taux constitutif et la durée d'activation de P53 (Wu *et al.*, 1993). Mdm2 est responsable de l'instabilité de P53 au niveau latent (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997) durant les phases S et G₂/M du cycle cellulaire.

2.2.3.2. Maintien du niveau constitutif de P53 par JNK

La protéine JNK (c-Jun N-terminal kinase) joue deux rôles distincts dans la régulation de P53. Lorsque cette kinase est inactive, elle inhibe l'activité transactivatrice de P53 en se fixant sur les résidus 97 à 116, situés dans le domaine N-terminal. Tout comme Mdm-2, JNK joue aussi le rôle de E3-ubiquitine ligase et transforme ainsi P53 en substrat du protéasome 26S.

Une fois activée, JNK phosphoryle P53. Sous cette forme phosphorylée, P53 perd alors son affinité pour JNK et Mdm2. Ainsi, en échappant à cette dégradation induite par ces deux facteurs, P53 est accumulée dans la cellule (Fuchs *et al.*, 1998b). La phosphorylation de P53 par la JNK, participe à l'activation de P53 (Buschmann *et al.*, 2001). JNK est activée par divers stimuli connus pour induire l'accumulation de P53, tels que les UV, les rayons X, ou encore le peroxyde d'hydrogène (Ip et Davis, 1998).

INTRODUCTION

La régulation du taux constitutif de P53 par JNK se fait préférentiellement durant les phases G₀/G₁ (Fuchs *et al.*, 1998a).

Ainsi, Mdm2 et JNK ont une action complémentaire dans le maintien du niveau constitutif de P53 durant le cycle cellulaire.

2.2.3.3. Phosphorylations

Les phosphorylations de P53 sont des phénomènes essentiels dans sa stabilisation et son activation après un stress. P53 peut être phosphorylée sur au moins 8 sites différents dans son domaine de transactivation N-terminal et sur au moins 5 sites dans le domaine de tétramérisation C-terminal (Appella et Anderson, 2000; Meek, 1998).

2.2.3.3.1. Phosphorylations au niveau de la région N-terminale

Le site de phosphorylation le plus décrit après des dommages de l'ADN est la sérine 15 située dans la région N-terminale de P53 (Shieh *et al.*, 1997; Siliciano *et al.*, 1997). Ce résidu est le substrat de plusieurs kinases telles que la DNA-PK ou encore ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998). Ainsi, les cassures de l'ADN activent la DNA-PK et la kinase ATM qui phosphorylent la sérine 15 de P53 (cf. paragraphe 2.3.1.1.).

Les cassures de l'ADN induisent la phosphorylation d'autres résidus de P53 tels que les sérines 33 et 37 (Sakaguchi *et al.*, 1998). Ces phosphorylations dans la région amino-terminale de P53, modifient la conformation tridimensionnelle de la totalité de la protéine. Cette modification affecte les fixations spécifiques de P53 sur d'autres protéines ou sur des séquences spécifiques de l'ADN. Par exemple, les phosphorylations par la DNA-PK diminuent l'affinité de liaison entre P53 et Mdm-2. Ce phénomène explique en partie l'accumulation de P53 suite à des cassures de l'ADN puisque Mdm-2 ne peut alors plus entraîner la dégradation de P53. Enfin, les phosphorylations au niveau des sérines 15 et 37 affectent également les interactions de P53 avec le facteur de transcription TFIID (Transcription Factor II D) (Pise-Masison *et al.*, 1998).

2.2.3.3.2. Phosphorylations au niveau de la région C-terminale

Les kinases phosphorylant P53 en C-terminal sont les kinases dépendantes du cycle cellulaire (cdc2 et cdk2), la protéine kinase C (PKC) et la caséine kinase-II (CK-II) (Pluquet et Hainaut, 2001). Le rôle de ces kinases, en réponse à un stress génotoxique, reste encore mal compris. La phosphorylation par la CK-II augmente l'affinité de P53 pour ses sites de fixation à

INTRODUCTION

l'ADN. De même la phosphorylation du résidu sérine-315 par la Cdk 2 stimule la liaison de P53 sur l'ADN (Wang et Prives, 1995).

En règle générale, les phosphorylations de P53 au niveau du domaine carboxy-terminal, contribuent à l'activation du rôle de facteur de transcription de P53.

2.2.3.4. Déphosphorylation

Les stress génotoxiques peuvent également induire la déphosphorylation du résidu sérine 376 de P53. Cette modification crée un site de fixation pour la protéine 14-3-3. L'association de ces deux protéines entraîne une augmentation de la fixation de P53 sur les sites spécifiques de l'ADN (Stavridi *et al.*, 2001; Waterman *et al.*, 1998). Ces phénomènes de déphosphorylation restent peu décrits.

2.2.3.5. Acétylation

La protéine P53 peut être acétylée dans sa région C-terminale, par deux molécules de la famille des HAT (Histone Acetyl Transferase) :

- CBP / P300 (CREB-Binding Protein)
- PCAF (P300 and CBP associated factor).

Ces deux protéines sont des co-activateurs de divers facteurs de transcription tels que P53 (Sakaguchi *et al.*, 1998). P300 acétyle P53 au niveau du résidu Lysine 382, et PCAF au niveau de la Lysine 320. Ces acétylations, induites par des stress génotoxiques tels que des radiations ionisantes ou des UV, contribuent à l'augmentation de la fixation de P53 sur l'ADN (Kishi *et al.*, 2001; Vousden, 2002).

Lorsque P53 n'est pas acétylée, sa région carboxy-terminale interagit avec le domaine de reconnaissance de l'ADN, inhibant l'activité P53. Par contre, après acétylation de P53, ces interactions n'existent plus et le domaine de liaison à l'ADN est alors disponible. P53 a ainsi une conformation active (Sakaguchi *et al.*, 1998).

2.2.3.6. O-glycosylation

La O-glycosylation de P53 semble contribuer à son activation cependant, ce phénomène reste peu décrit actuellement (Shaw *et al.*, 1996).

2.2.3.7. Localisation subcellulaire

Malgré la présence d'une séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence) (Liang et Clarke, 1999), la localisation préférentielle de P53 est cytoplasmique grâce à la séquence NES

(Nuclear Export Signal) qui transloque la protéine du noyau vers le cytoplasme (Freedman et Levine, 1998; Stommel *et al.*, 1999). L'association de P53 avec Mdm-2 participe aussi à la localisation cytoplasmique puisque Mdm-2 possède aussi une séquence NES. De plus, Mdm-2 peut également induire la sortie de P53 du noyau vers le cytoplasme en ubiquitinant P53 au niveau du domaine C-terminal (Lohrum *et al.*, 2001).

La séquence NES de P53 est située dans le domaine C-terminal de tétramérisation. Ainsi, l'activation de P53 induit sa dissociation avec Mdm-2, son passage dans le noyau et sa tétramérisation. Sous cette forme, la séquence NES est alors masquée et P53 reste localisée dans le noyau où elle peut activer la transcription des gènes cibles (Stommel *et al.*, 1999). Une étude récente a également décrit que la protéine P300 participe au maintien de P53 dans le noyau *via* un mécanisme indépendant de l'acétylation (Kawai *et al.*, 2001).

2.3. Fonctions et modes d'action de P53

P53 est un facteur de transcription ainsi, la majorité de ses fonctions passent par l'induction ou la répression de la transcription de nombreux gènes cibles. Ces fixations ont différentes affinités selon les séquences de liaison. P53 peut aussi réprimer la transcription de gènes *via* des interactions avec d'autres protéines de la machinerie transcriptionnelle telles que la TBP (TATA-binding protein) et la CBF (CCAAT-binding factor) (Agoff *et al.*, 1993; Seto *et al.*, 1992). En séquestrant ces co-activateurs transcriptionnels, P53 bloque l'activité d'autres facteurs de transcription.

2.3.1. Induction de P53

L'induction de P53 se fait en deux étapes :

- une stabilisation permettant son accumulation,
- et une activation permettant sa fixation sur les promoteurs des gènes cibles.

Selon les stimuli, l'induction de P53 se fait plus ou moins rapidement. Ainsi, cette induction est observée 2 à 4 heures après des rayons γ , et seulement 12 à 24 heures après exposition à du benzo(a)pyrène (Pluquet et Hainaut, 2001).

P53 peut être induite par des stress génotoxiques (irradiation, drogues cytotoxiques, stress oxydatif...) ou non génotoxiques (hypoxie, déplétion de ribonucléotides, cytokines...). Ces derniers emprunteront une voie de signalisation indépendante des lésions de l'ADN.

Les irradiations et le 5FU sont des traitements génotoxiques. Nous allons donc développer cette voie d'activation de P53.

INTRODUCTION

Les stress génotoxiques peuvent entraîner des cassures simple-brin, des cassures double-brin ainsi que des insertions ou des délétions de séquences d'ADN.

2.3.1.1. Les cassures double-brin

Ces cassures sont à l'origine d'une voie d'activation de P53 *via* des protéines kinases de la famille PI3-K (Phosphatidyl Inositol-3-kinase). Parmi celles-ci, les protéines ATM, ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related/FRAP related protein) et DNA-PK (DNA-activated Protein Kinase) ont été largement décrites ces dernières années.

Avant la réparation de ces cassures, la cellule a besoin de les détecter. Les complexes DNA-PK et ATM permettent cette reconnaissance par leur capacité à se fixer aux extrémités libres de l'ADN.

2.3.1.1.1. La DNA-PK

Le complexe DNA-PK est composé de trois sous-unités : - Ku70

- Ku80

- DNA-PKcs

Les deux premières sous-unités permettent la détection des cassures double-brin en se fixant sur ces extrémités d'ADN sans spécificité de séquence. Une fois fixées, Ku70 et Ku80 activent la sous-unité catalytique DNA-PKcs (Jin *et al.*, 1997). Celle-ci peut alors phosphoryler des protéines cibles telles que P53 ou des molécules intervenant dans la réparation. La DNA-PK a également la capacité de phosphoryler la protéine Mdm-2 afin de réduire la régulation négative qu'exerce celle-ci sur P53 (Mayo *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997).

2.3.1.1.2. ATM

La protéine ATM est également capable de se fixer au niveau des cassures double-brin. Cette fixation induit son activité kinasique (Suzuki *et al.*, 1999). Cependant, à la différence des autres protéines de la famille des PI3-K, ATM semble être impliquée uniquement au niveau des cassures double-brin radio-induites. ATM activée phosphoryle P53 au niveau du résidu sérine 15 (Banin *et al.*, 1998; Siliciano *et al.*, 1997). Tout comme la DNA-PK, ATM peut phosphoryler Mdm-2 afin d'inhiber son action de dégradation de P53 (Khosravi *et al.*, 1999). Ainsi, ATM participe à l'accumulation et à l'activation de P53 après un stress génotoxique.

2.3.1.1.3. ATR

Tout comme les kinases ATM et DNA-PK, ATR phosphoryle P53 au niveau du résidu sérine 15 en réponse à des dommages de l'ADN (Tibbetts *et al.*, 1999). Il semble que cette phosphorylation par ATM et ATR soit complémentaire par leur séquentialité temporelle. Ainsi, ATM serait la première à phosphoryler, puis ATR prendrait le relais.

L'ensemble de ces membres de la famille PI3-K participe activement à l'accumulation et à l'activation de P53 en réponse à des cassures double-brin de l'ADN.

2.3.1.2. Cassures simple-brin et insertions ou délétions de séquences

Le domaine C-terminal de P53 présente une grande affinité pour ce type de structure (Lee *et al.*, 1995). P53 se fixe alors au niveau de ces régions endommagées et interagit avec les composants de la machinerie de réparation par excision des nucléotides (Drapkin *et al.*, 1994). Cette interaction peut avoir un rôle de recrutement de la machinerie de réparation si les composants de celle-ci sont éloignés.

2.3.2. Arrêts dans le cycle

En réponse à un stress, les cellules font une pause dans le cycle cellulaire en G₁/S et/ou en G₂/M. Ces arrêts peuvent être dépendants de P53 *via* l'activation de la transcription de certains gènes, ou *via* des interactions directes avec des protéines cellulaires.

2.3.2.1. Arrêt en G₁/S

P53 peut induire l'arrêt des cellules en G₁/S par deux mécanismes :

- par induction de l'expression des gènes codant pour P21 et Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage type 45 gene)
- et par interaction avec des protéines de la machinerie de réplication.

La transition de la phase G₁ à la phase S du cycle cellulaire est dépendante du complexe cycline E / Cdk-2 (Cyclin Dependent Kinase). Dans un état non stressé, la complexation de ces deux protéines se réalise en fin de phase G₁, et induit l'activité kinasique de Cdk-2. Celle-ci phosphoryle alors la protéine Rb (RetinoBlastoma protein) complexée au facteur de transcription E₂F (Elongation 2 Factor). Rb phosphorylée perd son affinité pour E₂F. Ce dernier se fixe alors sur des promoteurs de façon spécifique et induit la transcription de gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN. Les cellules entrent alors en phase S.

INTRODUCTION

Suite à des dommages de l'ADN, l'accumulation de P53 a pour conséquence l'induction de l'expression de la protéine P21 (el-Deiry *et al.*, 1994; el-Deiry *et al.*, 1993). Celle-ci est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (Xiong *et al.*, 1993). En inhibant l'activation de la Cdk-2, P21 empêche les cellules de passer de la phase G1 à la phase S (Figure 2).

De plus, cette protéine P21 (Flores-Rozas *et al.*, 1994; Waga *et al.*, 1994) ainsi que le produit du gène Gadd45 (Smith *et al.*, 1994a), également induit par P53, peut interagir avec le PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Dotto, 2000) (Figure 2). Ces interactions arrêtent les fourches de réplication et inhibent ainsi la synthèse de l'ADN.

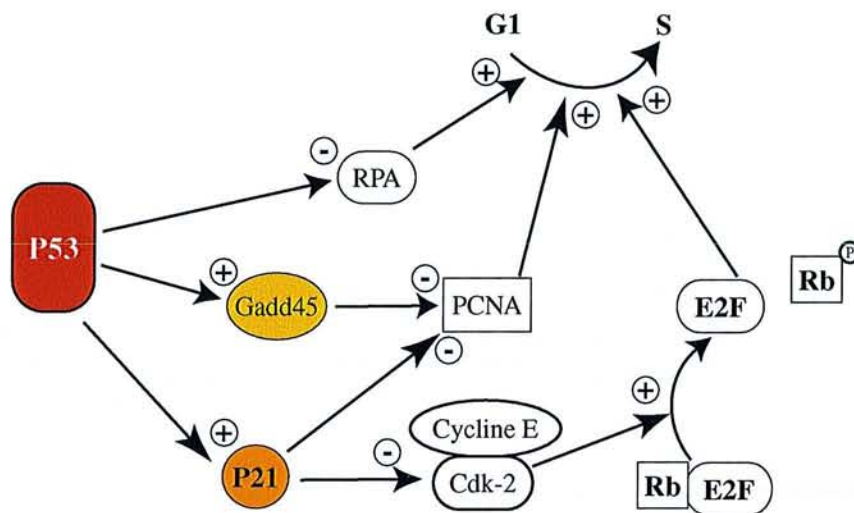


Figure 2 : Arrêt en G₁/S induit par P53. Cdk-2 : Cyclin Dependent Kinase-2 ; E₂F : Elongation 2 Factor ; Gadd45 : Growth Arrest and DNA Damage type 45 gene ; PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen ; RPA : Replication Protein A ; Rb : RetinoBlastoma protein.

Enfin, P53 peut agir directement sur la protéine RPA (Replication Protein A). Celle-ci appartient également à la machinerie de réplication et a pour fonction de se fixer à l'ADN simple brin afin de synthétiser le brin complémentaire durant la réplication. La fixation de P53 inhibe cette fonction (Dutta *et al.*, 1993) (Figure 2).

2.3.2.2. Arrêt en G₂/M

L'implication de P53 dans la mise en place du blocage en G₂/M a fait l'objet de nombreuses études souvent controversées puisque, des cellules exprimant une P53 non fonctionnelle, peuvent également subir un arrêt en G₂/M après une irradiation. En effet, des mécanismes moléculaires indépendants de P53 peuvent induire cet arrêt après des lésions de l'ADN (Liu *et al.*, 2000a; Matsuoka *et al.*, 2000). De plus, certains auteurs pensent que P53 induirait ce blocage, et d'autres qu'il faciliterait la levée de ce blocage (Guillouf *et al.*, 1995). Le rôle de

INTRODUCTION

P53 dans ce blocage semble dépendant à la fois du type cellulaire et de la nature du stress subit par la cellule.

Le passage des cellules de la phase G₂ à la phase M est sous le contrôle du complexe cycline B1 / Cdc-2 (Cell Division Cycle 2). La kinase Cdc-2 appartient à la famille des Cdk (Cyclin Dependent Kinase). Suite à l'accumulation de P53, Cdc-2 est inhibée simultanément par trois protéines dont la transcription est induite par P53 :

- Gadd45 (Hollander *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999c),
- P21 (Boulaire *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2000),
- 14-3-3 σ (Hermeking *et al.*, 1997) (Figure 3).

Cette protéine 14-3-3 σ se lie au complexe cycline B1/Cdc-2 et le séquestre dans le cytoplasme (Hermeking *et al.*, 1997). L'inhibition de la kinase Cdc-2 induit alors l'arrêt des cellules en G₂/M.

De plus, P53 elle-même peut inhiber la complexation de la cycline B1 avec la Cdc-2 en se fixant directement sur la cycline B. Or, Cdc-2 ne peut pas être activée si elle n'est pas complexée à sa cycline. L'activation du complexe cycline B1/Cdc-2 nécessite la phosphorylation de Cdc-2 en position thréonine 161 ainsi que la déphosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 (Coleman et Dunphy, 1994; Pines, 1994). Une fois activé, le complexe cycline B1/Cdc-2 permet le passage des cellules de la phase G₂ vers la phase M en phosphorylant de nombreux substrats dont l'histone H1 (Mercer, 1998).

P53 peut également inhiber l'expression des gènes codant pour la Cdc-2 et la Topoisomérase II, ce qui a pour conséquence de bloquer l'entrée des cellules en mitose.

Récemment, les gènes *reprim* (Ohki *et al.*, 2000), *B99* (Utrera *et al.*, 1998) et *mcg10* (Zhu et Chen, 2000) ont été mis en évidence comme étant induits par P53 et comme intervenant dans l'arrêt des cellules en G₂. (Figure 3).

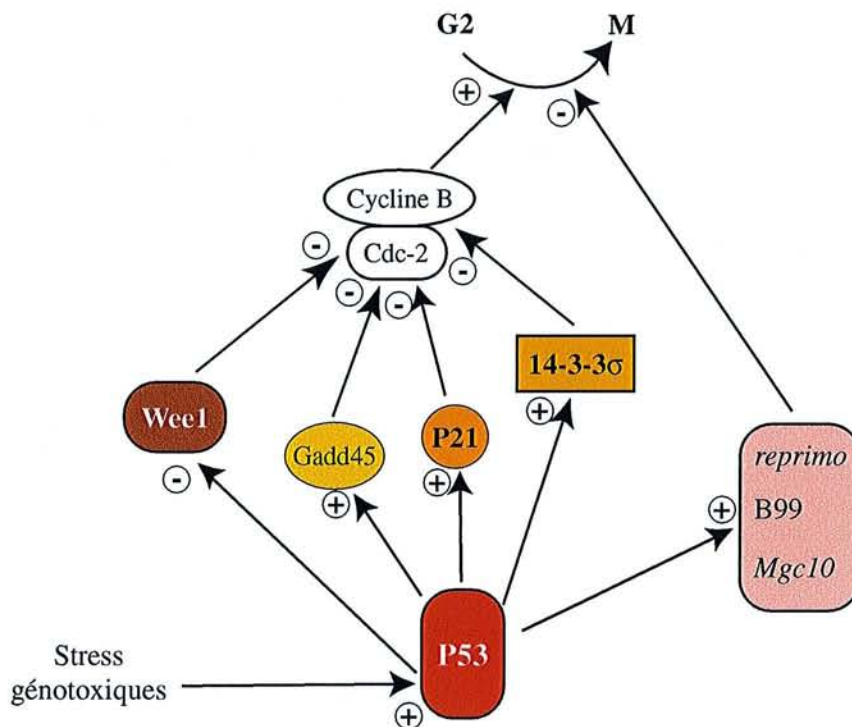


Figure 3 : Mise en place ou sortie du blocage en G₂/M. par P53. Cdc-2 : Cell Division Cycle-2 ; Gadd45 : Growth Arrest and DNA Damage type 45 gene

D'un autre côté, en réprimant l'expression du gène *wee1*, P53 induit la sortie des cellules de la phase G₂ (Ceraline *et al.*, 1998). La protéine Wee1 est responsable de la phosphorylation inhibitrice de la kinase Cdc-2 en position tyrosine 15 (Parker *et al.*, 1991; Russell et Nurse, 1987). Ainsi, en son absence, le complexe cycline B1/Cdc-2 est activé et les cellules passent le point de contrôle G₂/M (Leach *et al.*, 1998) (Figure 3).

Ces arrêts permettent à la cellule de mettre en place sa machinerie de réparation ou, si les dégâts sont trop importants, de déclencher la mort par apoptose.

2.3.3. Réparation de l'ADN (maintien de l'intégrité du génome)

P53 module l'activité des facteurs PCNA, RPA, XPB et XPD impliqués dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (He *et al.*, 1995; Shivji *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995). P53 participe également à la réparation par excision de bases (Offer *et al.*, 1999) et peut interagir avec la protéine Rad51 (Sturzbecher *et al.*, 1996). Cette interaction induit la réparation de l'ADN par recombinaison (Buchhop *et al.*, 1997).

P53 induit également la réparation par complémentarité des cassures simple-brin de l'ADN et de l'ARN (Oberosler *et al.*, 1993). C'est la partie C-terminale (des résidus 311 à 393) qui induit cette ré-association des coupures simple-brin (Wu *et al.*, 1995).

INTRODUCTION

De plus, P53 reconnaît elle-même les lésions de l'ADN en se fixant sur les extrémités libres des coupures double-brin ou au niveau des nucléotides manquant des coupures simple-brin.

P53 aurait donc un rôle inducteur dans différentes voies de la réparation des dommages de l'ADN, *via* une action directe avec ces lésions, et *via* des interactions activatrices avec des protéines de la machinerie de réparation.

2.3.4. Induction de l'apoptose

Le phénomène d'apoptose est la mort programmée de la cellule. Suite à des stimuli, tels que des agents génotoxiques, les cellules trop endommagées vont mourir par apoptose.

La régulation de l'apoptose semble être très complexe. De nombreuses voies moléculaires ayant un rôle pro- ou anti-apoptotique, ont été décrites durant ces quinze dernières années. Ces voies forment une balance entre la mort et la durée de vie de la cellule. Le déclenchement de la mort par apoptose reste elle aussi très complexe et encore mal connue. Ce processus de mis en place de l'apoptose peut être résumé en 3 étapes :

- une étape d'initiation : de nombreux signaux peuvent induire cette première étape comme les irradiations, le 5FU, ou encore une carence en substances nécessaires à la croissance cellulaire.

- une étape d'exécution : de nombreuses cascades moléculaires interviennent dans cette étape ; ce sont les voies moléculaires apoptotiques de la cellule.

- une étape de dégradation : l'ensemble des voies moléculaires aboutissent à l'activation d'enzymes protéolytiques nommées caspases. En effet, dans presque toutes les cellules, le programme apoptotique est exécuté par des protéases à cystéines appelées « caspases ». A partir de cette étape, la cellule est engagée irréversiblement dans le programme de mort cellulaire et va présenter les caractéristiques morphologiques (condensation de la chromatine, déformation de la membrane cellulaire, formation de corps apoptotiques) et moléculaires (dégradation protéique, fragmentation de l'ADN) de l'apoptose.

De nombreuses voies moléculaires convergent vers l'ouverture du pore mitochondrial. Celui-ci reste fermé durant la vie de la cellule. Suite à divers stimuli, les protéines formant ce pore changent de conformation et le pore s'ouvre (Zoratti et Szabo, 1995). Cette ouverture entraîne la rupture du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) par sortie des protons de la mitochondrie vers le cytoplasme. Ce phénomène provoque également la libération de caspases 2, 3 et 9, du cytochrome c (Liu *et al.*, 1996) et de l'AIF (Apoptosis Inducing factor)

INTRODUCTION

(Susin *et al.*, 1997; Susin *et al.*, 1996). Le cytochrome c induit l'activation de l'Apaf1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) (Zou *et al.*, 1997). Celui-ci peut alors activer à son tour la pro-caspase-9 en caspase-9 en se fixant au niveau du domaine CARD (Caspases Recruitment Domain) (Li *et al.*, 1997). L'activation de la caspase 9 aboutit à l'activation en chaîne des caspases (Li *et al.*, 1997; Salvesen et Dixit, 1997), provoquant le clivage ou l'activation des protéines régulant la morphologie, le cycle cellulaire et la fragmentation de l'ADN. L'ensemble de ces phénomènes aboutit à la mort cellulaire.

L'AIF a un effet direct sur les noyaux isolés, induisant la condensation chromatidienne à la périphérie des noyaux (Susin *et al.*, 1999), première étape morphologique de la mise en place de l'apoptose.

P53 est capable d'induire l'apoptose de la cellule par une action sur la transcription de gènes cibles ou par d'autres mécanismes.

2.3.4.1. Apoptose induite par P53 *via* une régulation transcriptionnelle de gènes cibles.

P53 peut activer ou réprimer la transcription d'un grand nombre de gènes dont les produits sont impliqués dans la mise en place de l'apoptose.

2.3.4.1.1. Bax/Bcl2

Les protéines Bax et Bcl2 agissent au niveau du pore mitochondrial. Ces protéines peuvent s'homo- ou s'hétérodimériser selon leur quantité respective dans la cellule. On parle ainsi de balance Bax/Bcl2. En effet, si Bcl2 est sur-exprimée, il y aura formation d'homodimères Bcl2/Bcl2. Au contraire, si Bax est sur-exprimée, il y aura formation de complexes Bax/Bax, et si la quantité de chaque protéine est équivalente, il y aura majoritairement des hétérodimères Bax/Bcl2 dans la cellule.

Etant donné que les complexes Bcl2/Bcl2 et Bax/Bcl2 maintiennent le pore fermé alors que le complexe Bax/Bax induit son ouverture, il faudra une sur-expression de Bax pour entraîner l'apoptose.

P53, en tant que facteur de transcription, induit l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (Miyashita *et al.*, 1994b; Selvakumaran *et al.*, 1994) et réprime l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Miyashita *et al.*, 1994a) (Figure 4).

2.3.4.1.2. Fas/Apo-1/CD95

P53 induit l'expression du gène Fas/Apo-1/CD95, codant pour un membre de la super famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) (Owen-Schaub *et al.*, 1995). Après fixation du ligand, ce récepteur transmet un signal apoptotique (Nagata et Golstein, 1995). La transmission de ce signal se fait grâce à la protéine FADD (Fas-Associated Death Domain) (Chinnaiyan *et al.*, 1996). Par son domaine DED (Death Effector Domain), FADD active directement les caspases 8 et 10 (Cohen, 1997; Muzio *et al.*, 1996) (Figure 4).

2.3.4.1.3. IGF-BP3

P53 induit la transcription du gène codant pour IGF-BP3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3). Le produit de ce gène peut inhiber à la fois l'activité mitogénique et anti-apoptotique de IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) par séquestration (Buckbinder *et al.*, 1995) (Figure 4).

2.3.4.1.4. KILLER/DR5

P53 régule positivement l'expression du gène KILLER/DR5, codant pour un récepteur membranaire ayant une forte homologie avec le récepteur au TNF (Sheridan *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997). Ce récepteur est activé par son ligand TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), et déclenche alors une cascade d'évènements moléculaires aboutissant à l'activation de caspases, dernière étape dans la mise en place de l'apoptose. L'apoptose induite par la voie KILLER/DR5 peut être dépendante ou indépendante de P53 selon l'origine du stress pro-apoptotique (Sheikh *et al.*, 1998) (Figure 4).

2.3.4.1.5. PAG608

Les transcrits PAG608 sont induits après des lésions de l'ADN de façon P53-dépendante (Hermann *et al.*, 2001). La protéine PAG608 est une protéine en doigt de zinc localisée préférentiellement au niveau du noyau. La sur-expression de cette protéine entraîne des modifications morphologiques du noyau cellulaire, provoquant la mort cellulaire par apoptose (Israeli *et al.*, 1997) (Figure 4).

2.3.4.1.6. P53AIP1

L'expression du gène p53AIP1 (p53-regulated Apoptosis Inducing protein 1) est induite par P53 phosphorylée en position 46. La protéine P53AIP1 est localisée dans la mitochondrie et induit l'apoptose *via* la rupture du potentiel mitochondrial ($\Delta\psi_m$).

INTRODUCTION

Cette protéine reste encore peu étudiée, mais semble jouer un rôle important dans la mise en place de l'apoptose P53 dépendante suite à des dommages de l'ADN (Oda *et al.*, 2000b) (Figure 4).

2.3.4.1.7. Autres gènes induits par P53

Plusieurs protéines, dont la transcription de leurs gènes est induite par P53, ont été récemment décrites comme étant impliquées dans la mise en place de l'apoptose (Figure 4) :

- La protéine PERP, située au niveau de la membrane plasmique entraîne l'apoptose des fibroblastes (Attardi *et al.*, 2000).

- La protéine Noxa est localisée au niveau de la mitochondrie et interagit avec des protéines de la famille Bcl2 ayant un rôle anti-apoptotique. Ces interactions induisent l'activation de la caspase 9 et ainsi, la mise en place de l'apoptose (Oda *et al.*, 2000a).

- La sur-expression de la protéine Pidd inhibe la croissance cellulaire en induisant l'apoptose (Lin *et al.*, 2000).

- La protéine DRAL est exprimée dans les cellules du rhabdomyosarcome (Scholl *et al.*, 2000), et semble induire l'apoptose.

L'ensemble de ces protéines sont induites par P53, et leur mode d'action dans la mise en place de l'apoptose reste actuellement non élucidée.

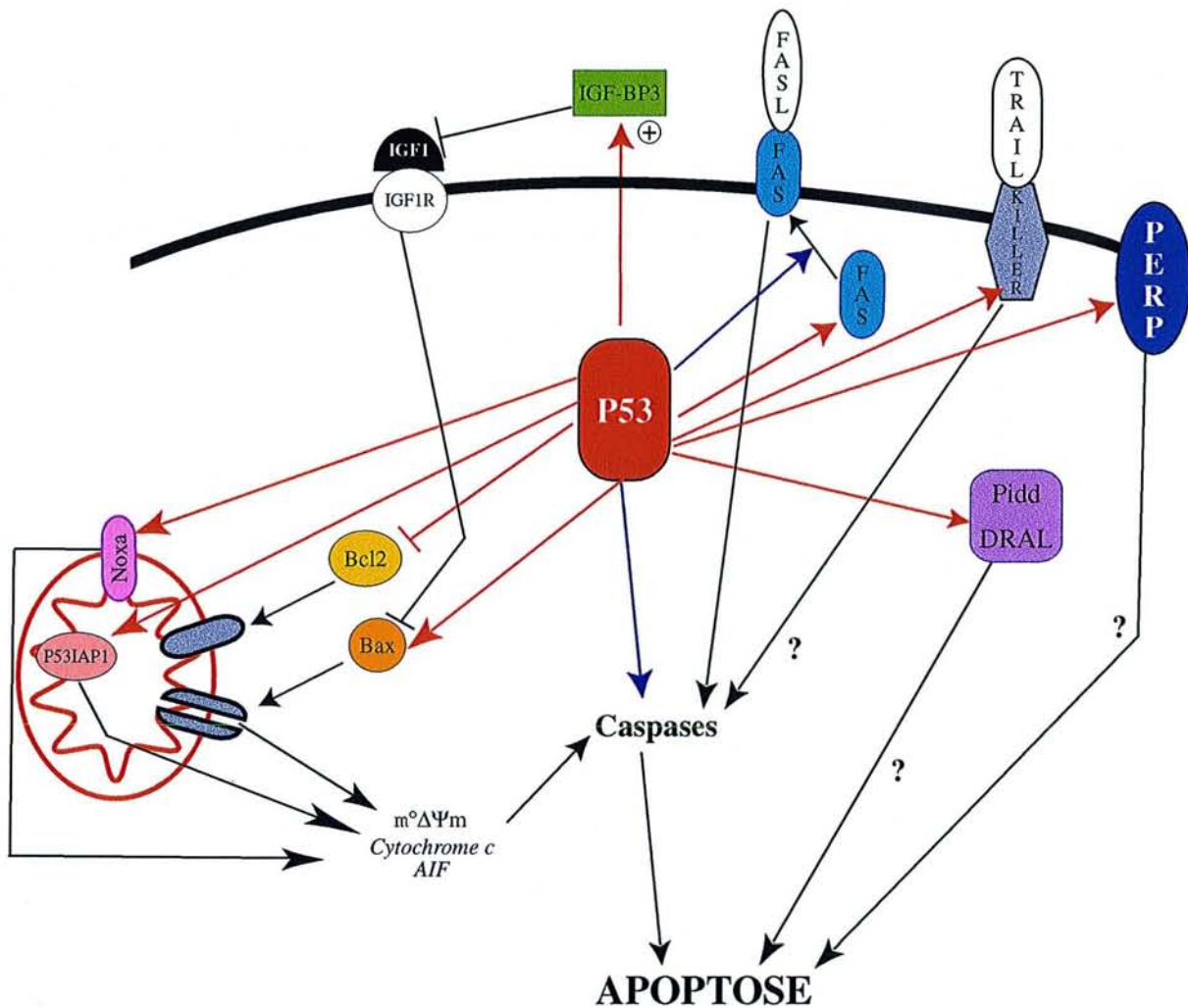


Figure 4 : Induction de l'apoptose par P53 *via* la transactivation de gènes cibles (↓) ou *via* d'autres mécanismes (↓). P53IAP1 : P53-Regulated apoptosis inducing protein-1 ; IGF : Insulin like Growth Factor ; IGFR : IGF Receptor ; IGF-BP3 : IGF Binding Protein-3.

2.3.4.2. Apoptose induite par P53 *via* d'autres mécanismes que l'induction transcriptionnelle

Dans certains types cellulaires soumis à un signal pro-apoptotique, une apoptose P53-dépendante a pu être observée en absence de transcription ou de synthèse protéique (Caelles *et al.*, 1994; Gao et Tsuchida, 1999; Wagner *et al.*, 1994). Il semble que des interactions avec d'autres protéines cellulaires telles que les hélicases XPB (Xeroderma Pigmentosum TFIIH DNA helicase B) et XPD (Xeroderma Pigmentosum TFIIH DNA helicase D), ou le complexe de réparation de l'ADN impliquant le TFIIH, soient indispensables à cette apoptose P53-dépendante (Wang *et al.*, 1996b).

P53 induit la transcription du gène codant pour Fas. P53 provoque également la translocation de ce récepteur au niveau de la membrane, lieu où il est fonctionnel (Bennett *et al.*, 1998) (Figure 4).

Afin d'induire l'apoptose, P53 interagit également avec la protéine Rb et inhibe ainsi son action anti-apoptotique et inductrice de la croissance cellulaire. Durant l'apoptose, cette protéine est clivée par des protéines de la famille des caspases. P53 favorise ce clivage en augmentant l'activité de ces enzymes (Gottlieb et Oren, 1998). Cette induction pourrait provenir d'interactions de type protéine-protéine faisant intervenir P53 et entraînant l'activation de la caspase 8 (Ding *et al.*, 2000) (Figure 4).

2.3.5. Différenciation

P53 est également associée à la différenciation de divers types cellulaires. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence que le taux intracellulaire de P53 augmente durant la différenciation des cellules hématopoïétiques (Ben-Dori *et al.*, 1983; Richon *et al.*, 1989; Shen *et al.*, 1983).

Le rôle de P53 dans la différenciation des cellules B a été très étudié (Johnson *et al.*, 1993; Shaulsky *et al.*, 1991). Ces études ont ainsi démontré que P53 est impliquée dans les différentes étapes de cette maturation, dont l'induction de l'expression de la chaîne μ des immunoglobulines, ainsi que l'expression de l'antigène B220. Celui-ci est un marqueur spécifique de la surface des cellules B (Almog et Rotter, 1997).

P53 participe également à la différenciation d'autres types cellulaires tels que les cellules embryonnaires (Gottlieb *et al.*, 1997; Mora *et al.*, 1980; Schmid *et al.*, 1991) ou encore les spermatozoïdes (Schwartz *et al.*, 1993).

2.4. Perte de fonction de P53

La perte de fonction de P53 entraîne un dysfonctionnement au niveau des blocages dans le cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN, de la mise en place de l'apoptose et de la différenciation. Cette perte de fonction peut alors entraîner la cancérisation de la cellule. D'ailleurs, dans plus de 50 % des cancers humains, les tumeurs expriment une P53 mutée (Greenblatt *et al.*, 1994; Hollstein *et al.*, 1991). La prédominance de mutations de types faux sens dans le gène p53 laisse supposer que les protéines mutantes conservent des activités biologiques conférant un avantage sélectif aux cellules tumorales. Les sites de mutations ponctuelles sont nombreux dans le gène p53 et plusieurs points chauds mutationnels ont été décrits (Greenblatt *et al.*, 1994).

INTRODUCTION

Une perte de fonction de P53 peut également être observée dans des cellules, suite à une contamination par certains virus. La protéine E6 du virus du papillome humain (HPV) entraîne la dégradation de P53 (cf. paragraphe 3.1.6.1.) *via* un mécanisme dépendant de l'ubiquitine.

D'autre part, l'antigène grand T du virus SV40 inhibe l'activité transactivatrice de P53 en se fixant sur son domaine de fixation à l'ADN (Ruppert et Stillman, 1993).

La protéine adénovirale E1B-55 kDa se fixe sur P53 et réprime la transactivation de ses gènes cibles (Yew et Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). La protéine X de l'hépatite B (Truant *et al.*, 1995) et la protéine IE84 du cytomégalovirus humain (Kovacs *et al.*, 1996) empêchent la translocation nucléaire de P53 qui est alors accumulée dans le cytoplasme après un stimulus.

Ainsi, par des mutations du gène p53 qui atteignent la fonctionnalité de la protéine ou par des interactions directes avec des protéines telles que des protéines virales, P53 perd ou possède une fonctionnalité altérée. La cellule perd alors le "gardien de son génome".

2.5. Conclusion

P53 est souvent qualifiée de "gardien de l'intégrité du génome". Pour jouer ce rôle, P53 induit des blocages dans le cycle cellulaire après différents stress. Durant ces arrêts, les systèmes de réparation de l'ADN se mettent en place grâce à la participation de P53. Une fois ces réparations réalisées, les cellules reprennent leur cycle. Si les lésions sont trop importantes pour pouvoir être réparées, P53 induit alors la mort de la cellule par apoptose.

Ainsi, la perte de fonction de P53 peut être à l'origine du processus d'oncogénèse puisque la croissance cellulaire est alors favorisée, même en présence d'altérations du génome.

Cette perte de fonction a été associée à une forte radiorésistance pour certaines lignées cellulaires (Lee et Bernstein, 1993), mais également à une sensibilisation à certains traitements anticancéreux tels que la radiothérapie ou le 5FU pour d'autres types de cellules (Ceraline *et al.*, 1998; Hawkins *et al.*, 1996; Wahl *et al.*, 1996). P53 jouant un rôle central dans les mécanismes de réparation de l'ADN et de la mise en place de l'apoptose, participe également aux mécanismes de résistance ou de sensibilité cellulaire aux agents anticancéreux. Cependant, d'autres voies moléculaires indépendantes de P53, sont impliquées dans ces mécanismes et peuvent ainsi déclencher des phénomènes cellulaires P53-indépendants.

CHAPITRE 3

HPV

3. HPV

Le virus du papillome humain (HPV) peut être impliqué dans le développement de cancer de la peau, des voies génitales ainsi que du tractus oro-respiratoire. Les affections par ce type de virus chez les femmes sont associées à un facteur de risque important de développement d'un cancer du col de l'utérus. Le virus HPV est sexuellement transmissible.

A l'heure actuelle, plus de 100 types de virus HPV ont été recensés, mais seulement quelques uns sont associés à l'oncogénèse. Il est ainsi important de déterminer au niveau clinique, le type de virus HPV lors d'une infection afin de savoir si c'est un facteur de risque de cancérisation pour le patient. Les virus HPV peuvent ainsi être classés en deux familles : les HPV à faible risque (type 6 et 11), ou HPV à haut risque (type 16 et 18).

3.1. Organisation du génome de HPV

HPV est un virus circulaire à ADN double brin d'environ 8 kb. Son génome contient des gènes codant pour des protéines impliquées dans la prolifération et la différenciation de la cellule hôte, ainsi que pour des protéines de structure formant la capsule virale.

Le génome HPV peut être subdivisé en 3 régions différentes (Figure 5) :

- La première, d'environ 1 kb, est nommée URR (Upstream Regulatory Region). Cette région contient les promoteurs de la transcription virale (Cripe *et al.*, 1990; Taniguchi *et al.*, 1993).

- La seconde région contient la séquence codante pour les gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules infectées. Ces gènes codent pour les protéines E5, E6 et E7, qui pour certains types de HPV, peuvent contribuer à la transformation néoplastique de la cellule hôte.

INTRODUCTION

- Enfin, la troisième région du génome, contient les gènes codant pour les protéines L1 et L2 qui constituent la capsule du virion.

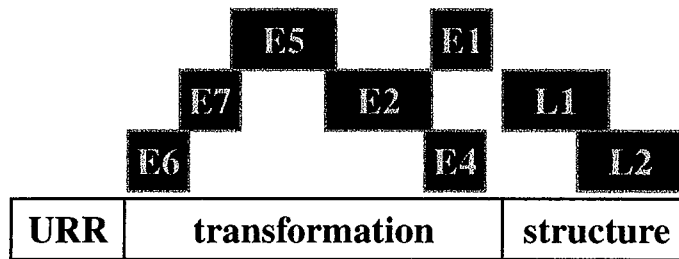


Figure 5 : Organisation du génome de HPV (McGlennen, 2000).

3.1.1. URR

Cette région contient les promoteurs qui vont réguler l'expression des gènes du génome viral. Ces séquences peuvent être reconnues par des protéines d'origine virale ou cellulaire qui régulent le type et la quantité d'ARN viral transcrit (Cripe *et al.*, 1990; Taniguchi *et al.*, 1993). Ainsi, il est probable que l'URR soit à l'origine de la spécificité de certains types d'HPV pour des épithéliums bien précis, par l'interaction avec des facteurs de transcriptions exprimés exclusivement dans ces cellules (Auborn *et al.*, 1989; Desaintes et Demeret, 1996; Taniguchi *et al.*, 1993).

3.1.2. E1

Cette protéine est un facteur de réplication de l'ADN viral. Elle se fixe de façon spécifique sur le site de l'origine de réplication (*ori*). De plus, E1 est impliquée dans la protection de l'épisome. Cependant, ses cibles au niveau moléculaire sont encore mal connues.

3.1.3. E2

La protéine E2 est un facteur de transcription qui joue un rôle central dans le cycle de la vie du papillomavirus en régulant à la fois la transcription et la réplication du génome viral (McBride *et al.*, 1991).

Cette protéine est constituée d'un domaine situé en N-terminal nécessaire à la transactivation, à la réplication et à l'association avec la protéine E1 (Benson et Howley, 1995), d'un domaine en C-terminal permettant la liaison spécifique à l'ADN ainsi que la dimérisation de la protéine (Androphy *et al.*, 1987; Dostatni *et al.*, 1988; McBride *et al.*, 1989). Entre ces deux domaines se situe une région riche en résidus prolines, appelée "région charnière", ayant une taille très

INTRODUCTION

variable et qui est faiblement conservée entre les différents types de HPV (Giri et Yaniv, 1988a). Par contre, pour l'ensemble des types de HPV, les domaines de transactivation, de liaison à l'ADN et de dimérisation ont des séquences très conservées (Giri et Yaniv, 1988b; McBride *et al.*, 1991).

E2 régule la transcription virale en se fixant sur des séquences palindromiques d'ADN présentes en quatre exemplaires au niveau de la région de régulation (URR) dans tous les papillomas virus (Ham *et al.*, 1991). Deux de ces quatre sites sont localisés à proximité de l'origine de réplication (Lu *et al.*, 1993; Remm *et al.*, 1992).

E2 agit aussi sur l'initiation de la réplication de l'ADN viral en interagissant avec la protéine E1 et des facteurs cellulaires de réplication (Chiang *et al.*, 1992; Del Vecchio *et al.*, 1992; Ustav et Stenlund, 1991). E1 a la particularité de se fixer de façon spécifique au niveau de l'*ori*. Etant donné que E2 peut se fixer sur des sites proches du site l'*ori*, son interaction avec E1 a pour conséquence d'augmenter la concentration locale de cette protéine au niveau de l'*ori* et ainsi de faciliter l'initiation de la réplication virale (Sedman et Stenlund, 1995, 1996).

A partir de ce mécanisme, l'équipe de Massimi a ainsi montré que P53 pouvait inhiber la réplication du génome viral en interagissant avec la protéine E2 et en empêchant ainsi la "mobilisation" de E1 au niveau de l'*ori* (Massimi *et al.*, 1999).

Dans le cas des virus HPV 16 et 18, les régions codantes pour les protéines E6 et E7 sont transcrites à partir d'un unique promoteur (p97). E2 réprime ce promoteur quand le génome viral est libre. L'intégration de l'ADN circulaire de HPV se fait régulièrement au niveau de la région codant pour E1/E2. Ainsi, après intégration du génome, l'expression de la protéine E2 est interrompue et le contrôle de la transcription de E6/E7 est dérégulée (Desaintes et Demeret, 1996; Dong *et al.*, 1994).

La protéine E2 pourrait aussi être impliquée dans la mise en place de l'apoptose ou de blocage en G₁/S de la cellule infectée en induisant, l'activité transcriptionnelle de P53 (Desaintes *et al.*, 1997). E2 active le facteur de transcription P53 par plusieurs voies différentes. Tout d'abord, en réprimant l'expression de la protéine E6 qui dégrade la protéine P53, mais également par une interaction directe sur la protéine P53 elle-même (Webster *et al.*, 2000). E2 pourrait aussi intervenir directement sur l'apoptose de façon P53-indépendante, *via* des facteurs encore indéterminés (Desaintes *et al.*, 1997) (Figure 6).

3.1.4. E4

Cette protéine est impliquée dans la déstabilisation de la structure de la cellule hôte par action sur les filaments intermédiaires. Cette déstabilisation facilite la libération du virion (Doorbar *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1997).

3.1.5. E5

Les études portant sur cette oncoprotéine ont été essentiellement réalisées à partir de HPV de type 16.

La protéine E5 est très hydrophobe et contient trois domaines transmembranaires. Cette protéine s'ancre dans la membrane cellulaire et n'a pas la capacité de se dimériser (Bubb *et al.*, 1988). E5 peut induire la transformation maligne des cellules en intervenant au niveau de trois mécanismes moléculaires différents : la voie moléculaire impliquant le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor, rEGF), le récepteur au PDGF (platelet-derived growth factor) et la MAP (mitogen-activated protein) kinase.

3.1.5.1. E5 et le récepteur à l'EGF

La transformation maligne par E5 nécessite l'expression du récepteur à l'EGF par les cellules (Leechanachai *et al.*, 1992; Pim *et al.*, 1992). E5 a une action synergique avec l'EGF. De plus, E5 est capable d'inhiber la dégradation du récepteur à l'EGF. En fait, après fixation par son ligand, le récepteur EGF (rEGF) est endocyté dans des vésicules intracellulaires. Ces endosomes vont être rapidement acidifiés par des canaux à proton ATP-dépendant et ainsi, les récepteurs seront dégradés.

Lorsque la protéine E5 est exprimée, le temps de mise en place de l'acidification de ces endosomes peut être augmenté 4 fois (Straight *et al.*, 1995). En fait, E5 peut se fixer sur la sous unité 216 kD du canal à protons situé sur la membrane de l'endosome. Ainsi, l'acidification est fortement ralentie et la dégradation du rEGF retardée (Straight *et al.*, 1995). Etant donné que le rEGF, activé par son ligand, active la cascade de signalisation de la voie ras/MAP kinase, qui régule la croissance et la différenciation cellulaire, une activation prolongée de ce récepteur par la présence de E5, peut transformer la cellule hôte en cellule cancéreuse.

3.1.5.2. E5 et le récepteur au PDGF

E5 a également la capacité à se complexer avec le récepteur au PDGF par des interactions au niveau de domaines hydrophobes, c'est à dire, au niveau transmembranaire (Goldstein *et al.*,

INTRODUCTION

1992). Par cette interaction, E5 entraîne l'activation du récepteur par une voie différente de celle du PDGF (Meyer *et al.*, 1994; Petti *et al.*, 1997).

3.1.5.3. E5 et le contrôle du cycle cellulaire

La voie de transduction du signal de la MAP kinase est induite par des facteurs de croissance et de différenciation. E5 est capable d'activer, seul ou en présence de l'EGF, l'activité de la MAP kinase. Cette activation a pour conséquence de stimuler la croissance des cellules.

D'un autre côté, il a été décrit, pour des fibroblastes ou des kératinocytes contaminés par un virus HPV de type 11 ou 16, que E5 inhibe l'expression du gène p21. E5 agit directement sur le promoteur du gène p21 et inhibe la transcription de ce dernier. Cette action de E5 a pour conséquence d'activer la croissance des cellules par inhibition de l'arrêt en G₁/S (Tsao *et al.*, 1996).

3.1.6. E6

La protéine virale E6 est un polypeptide composé d'environ 150 acides aminés ayant une masse moléculaire d'environ 18 kDa. Les différents types de protéines E6 possèdent quatre motifs CXXC qui permettent la formation de deux structures en doigt de zinc (Cole et Danos, 1987; Grossman et Laimins, 1989). Ces motifs sont très bien conservés, quelque soit le type de virus HPV, et l'ablation d'un d'entre eux entraîne la perte de fonctionnalité de la protéine (Kanda *et al.*, 1991; Sherman et Schlegel, 1996).

La principale action de la protéine E6 est l'induction de la dégradation de la protéine cellulaire P53. Quelques études ont également montré son implication dans le cycle cellulaire *via* des mécanismes indépendants de P53.

3.1.6.1. Dégradation de P53 induite par E6

Dans les premières études concernant la protéine P53, il a été mis en évidence des associations de cette protéine avec des protéines virales telle que l'antigène T codée par le virus SV40 (Lane et Crawford, 1979; Linzer et Levine, 1979) ou encore la protéine 55 kD de l'adénovirus E1B (Sarnow *et al.*, 1982). Ces interactions entraînent la formation de complexes stables entre les protéines virales et P53. Par contre, les premières tentatives de détection de P53 dans des lignées cellulaires transformées par HPV ont toutes échouées, malgré la présence d'une grande quantité d'ARNm de p53 dans les cellules (Band *et al.*, 1991; Matlashewski *et al.*, 1986). Ces résultats suggèrent, soit une inhibition de la traduction de ces ARNm, soit une augmentation du "turnover" de la protéine P53 dans les cellules infectées par

INTRODUCTION

HPV. Des études *in vitro* ont démontré que la seconde hypothèse était la plus probable en analysant les interactions entre E6 et P53. Ainsi, l'équipe de Howley en 1990 (Scheffner *et al.*, 1990; Werness *et al.*, 1990), a montré que les protéines E6 des HPV de type 16 et 18 peuvent se fixer à P53 et que cette fixation entraîne la dégradation de P53 *via* une voie ubiquitine dépendante. Les études suivantes ont montré que la dégradation de P53 *via* E6 nécessite l'implication d'une troisième protéine nommée E6-AP (E6 associated protein) (Huibregtse *et al.*, 1993; Scheffner *et al.*, 1993).

E6-AP est une protéine monomérique d'environ 100 kD qui agit comme une "E3 ubiquitin protein ligase" (Scheffner *et al.*, 1993). Il a été montré que les formes mutantes d'E6-AP qui n'ont plus la capacité de se fixer à E6, sont également incapables d'interagir avec P53 (Huibregtse *et al.*, 1993) (Figure 6). D'un autre côté, une protéine P53 mutée ayant perdue sa capacité à se fixer à E6, n'est plus sensible à la dégradation induite par E6-AP (Scheffner *et al.*, 1992). Ainsi, nous pouvons en déduire que la protéine virale E6 est indispensable à l'interaction P53/E6-AP.

Il a également été décrit que la protéine E6, qu'elle soit issue d'un virus HPV à faible ou haut risque, peut se lier à P53 sans induire sa dégradation (Crook *et al.*, 1991; Lechner et Laimins, 1994). Cette interaction a pour conséquence d'empêcher la répression transcriptionnelle médiée par P53 au niveau des promoteurs contenant la séquence TATA (Lechner *et al.*, 1992), et de réprimer la transactivation des promoteurs contenant des éléments de réponse à P53 (Pim *et al.*, 1994). Li et Coffino ont montré qu'il existe deux régions de P53 pouvant se fixer à E6 (Li et Coffino, 1996). La première région se situe au niveau C-terminal, entre les acides aminés 376 et 384 de P53. La fixation de E6 sur cette région n'induit pas la dégradation de P53 (Crook *et al.*, 1991). La seconde région se situe au niveau N-terminal de la protéine P53 et la fixation de E6 à cet endroit induit la dégradation de P53.

E6 peut également réprimer l'activité transactivatrice de P53 en se fixant sur les co-facteurs CBP et P300 (O'Connor, 2000; Patel *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999). Il y a alors compétition entre E6 et P53 pour utiliser ces facteurs essentiels au déclenchement de la transcription.

3.1.6.2. E6, apoptose et cycle cellulaire

Une conséquence évidente de la dégradation de P53 *via* E6 est l'inhibition des arrêts dans le cycle induit par P53 ainsi que des mécanismes apoptotiques dépendant de P53. (cf. 2.3.) (Figure 6).

INTRODUCTION

Cependant, il a également été mis en évidence que E6 pouvait avoir un effet sur le cycle cellulaire de façon indépendante de son interaction avec P53. Ainsi, E6 de HPV-16 interviendrait sur le contrôle de la transition G₂/M par différents mécanismes (Thompson *et al.*, 1997). Sur des cellules exprimant une protéine E6 stable, une réduction du blocage en G₂/M après irradiation a pu être remarquée.

3.1.7. E6*

Il a été décrit quatre formes tronquées de E6; nommées E6* I à IV. Bien que le transcrit de E6* soit trouvé en quantité abondante dans les cellules infectées par le virus HPV, la présence de la protéine n'a été détectée au départ que dans des cellules tumorales du col utérin infectées par HPV-18 et ayant permis de développer une tumeur sur une souris nude (Schneider-Gadicke *et al.*, 1988).

Lorsque E6* est traduite *in vitro*, elle est généralement très instable (Shally *et al.*, 1996). Ce phénomène pourrait être expliqué par un "turnover" rapide de E6* dans la cellules.

La fonction d'E6* est d'inhiber la dégradation de la protéine P53 induite par E6. (Pim *et al.*, 1997; Shally *et al.*, 1996). Cette fonction a été mise en évidence par une augmentation de l'activité transcriptionnelle de P53 et une diminution de la prolifération cellulaire dans des cellules exprimant la protéine E6*I (Pim *et al.*, 1997). E6*I peut se fixer, *in vitro*, à E6 ainsi qu'à E6-AP, mais pas directement à P53. Ces interactions empêchent la formation du complexe E6/E6-AP, indispensable à la fixation de P53.

E6* a donc pour fonction de moduler la dégradation de P53 par E6 durant la réplication virale.

3.1.8. E7

E7 est une oncoprotéine de 21 kD ayant une structure et une fonctionnalité similaire à d'autres oncoprotéines issues de virus à ADN telle que la protéine E1A ou encore l'antigène T (Chellappan *et al.*, 1992; Dyson *et al.*, 1992). Ces oncoprotéines interagissent avec les protéines de la famille Rb, c'est à dire : Rb, p107 et p130. Les séquences de la partie amino-terminale des protéines E7, E1A et de l'antigène T, contiennent un motif LXCXE, impliqué dans l'interaction avec les protéines de la famille Rb (Chellappan *et al.*, 1992; Dyson *et al.*, 1989).

Par contre, la partie carboxy-terminale de E7 ne présente pas d'homologie avec E1A et l'antigène T. Cependant, cette région reste indispensable à la fonctionnalité de E7 (Jewers *et*

INTRODUCTION

al., 1992; McIntyre *et al.*, 1993). Cette région C-terminale contient des motifs CXXC qui forment des structures en doigt de zinc. Celles-ci sont indispensables à la dimérisation de la protéine et sont caractéristiques d'un facteur de transcription (Chinami *et al.*, 1996). Ces motifs sont très conservés parmi les différents types de HPV (Ciccolini *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1994).

E7 joue son rôle d'oncoprotéine en intervenant aux niveaux de mécanismes moléculaires régulant le cycle cellulaire (Figure 6).

En se fixant sur les protéines Rb hypophosphorylées, E7 entraîne le découplage des protéines Rb-E₂F. E₂F ainsi libéré va pouvoir jouer son rôle de facteur de transcription en induisant l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire (thymidine kinase, dihydrofolate réductase, ADN-Polymérase α). Ainsi, E7 induit le passage des cellules de la phase G₁ vers la phase S du cycle cellulaire. De plus, E7 peut aussi agir au niveau du passage des cellules de la phase G₂ vers la mitose en interagissant de façon spécifique avec la kinase de l'histone 1 (Davies *et al.*, 1993).

E7 peut s'associer à d'autres protéines cellulaires impliquées dans le contrôle du cycle telles que les complexes cdk2-cyclineE/A impliqués dans la régulation de la phase S et du passage G₂/M (McIntyre *et al.*, 1996; Tommasino *et al.*, 1993).

Des cellules exprimant la protéine E7 ont été décrites comme ne subissant pas de mise en place de blocage en G₁/S induit par P53, après un stress tel qu'une irradiation aux rayons gamma ou encore une exposition à l'actinomycine D. Il a aussi été décrit que la protéine E7 n'empêchait pas l'accumulation de P53 ni l'induction du transcrit et de la protéine P21, qui font suite à un endommagement de l'ADN cellulaire (Hickman *et al.*, 1997). Cependant, E7 a la capacité de se fixer au co-facteur TBP et ainsi de réprimer l'activité transcriptionnelle de P53 par un phénomène de compétition pour ce co-activateur de la transcription (Massimi et Banks, 1997).

3.1.9. L1 et L2

Tous les virions des papillomavirus sont composés d'une capside principale formée de protéines L1 et d'une capside secondaire formée de protéines L2 (Challberg et Kelly, 1989). *In vivo*, l'expression de L1 et L2 ainsi que la formation des virions sont les dernières étapes de la différenciation par le virus, de la couche de tissu épithélial infecté (Yang *et al.*, 1991). Cependant, *in vitro*, les protéines L1 et L2 ne sont pas exprimées en culture. Ce phénomène a

pour conséquence de ralentir les études de caractérisation de ces protéines mais aussi la propagation des papilloma virus dans les cultures cellulaires (Yang *et al.*, 1991).

L'équipe de Kirnbauer a démontré que l'expression de protéines L1 seules, peut suffire pour permettre l'assemblage des particules virales (Kirnbauer *et al.*, 1992). La même équipe quelques années plus tard (Day *et al.*, 1998), a mis en évidence que les protéines L2 étaient en fait impliquées dans l'organisation des différents composants du virion en les rassemblant dans un domaine nucléaire. Cette colocalisation induite par L2 servirait de mécanisme de base permettant l'assemblage des particules virales du papillomavirus, soit en augmentant la concentration des constituants des virions, soit en mettant en place une architecture favorable à l'encapsidation des virus (Day *et al.*, 1998).

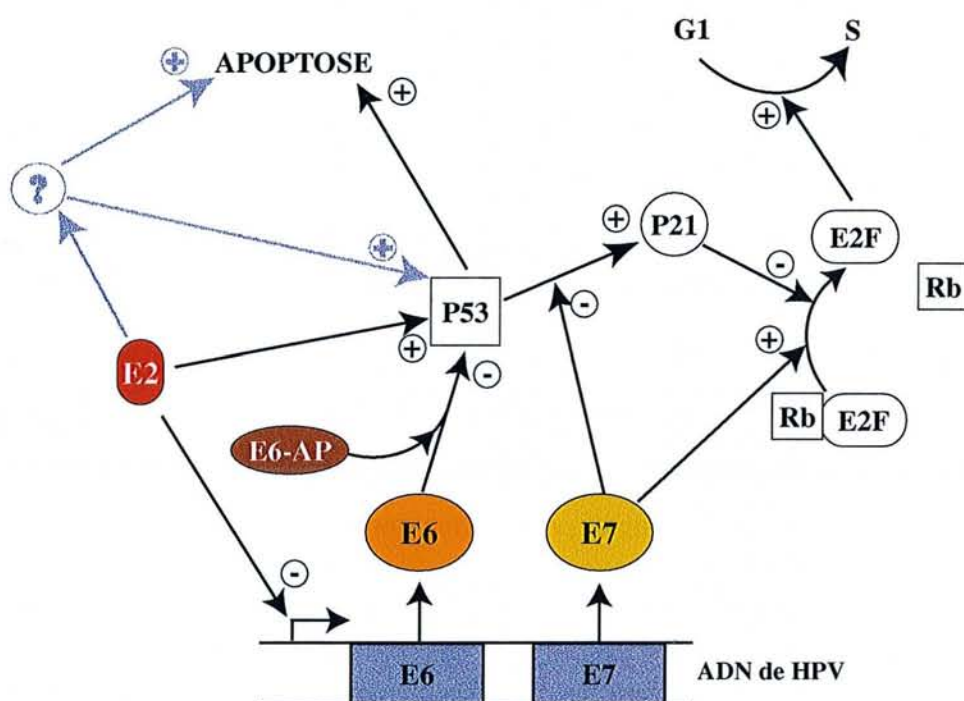


Figure 6 : Implication des protéines E2, E6, E6-AP et E7, codées par le virus HPV18, dans la mise en place de l'apoptose et du blocage en G₁/S. E₂F : Elongation 2 Factor ; E6-AP : E6 Associated protein ; Rb : RetinoBlastoma protein.

3.2. Influence de HPV sur la sensibilité des cellules aux traitements anticancéreux

Récemment plusieurs équipes se sont intéressées au rôle que pouvait jouer la contamination par HPV sur la sensibilité aux traitements anticancéreux des cellules hôtes. Ces études s'intéressent surtout à la modulation de l'apoptose par les oncoprotéines E6 et E7 après chimio- ou radiothérapie.

INTRODUCTION

Parmi ces premières études, celle de l'équipe de Tsang, décrit que la transfection de la protéine E6 de HPV-16 dans des fibroblastes, a pour conséquences une perte de l'expression de la protéine P53, une inhibition de l'arrêt en G₁ radio-induit, ainsi qu'une augmentation de la radiorésistance des cellules (Tsang *et al.*, 1995). Par contre, cette même équipe a démontré un an plus tard, que la même transfection, mais sur des cellules d'ostéosarcomes et de cancers d'ORL d'origine humaine, entraînait une diminution de la protéine P53 mais ne modulait pas la radiosensibilité des cellules (Huang *et al.*, 1996). De même, la transfection de E6 et E7 dans des cellules cancéreuses colorectales, altère les blocages des cellules dans le cycle cellulaire après une irradiation à faible dose. Cependant, cette transfection ne module pas la radiosensibilité de ces cellules (DeWeese *et al.*, 1997). Plus récemment, une étude sur des kératinocytes humains, a mis en évidence que l'expression seule de E6 de HPV-16 ou la co-expression de E6 et E7 du même type de virus, sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le cisplatine, l'étoposide et la mitomycine C. Par contre l'expression de ces protéines n'influence pas la sensibilité des cellules à un traitement par de l'atractylosine ou par du butyrate de sodium (Liu *et al.*, 2000b). Les auteurs expliquent en parti ces résultats par une différence de mise en place de l'apoptose. En effet, celle-ci est augmentée dans les cellules transfectées par E6 ou E6 et E7 après un traitement par du cisplatine, de l'étoposide ou de la mitomycine C, mais pas après un traitement par de l'atractylosine ou par du butyrate de sodium.

La transfection de E6 (HPV-16) dans des cellules de cancer du sein a pour conséquence d'inhiber l'arrêt en G₁ du cycle cellulaire, et d'augmenter la réponse apoptotique induite par un traitement par le tamoxifène. Les cellules transfectées sont alors plus sensibles au traitement. Cependant, environ 10 passages après transfection, les cellules sont à nouveau résistantes au tamoxifène. Les auteurs ne décrivent pas de mécanismes moléculaires pouvant expliquer ce phénomène (Seewaldt *et al.*, 2001).

Les effets des protéines virales codées par HPV sur la sensibilité des cellules aux traitements anticancéreux sont divers. Il semblerait qu'ils dépendent à la fois du traitement et du type cellulaire. Cependant, le nombre d'études portant sur l'impact de la contamination par HPV sur la sensibilité cellulaire reste faible. Aucune équipe ne s'est intéressée à l'implication de HPV sur l'ensemble des traitements utilisés en clinique, notamment par 5-fluorouracile.

3.3. Conclusion

Les virus du papillome humain (HPV) peuvent contrôler la prolifération et la différenciation des cellules qu'ils infectent. Ainsi, certains types de ces virus, nommés "à haut risque", peuvent entraîner la cancérisation des cellules par l'action de leurs protéines E5, E6 et E7 qualifiées d'oncoprotéines. Celles-ci sont capables d'empêcher les cellules à la fois de marquer des temps d'arrêts dans le cycle cellulaire, et de subir le phénomène d'apoptose, *via* entre autre, une action directe sur la protéine P53. Ces événements entraînent une instabilité génétique, ainsi que l'augmentation des événements transformant les cellules infectées. L'implication d'une contamination par HPV sur la sensibilité des cellules à un traitement anticancéreux est contre-versée, et les mécanismes moléculaires pouvant intervenir restent mal connus.

CHAPITRE 4

NF- κ B

4. NF-KAPPA B

Le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) a été décrit pour la première fois il y a une quinzaine d'années (Sen et Baltimore, 1986), et depuis, il a fait l'objet de très nombreuses études.

NF- κ B est impliqué au niveau de diverses fonctions biologiques, telles que :

- la réponse immunitaire (Baeuerle et Henkel, 1994),
- la réaction inflammatoire, dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ERO),
- les mécanismes d'apoptose (Aggarwal, 2000; Bours *et al.*, 2000),
- et le contrôle du cycle cellulaire.

Ces deux derniers rôles expliquent que NF- κ B soit impliqué dans la prolifération cellulaire et dans l'oncogénèse.

4.1. Structure du complexe NF- κ B

Il existe plusieurs formes de complexes NF- κ B qui peuvent être composés d'homo- ou d'hétérodimères, formant une famille de facteurs de transcription dimériques.

L'ensemble des protéines composant ces dimères appartient à la famille des protéines Rel (Siebenlist *et al.*, 1994).

Ces protéines possèdent toutes un domaine très conservé d'environ 300 acides aminés, nommé "domaine Rel" (RH, Rel homology), permettant à la fois :

- la fixation à l'ADN,
- la dimérisation des protéines,
- la localisation nucléaire,

INTRODUCTION

- et la liaison à leur inhibiteur I κ B (Inhibitor of NF- κ B) (Baldwin, 1996; Verma *et al.*, 1995).

Les protéines Rel sont classées en deux sous-familles selon leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles.

Les protéines de la 1^{ère} classe ont la particularité d'être synthétisées sous forme de précurseurs : P105 et P100. Ces protéines possèdent du côté C-terminal, un long domaine qui contient plusieurs copies répétées de motifs ankyrines. Après un clivage protéolytique, les deux précurseurs P105 et P100 sont transformés respectivement en protéines P50 et P52 contenant le domaine Rel. Les membres de cette première classe présentent des activités transcriptionnelles très faibles.

Les protéines de la 2^{nde} classe sont directement synthétisées sous leur forme fonctionnelle. Cette classe contient 3 protéines : c-Rel, RelB et RelA, cette dernière protéine étant plus connue sous le nom de P65. Ces protéines contiennent toutes en région C-terminale, un domaine d'activation de la transcription.

Toutes les protéines Rel peuvent former des homo- ou des hétérodimères, sauf Rel-B qui n'engendre que des hétérodimères. Cette diversité de combinaisons contribue à la régulation de différents groupes de gènes. Les divers dimères se fixent de façon spécifique sur des séquences de l'ADN, de 10 paires de bases, nommées "sites - κ B" dont la séquence consensus est 5'-GGGRNYYYCC-3'. Chaque dimère reconnaît donc des séquences - κ B de façon spécifique.

Le complexe NF- κ B le plus décrit est l'hétérodimère P50/P65. C'est le dimère le plus communément formé et celui trouvé majoritairement dans les cellules. Ce complexe NF- κ B est activateur de la transcription de nombreux gènes. Par contre, les homodimères P52/P52 n'activent pas la transcription, mais ont pour fonction de se fixer à l'ADN sur les sites - κ B et ainsi, de réprimer l'activation de la transcription de gènes par des formes NF- κ B activatrices (Muller et Harrison, 1995).

4.2. Structure du complexe NF- κ B/ADN

Tous les dimères NF- κ B interagissent avec l'ADN en se mettant "à califourchon" sur la double hélice. Le complexe NF- κ B/ADN forme une structure tertiaire en papillon qui est différente des structures observées pour les autres facteurs de transcription (Figure 7). Chaque monomère contient deux séries de plis en feuillets β , formant un domaine dans la région N-terminale (NTD) et un autre domaine dans la région C-terminale (CTD). Le NTD entre en

INTRODUCTION

contact spécifiquement avec l'ADN, et le CTD permet la dimérisation de deux protéines Rel, et des contacts non spécifiques avec l'ADN.

Les sous-unités de NF- κ B utilisent pour favoriser les contacts avec l'ADN, dix boucles flexibles prolongeant la structure secondaire en feuillet. La région N' du domaine RH est essentielle dans la liaison de NF- κ B à l'ADN (Coleman *et al.*, 1993; Toledano *et al.*, 1993).

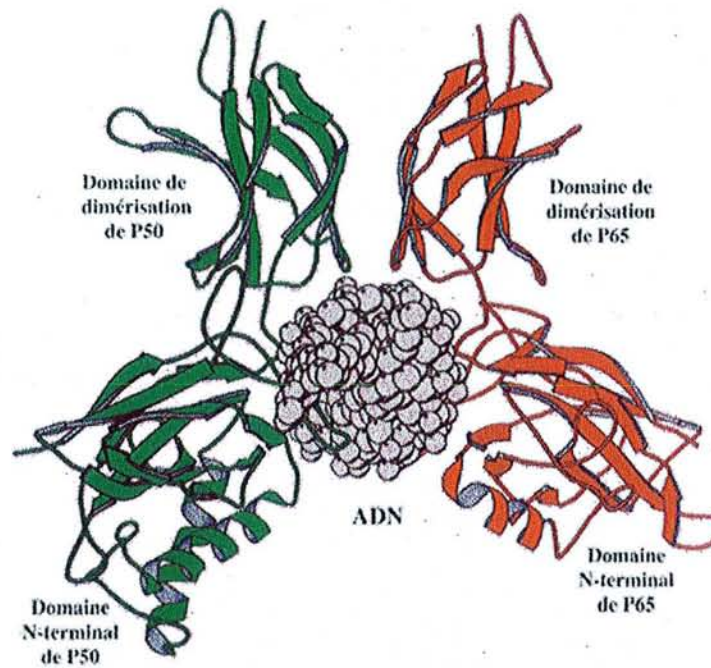


Figure 7 : Structure tridimensionnelle en papillon de la fixation de l'hétérodimère P50/P65 sur l'ADN (Chen et Ghosh, 1999).

La liaison de NF- κ B sur le site - κ B est réalisée *via* un enroulement des plis. Les séquences - κ B spécifiques de P50/P65 sont pseudo symétriques et comportent :

- un sous-site P50 de 5 paires de bases,
- un sous-site P65 de 4 paires de bases,
- et une paire de bases qui sépare les deux sous-sites. (Chen *et al.*, 1998b; Ghosh *et al.*,

1995; Muller *et al.*, 1995) (Figure 8).



Figure 8 : Fixation de l'hétérodimère P50/P65 sur la séquence consensus du site - κ B.

L'ensemble du domaine Rel établit donc des contacts avec l'ADN. Environ 38 contacts sont ainsi établis sur l'ensemble de la double hélice de l'ADN au niveau du site κ B. A cet endroit, le petit sillon de l'ADN reste libre (Chen et Ghosh, 1999).

4.3. Régulation de l'activité de NF- κ B

L'activité de NF- κ B est régulée par différents mécanismes incluant des phénomènes de :

- interactions protéine/protéine,
- phosphorylation / déphosphorylation,
- variations dans les séquences primaires κ B,
- et changements de conformations tertiaires.

Ces trois phénomènes de régulation agissent sur l'affinité de NF- κ B pour l'ADN. La régulation la plus étudiée, essentielle à l'activation de NF- κ B, est celle assurée par la protéine I κ B.

4.3.1. Inhibition de l'activité de NF- κ B par I κ B

L'activité de NF- κ B est régulée par son interaction avec une protéine inhibitrice appelée I κ B. Comme pour les protéines formant les complexes NF- κ B, il existe plusieurs protéines I κ B présentant différentes affinités selon les complexes NF- κ B (Karin, 1999). Lorsque I κ B est complexé à NF- κ B, il recouvre la séquence de localisation nucléaire (NLS) de chaque protéine Rel, empêchant ainsi la translocation du facteur de transcription NF- κ B vers le noyau.

Six formes de protéines I κ B ont été décrites : I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ /p100, I κ B δ /p105 et Bcl3. Cette dernière exerce une activité particulière dans le contrôle de NF- κ B (Bours *et al.*, 1993; Lenardo et Siebenlist, 1994). En effet, Bcl3 semble agir plutôt comme un activateur de NF- κ B. En fait Bcl3 agit en libérant les sites κ B occupés par des complexes NF- κ B non activateurs comme P50/P50 ou P52/P52. Les sites κ B ainsi libérés peuvent être transactivés par d'autres complexes NF- κ B activateurs (Figure 9). De plus, il a également été décrit que Bcl3 pouvait se fixer sur les homodimères P52 fixés sur un site κ B. Cette association entraîne la transactivation du gène sans que Bcl3 ne soit lié à l'ADN (Bours *et al.*, 1993; Franzoso *et al.*, 1993; Franzoso *et al.*, 1992) (Figure 9).

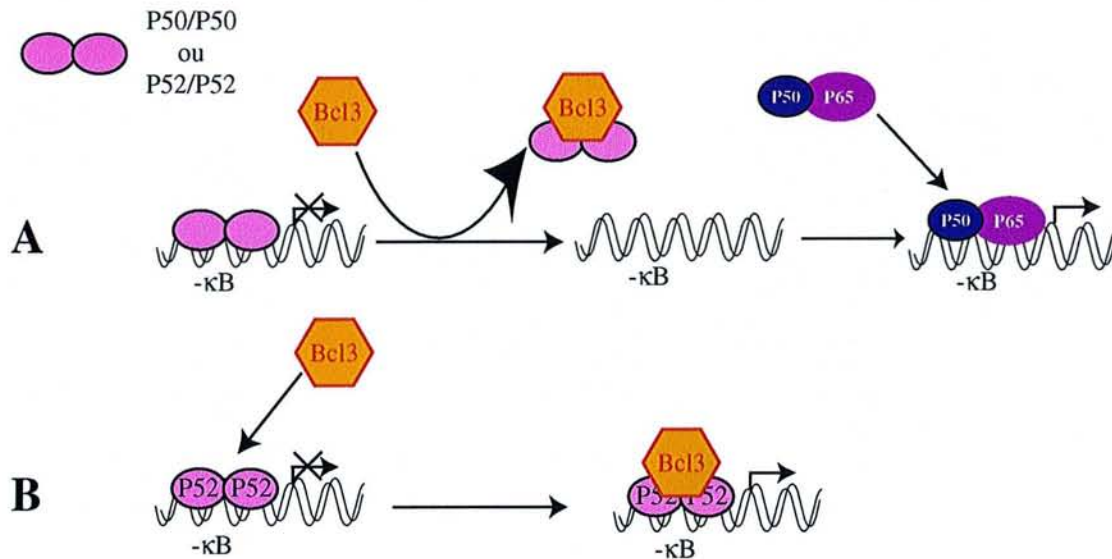


Figure 9 : Les deux voies d'action de Bcl3. Voie A : libération des sites occupés par des complexes inhibiteurs. Voie B : transactivation des gènes par fixation de Bcl3 sur les complexes inhibiteurs.

L'ensemble de ces protéines IκB possèdent 5 à 7 séquences répétitives formées de 30 acides aminés, dénommées "répétitions ankyrines", suivies dans la partie C-terminale de séquences de type PEST (séquence riche en acides aminés proline, sérine, thréonine et acide glutamique) pour les formes α et β, considérées généralement comme des déterminants de la dégradation des protéines (Carillo *et al.*, 1995).

Les complexes NF-κB contenant la protéine RelB sont régulés essentiellement par IκBγ, alors que ceux contenant P65, le sont par la forme IκBα. L'interaction NF-κB/IκB la mieux étudiée actuellement est celle de IκBα avec P50/P65.

La protéine IκBα est composée de trois régions différentes :

- en région N-terminale, un domaine recevant le signal (SRD),
- au niveau central, un domaine contenant les répétitions ankyrines,
- et à l'extrémité C-terminale, la région PEST (Verma *et al.*, 1995).

IκB présente plusieurs points de contact avec NF-κB. Ces interactions recouvrent la séquence de localisation nucléaire de NF-κB et interfèrent avec les séquences impliquées dans sa liaison à l'ADN (Chen et Ghosh, 1999). Les six répétitions ankyrines de IκBα se fixent de façon asymétrique à l'hétérodimère P50/P65. Chaque répétition ankyrine contient une hélice interne et externe ainsi qu'une boucle de séquence variable, suivie par une courte épingle à cheveux β. Cette structure permet les interactions avec les domaines RH de P50/P65 (Huxford *et al.*, 1998; Jacobs et Harrison, 1998).

INTRODUCTION

Dans la majorité des cellules, le complexe NF- κ B est présent dans le cytoplasme sous forme latente complexée à I κ B. En réponse à une large variété de stimuli, la protéine I κ B est phosphorylée, puis dégradée. NF- κ B entre alors rapidement dans le noyau où il active l'expression de plus de 150 gènes spécifiques (Pahl, 1999). La régulation de l'interaction I κ B/NF- κ B est une étape clé dans le contrôle de l'activité de NF- κ B. De nombreuses molécules impliquées dans ce contrôle ont été décrites. Presque tous les signaux d'activation de NF- κ B, comprenant :

- le TNF (Tumor Necrosis Factor) ou l'interleukine-1 (IL-1),
- les lipopolysaccharide (LPS),
- et les radiations ionisantes (Li et Karin, 1998),

convergent vers le complexe IKK (I κ B kinase).

Ce complexe de haut poids moléculaire contient trois sous-unités dont deux (IKK α et IKK β) qui possèdent une activité sérine kinase spécifique de I κ B. L'activation de IKK entraîne la phosphorylation de I κ B α sur les sérines 32 et 36, situées dans la partie amino-terminale de la protéine (Baldwin, 1996; Ghosh *et al.*, 1998). Les phosphorylations de I κ B entraînent son ubiquitination sur les lysines 21 et 22, par le complexe ubiquitine ligase E3. Ces ubiquitines sont les cibles du protéasome 26S qui va dégrader la protéine I κ B (Zandi et Karin, 1999). NF- κ B est alors libre et entre dans le noyau où il va, entre autres, activer la transcription du gène codant pour I κ B α . Les nouvelles protéines I κ B α synthétisées pénètrent dans le noyau et dégagent les complexes NF- κ B de leurs sites ADN, les exportant dans le cytoplasme entraînant ainsi un retour à l'état latent initial (Gilmore, 1999). Cette boucle d'autorégulation forme une voie de rétrocontrôle négatif (Figure 10).

INTRODUCTION

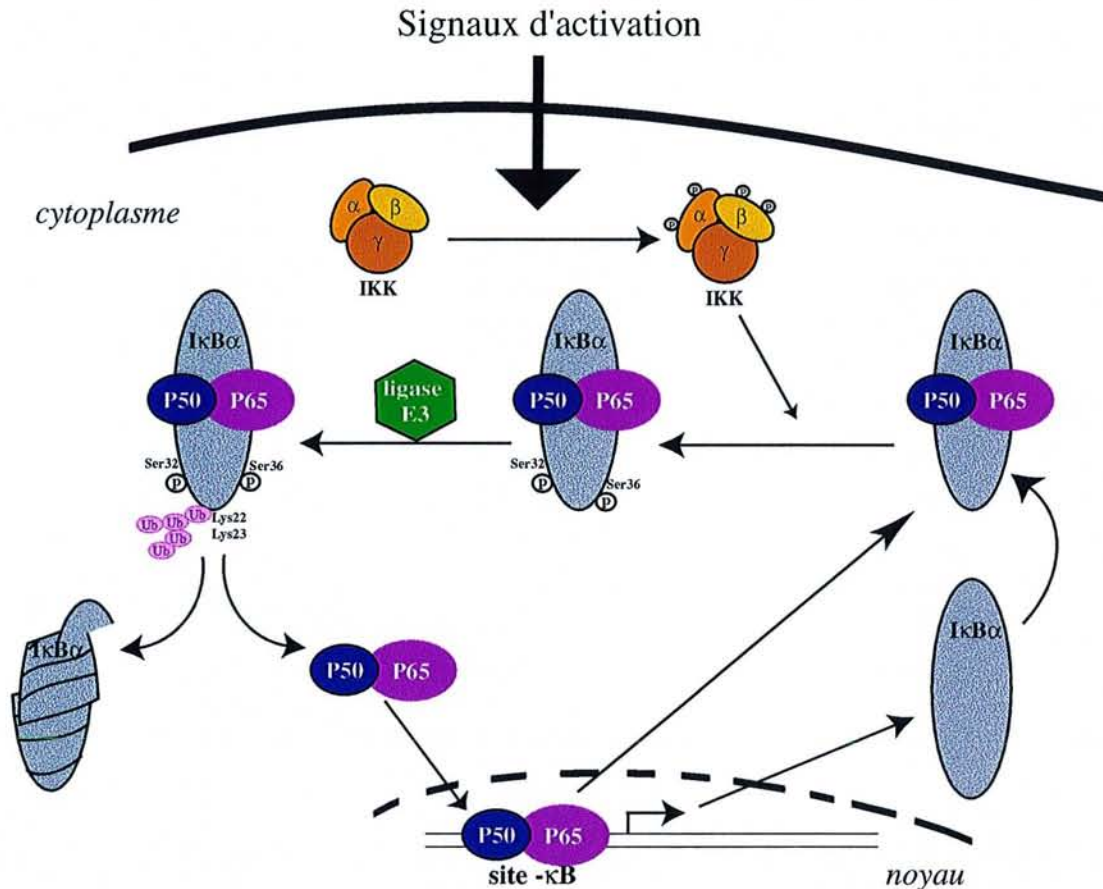


Figure 10 : Voie classique d'activation de NF-κB via le complexe IKK et une boucle de rétrocontrôle négatif. IKK : IκB kinase.

D'autres voies d'activation de NF-κB ont été décrites. Une voie encore mal connue au niveau moléculaire est celle induite par les radiations photoniques UV, entraînant l'activation de NF-κB par dégradation de IκBα mais sans passer par l'activation du complexe IKK (Li et Karin, 1998).

Une autre voie d'activation de NF-κB, ne passant pas par la dégradation de IκBα, a été mise en évidence suite à une stimulation par le pervanadate (inhibiteur de la protéine tyrosine-phosphatase) et par le phénomène de réoxygénation (Figure 11). Elle fait intervenir la phosphorylation de IκB sur sa tyrosine 42. Cette phosphorylation entraîne la dissociation du complexe IκB/NF-κB sans que IκBα ne soit dégradé (Imbert *et al.*, 1996). Cette phosphorylation provoque l'interaction de la PI3-K avec IκBα phosphorylé par l'intermédiaire de la sous-unité régulatrice P85 de la PI3-K. Cette interaction rompt le complexe IκB/NF-κB libérant ainsi le facteur de transcription NF-κB, sans entraîner la protéine IκB vers la voie de dégradation. La sous-unité catalytique P110 de la PI3-K, joue aussi un rôle dans le mécanisme d'activation de NF-κB, en induisant la phosphorylation de P65 à son extrémité carboxylique, augmentant ainsi son activité transcriptionnelle intrinsèque (Beraud *et al.*, 1999) (Figure 11).

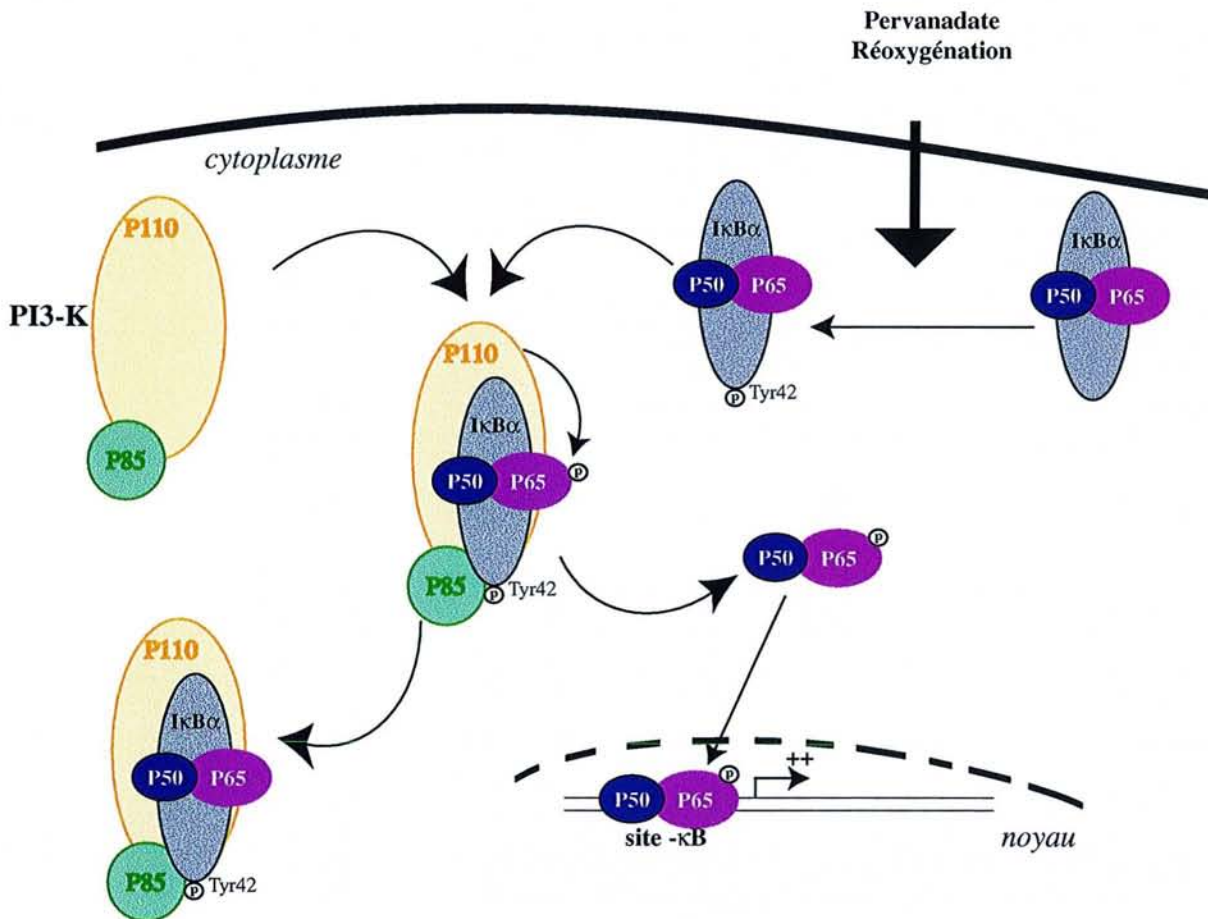


Figure 11 : Activation de NF-κB par le pervanadate ou par le phénomène de réoxygénation via la PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase).

4.3.2. Régulation de l'activité de NF-κB par phosphorylation

Les complexes NF-κB sont régulés positivement par des phosphorylations, qu'elles soient constitutives ou liées à une induction (Li *et al.*, 1994b). L'hyperphosphorylation de la protéine P50 est essentielle à la translocation nucléaire du complexe suite à l'action de l'ester de phorbol (Li *et al.*, 1994a), et augmente également l'affinité et la stabilité des complexes P50/ADN *in vitro* (Li *et al.*, 1994a). Par contre, la forme hypophosphorylée de P50 forme un complexe avec l'ADN peu stable (Kushner et Ricciardi, 1999).

La forme déphosphorylée de P65 ne peut pas se lier à l'ADN dans les essais de gel retard (Zhong *et al.*, 1998). La protéine kinase A (PKA) est associée au complexe NF-κB/IκBα dans le cytoplasme, et a la capacité de phosphoryler P65 seulement après sa translocation dans le noyau. La phosphorylation du résidu Sérine 276 catalysée par la PKA, augmente l'affinité de P65 pour les co-facteurs CBP et P300 (Zhong *et al.*, 1998), et par conséquent augmente l'activité transcriptionnelle de NF-κB.

INTRODUCTION

4.3.3. Activation de NF- κ B par le TNF α ou par les radiations ionisantes

Plus de 150 stimuli sont susceptibles de déclencher l'activation des facteurs de transcription NF- κ B (Pahl, 1999). Parmi ces stimuli, le TNF est celui dont le mécanisme d'action est le mieux détaillé. La voie d'action des radiations ionisantes est par contre peu connue et même parfois controversée. Ces deux voies d'activation seront décrites dans ce paragraphe.

4.3.3.1. Les voies d'induction déclenchée par le TNF

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire, qui est produite notamment par les macrophages activés. Il participe à plusieurs processus cellulaires :

- l'inflammation,
- l'immunorégulation,
- la prolifération,
- et la réponse anti-virale (Jaattela, 1991).

Ces diverses fonctions du TNF α sont induites à la suite de l'activation de deux récepteurs, le TNF-R1 de 60 kD et le TNF-R2 de 80 kD.

La fixation du TNF α au TNF-R1 entraîne l'activation de NF- κ B et AP-1, tous deux impliqués dans la réponse pro-inflammatoire et dans l'immunomodulation (Ashkenazi et Dixit, 1998). Dans certains types cellulaires et certaines conditions, le TNF α peut également induire l'apoptose *via* la fixation sur ce même récepteur (Van Antwerp *et al.*, 1998). La dualité de la signalisation du TNF-R1 provient de deux voies moléculaires distinctes ayant le TNF-R1 pour origine. La voie pro-apoptotique dépend de la protéine FADD alors que la voie anti-apoptotique dépend de TRAF2 (TNFR Associated Factor-2) (Hsu *et al.*, 1996) ou de la kinase Akt selon la nature des cellules (Ozes *et al.*, 1999; Romashkova et Makarov, 1999). La kinase Akt induit l'activation de NF- κ B (Hsu *et al.*, 1996). En se fixant au TNF-R1, le TNF α induit la trimérisation du récepteur, suivi d'un recrutement de plusieurs protéines au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur (Figure 12).

Dans la voie de signalisation pro-apoptotique, le TNF-R1 se complexe à la molécule FADD. Ce complexe attire la procaspase 8 et active son clivage, la transformant en caspase-8.

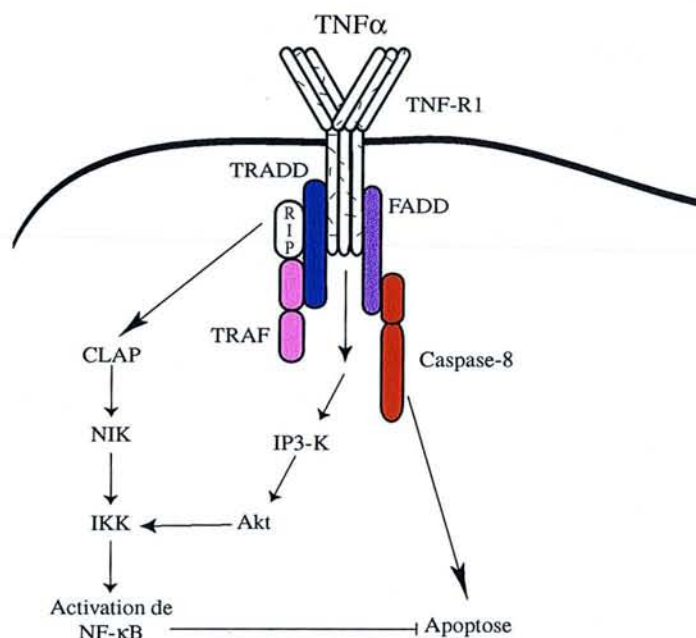


Figure 12 : Voies d'activation de NF- κ B par le TNF α (Barkett et Gilmore, 1999). TNF α : tumor necrosis factor ; TNF-R1 : TNF receptor 1 ; TRADD : TNF-R1 Associated Death Domain protein ; FADD : Fas Associated Death Domain protein ; RIP : Receptor Interacting Protein ; TRAF : TNF Receptor Associated Factor ; CLAP : CARD-Like Apoptotic Protein ; NIK : NF- κ B Inducing Kinase ; IKK : I κ B kinase ; NF- κ B : nuclear factor kappaB ; IP3-K : phosphatidylinositol 3-kinase ; Akt : sérine/thréonine kinase.

Il existe deux voies de signalisation anti-apoptotique possibles :

- La première voie est réalisée *via* la fixation de la protéine TRADD (TNF-R1 Associated Death Domain protein) au niveau du domaine cytoplasmique du TNF-R1. TRADD fixe ensuite TRAF2 qui lui-même se fixe à RIP1 (Receptor Interacting Protein-1). Ce dernier active CLAP (CARD-Like Apoptotic Protein) (Srinivasula *et al.*, 1999) qui active NIK (NF- κ B Inducing Kinase). Cette kinase active le complexe IKK, réputé pour être le complexe clé d'activation de NF- κ B où aboutit un grand nombre de voies d'activation de ce facteur de transcription. Comme nous l'avons décrit précédemment, IKK phosphoryle I κ B α et libère ainsi NF- κ B (Barkett et Gilmore, 1999; Yeh *et al.*, 1997) (Figure 12).

- Dans la seconde voie, la fixation du I κ B α sur le TNF-R1 induit l'activation de la PI3-K qui elle-même active la protéine Akt. Cette dernière protéine activerait NF- κ B en phosphorylant différents résidus de IKK α (Ozes *et al.*, 1999). Cette seconde voie reste peu connue et ne se produirait que dans certains types cellulaires (Romashkova et Makarov, 1999) (Figure 12).

INTRODUCTION

4.3.3.2. Voie d'induction déclenchée par les radiations ionisantes

L'activation de NF- κ B par les radiations ionisantes est un phénomène qui a été observé par de nombreuses équipes. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués restent très peu connus.

Deux voies distinctes semblent intervenir dans cette activation :

- les EROs et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) engendrés par le stress oxydatif de l'irradiation
- les doubles cassures radio-induites de l'ADN

In vitro, NF- κ B est rapidement activé par les EROs et H_2O_2 (Schmidt *et al.*, 1995; Schreck *et al.*, 1991). Cette voie d'activation semble être en relation avec la voie induite par le TNF, puisque l'inhibition des EROs et du H_2O_2 par des anti-oxydants empêche l'activation de NF- κ B par le TNF (Schreck *et al.*, 1992). Une molécule commune à ces deux voies serait la protéine Akt (Shao *et al.*, 2001). L'activation par les EROs et H_2O_2 aboutit donc à l'activation du complexe IKK qui entraîne la libération de NF- κ B *via* la dégradation de I κ B α (Figure 13).

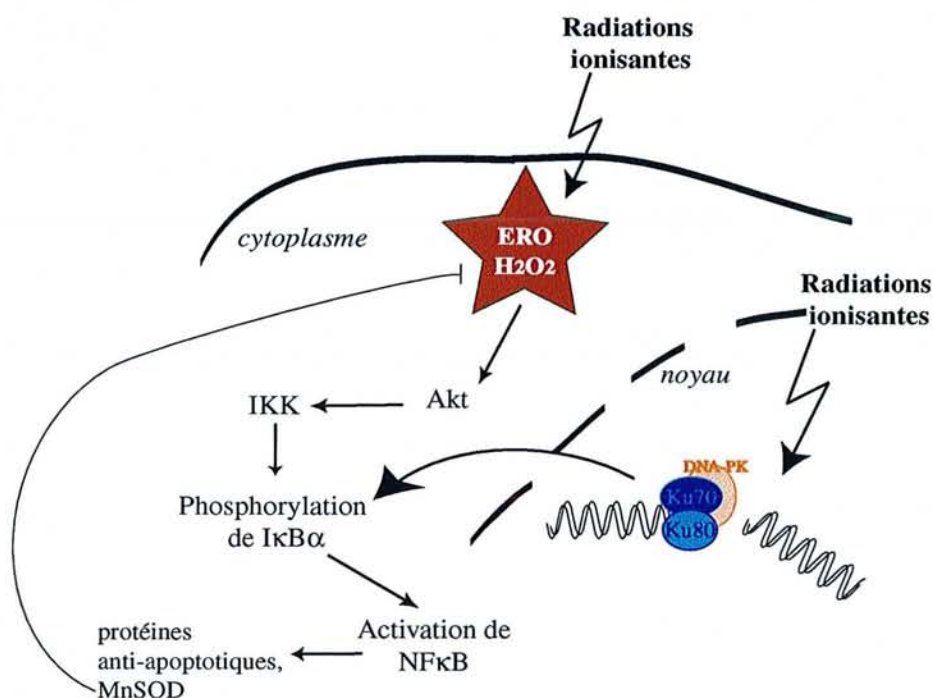


Figure 13 : Activation de NF- κ B par les radiations ionisantes. ERO : espèces réactives de l'oxygène ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène; IKK : inhibiteur I κ B ; Akt : sérine/thréonine kinase ; NF- κ B : nuclear factor kappaB; MnSOD : manganese super oxyde dismutase.

La seconde voie d'activation de NF- κ B par les radiations ionisantes est indépendante de celle du TNF α (Basu *et al.*, 1998). Cette voie implique le complexe DNA-PK décrit dans le

INTRODUCTION

chapitre sur P53. Deux sous-unités de la DNA-PK (Ku70 et Ku80) reconnaissent les doubles cassures de l'ADN et activent la fonction kinasique du complexe. Cette enzyme activée par les cassures radio-induites de l'ADN, est capable de phosphoryler I κ B α et I κ B β et ainsi de libérer NF- κ B (Basu *et al.*, 1998) (Figure 13).

Il existe un rétrocontrôle négatif de l'activation de NF- κ B par les EROs, puisque NF- κ B induit l'expression de l'enzyme de détoxification : la MnSOD (Manganese Superoxide Dismutase) (Li *et al.*, 1998) (Figure 13).

4.3.4. Inhibition de NF- κ B

Les inhibiteurs naturels de NF- κ B tels que I κ B α , Bcl3 ou une inhibition par phosphorylation ont été décrits ci-dessus. De nombreuses études ont utilisé d'autres moyens pour inhiber l'activation de NF- κ B. La cascade des événements aboutissant à l'activation de NF- κ B présente plusieurs étapes clés qui peuvent servir de cible pour l'inhibition. Ainsi, des inhibiteurs pourraient agir :

- à un stade précoce dans la voie d'activation de NF- κ B,
- en bloquant un membre spécifique de la cascade d'activation,
- en inhibant la translocation nucléaire de NF- κ B,
- en empêchant sa fixation à l'ADN,
- et en inhibant les interactions de NF- κ B avec la machinerie de la transcription.

Évidemment, pour chaque étape clé citée précédemment, il existe plusieurs types inhibiteurs dont les principaux sont :

- les anti-oxydants,
- les inhibiteurs de protéasomes,
- les inhibiteurs de la phosphorylation de I κ B α ,
- les inhibiteurs du transport nucléaire de NF- κ B,
- les inhibiteurs de la liaison de NF- κ B à l'ADN ou de la transactivation,
- et I κ B α super-répresseur

4.3.4.1. Les anti-oxydants

NF- κ B est activé par des oxydants tels que H₂O₂ et cette induction peut être inhibée par des anti-oxydants (Li et Karin, 1999; Pahl, 1999).

INTRODUCTION

Actuellement, ni la cible exacte, ni la voie de signalisation utilisée par les oxydants pour activer NF- κ B n'ont pu être décrites. Le TNF α , l'IL-1, les esters de phorbol (comme le PMA), les lipopolysaccharides (LPS) ou encore des radiations ionisantes, peuvent induire un stress oxydatif conduisant à l'activation de NF- κ B (Siebenlist *et al.*, 1994). Divers anti-oxydants tels que les thiols [N-acetyl-L-cysteine (NAC) et le pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)] et les chélateurs de calcium (ethylene glycol tetraacetic acid, lacipidine) peuvent inhiber l'activation de NF- κ B. Le principe d'action de ces molécules est de récupérer les espèces actives de l'oxygène intermédiaire (Sen *et al.*, 1996). Cependant, tous les anti-oxydants n'agissent pas au même niveau dans la cascade moléculaire d'activation de NF- κ B. Ainsi, il a été démontré que la NAC bloque la dégradation de I κ B α induite par le TNF α , mais n'a pas d'effet ni sur la phosphorylation de I κ B α , ni sur l'activité du complexe kinasique IKK (Li et Karin, 1999). Par contre, un anti-oxydant phénolique comme le CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester) inhibe l'activation de NF- κ B sans affecter les phénomènes de phosphorylation et de dégradation de I κ B α . En effet, le CAPE agirait directement sur la liaison de NF- κ B sur l'ADN (Natarajan *et al.*, 1996).

4.3.4.2. Les inhibiteurs de protéasomes

La dernière étape qui précède la libération de NF- κ B, est la dégradation, par le protéasome 26S, de la protéine I κ B α ubiquitinée (Karin, 1999; Palombella *et al.*, 1994).

Ainsi, des inhibiteurs du protéasome ou de protéases, vont supprimer l'activation de NF- κ B en stabilisant la protéine I κ B α . Une petite vingtaine d'inhibiteurs sont décrits actuellement (Epinat et Gilmore, 1999). Ils ont tous la capacité de pénétrer dans la cellule et d'inhiber l'activation de NF- κ B de manière dose-dépendante. L'inhibiteur de protéasomes le plus communément utilisé est la cyclosporine A (Frantz *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1997). Plus récemment, le PS-341, a été décrit comme étant un inhibiteur spécifique du protéasome 26S, et il est depuis utilisé pour inhiber l'activation de NF- κ B (Russo *et al.*, 2001).

Une méthode indirecte pour bloquer l'action du protéasome est d'inhiber la ligase qui ajoute les complexes ubiquitines sur I κ B α (Yaron *et al.*, 1997). Sans ubiquitination, le protéasome 26S ne reconnaît plus I κ B α et ne peut donc pas le dégrader.

4.3.4.3. Les inhibiteurs de phosphorylation de I κ B α

Un autre moyen d'inhiber l'activation de NF- κ B, est d'empêcher la phosphorylation de I κ B α . Ainsi, I κ B α ne pourra plus être ubiquitinée et donc, ne sera pas reconnue par le protéasome 26S. I κ B α pourra alors maintenir NF- κ B inactif dans le cytoplasme. Il existe de

INTRODUCTION

nombreux agents capables d'inhiber la phosphorylation de I κ B α . Ces agents sont soit originaires de plantes comme la sanguinarine (Chaturvedi *et al.*, 1997), de bactéries ou de virus comme la gliotoxine (Pahl *et al.*, 1996), soit des produits de synthèse chimique comme les molécules BAY-117821 ou BAY-117083 (Pierce *et al.*, 1997). L'inhibiteur de la phosphorylation le plus répandu reste l'aspirine (Frantz et O'Neill, 1995; Kopp et Ghosh, 1994; Yin *et al.*, 1998). Cette molécule inhibe non seulement la phosphorylation de I κ B α mais aussi en amont, toute la cascade des phosphorylations aboutissant à l'activation de IKK.

4.3.4.4. Les inhibiteurs du transport nucléaire de NF- κ B

Quelques molécules ont été décrites comme pouvant inhiber la translocation dans le noyau des complexes NF- κ B contenant la sous-unité P50. Ces agents saturant la machinerie des pores nucléaires responsables de cette translocation (Lin *et al.*, 1995). Parmi ces molécules, la leptomycin B (LBM) est celle la plus récemment décrite (Rodriguez *et al.*, 1999).

4.3.4.5. Les inhibiteurs de la liaison de NF- κ B à l'ADN ou de la transactivation

La classe la plus importante d'inhibiteurs non spécifiques de NF- κ B affecte la liaison à l'ADN du facteur de transcription et par conséquent, l'expression des gènes dépendant d'un site - κ B. Parmi ces nombreux inhibiteurs, la nicotinamide (Le Page *et al.*, 1998), le VEGF (Vascular Epidermal Growth Factor) (Oyama *et al.*, 1998) ou encore la dexaméthasone (DEX) (Auphan *et al.*, 1995; Scheinman *et al.*, 1995) sont les plus couramment cités dans la littérature.

4.3.4.6. I κ B α super-répresseur

Cette forme mutante de I κ B α , appelée super-répresseur, est l'inhibiteur le plus souvent utilisé dans les études portant sur les implications de NF- κ B dans divers processus. Ce super-répresseur ne peut être ni phosphorylé, ni dégradé, et présente l'avantage d'inhiber spécifiquement l'activité de NF- κ B. Cette forme d'I κ B α possède des mutations au niveau des sérines 32 et 36, acides aminés qui sont les cibles de phosphorylation par IKK. Ces sérines sont remplacées par des résidus alanine. Les lysines, représentant les sites de l'ubiquitination, sont elles aussi mutées et sont remplacées par des résidus arginine. Une autre forme de super-répresseur est délétée au niveau des 40 premiers acides aminés et ainsi, ne peut ni être phosphorylée, ni être ubiquitinée.

Ces I κ B α super-répresseurs interagissent donc avec NF- κ B et le séquestrent en permanence dans le cytoplasme. Quel que soit le stimulus, NF- κ B ne peut donc plus être activé (Bentires-Alj *et al.*, 1999; Van Antwerp *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996a).

4.4. Rôles de NF- κ B

NF- κ B intervient dans de nombreux processus cellulaires comme l'inflammation, la réponse immunitaire, l'adhésion, la croissance cellulaire et l'apoptose.

4.4.1. Fonctions de NF- κ B dans l'inflammation et la réponse immunitaire

Les réponses inflammatoires et immunitaires sont des processus physiologiques complexes jouant un rôle important dans l'homéostasie et la survie de l'organisme. Deux voies de signalisation cellulaire ont été mises en évidence comme étant des régulateurs de l'immunité et de l'inflammation :

- les cascades de signaux de transduction induits par NF- κ B,
- et les voies activées par les glucocorticoïdes (GR).

Le récepteur aux GR et NF- κ B sont des facteurs de transcription présentant des fonctions diamétralement opposées dans la régulation des réponses inflammatoires et immunes. Ainsi, NF- κ B a un rôle pro-inflammatoire et stimule le système immunitaire, alors que les ligands activant les GR sont des suppresseurs à la fois de l'inflammation et de la réponse immunitaire (McKay et Cidlowski, 1999). NF- κ B est connu pour induire l'expression d'un grand nombre de gènes codant :

- des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8...) (Duffey *et al.*, 1999),
- des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) et E-selectine,
- et des protéines chimio-attractantes comme la MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) qui entraîne le recrutement de cellules inflammatoires sur le site (Barnes et Karin, 1997).

4.4.2. Fonctions de NF- κ B dans la mise en place de l'apoptose

Le rôle de NF- κ B dans l'apoptose, que ce soit dans les cellules normales ou cancéreuses, a fait l'objet de nombreuses publications. Ces études décrivent trois modèles expliquant comment le facteur de transcription NF- κ B intervient dans la régulation de l'apoptose

- NF- κ B peut réguler directement des gènes induisant ou inhibant la mise en place de l'apoptose.
- NF- κ B peut sensibiliser ou protéger les cellules contre des signaux apoptotiques en régulant le cycle cellulaire.

INTRODUCTION

- NF- κ B peut également interagir avec des protéines cellulaires impliquées dans la survie de la cellule.

4.4.2.1. NF- κ B: facteur de transcription de gènes anti-apoptotiques

Suite à de nombreux stimuli pro-apoptotiques, NF- κ B est activé. Il induit alors l'expression de nombreuses protéines ayant une action anti-apoptotique. Ainsi, NF- κ B activé par le TNF, bloque la cascade des activations de caspases en régulant positivement l'expression de gènes codant des inhibiteurs de l'apoptose.

Plusieurs études ont démontré que les gènes cIAP1 et cIAP2 de la famille des "Inhibitors of Apoptosis", ainsi que les gènes TRAF1 et TRAF2 de la famille des "TNF Receptor Associated Factors", sont régulés positivement par NF- κ B (Chu *et al.*, 1997; Johannes *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). La co-expression de TRAF1, TRAF2, cIAP1 et cIAP2 bloque l'activation de la caspase 8 et inhibe ainsi l'apoptose induite par le TNF (Wang *et al.*, 1998).

La protéine IEX-1L, dont le gène est positivement régulé par NF- κ B, peut inhiber l'apoptose induite par l'activation de Fas ou du TNF-R (Wu *et al.*, 1998). Les mécanismes moléculaires d'action de IEX-1L restent encore peu connus.

La protéine A20 est une protéine à doigts de zinc qui peut inhiber l'apoptose induite par le TNF. Le gène codant pour cette protéine présente un site - κ B au niveau de son promoteur, et sa transcription est activée par NF- κ B (Krikos *et al.*, 1992).

Les protéines de la famille Bcl2 sont d'importants régulateurs cellulaires de l'apoptose (Reed, 1998). Cette famille comporte deux groupes, d'une part celui comprenant les protéines pro-apoptotiques et d'autre part celui représenté par les protéines anti-apoptotiques. Plusieurs études récentes ont démontré que NF- κ B peut réguler l'expression de certains de ces gènes. Ainsi, les gènes de la famille Bcl2, codant les protéines anti-apoptotiques A1, Bcl-X_L et Nr13 contiennent tous un site - κ B au niveau de leurs promoteurs (Chen *et al.*, 2000; Chen et Ghosh, 1999; Grumont *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999a; Lee *et al.*, 1999b; Wang *et al.*, 1999b; Zong *et al.*, 1999).

La protéine codée par le gène a1 bloque le relargage du cytochrome c par les mitochondries et inhibe l'activation de la caspase 3 (Wang *et al.*, 1999b). Récemment, il a été montré que dans les lymphomes de souris, le complexe P50/P50, décrit essentiellement comme une forme de NF- κ B non activatrice de la transcription, induit l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Kurland *et al.*, 2001).

INTRODUCTION

Le gène codant la protéine pro-apoptotique Bax, induit par P53, contient également un site κ B dans son promoteur. NF- κ B peut inhiber partiellement la transactivation du promoteur du gène bax par P53 dans les cellules de carcinomes coliques (Bentires-Alj *et al.*, 2001).

NF- κ B induit également l'expression de la protéine P21. Celle-ci est connue pour son action dans le contrôle du cycle cellulaire, et dans la réponse anti-apoptotique médiée par NF- κ B après une induction par le TNF α (Javelaud *et al.*, 2000). Quand la protéine P21 se situe dans le noyau, elle intervient dans la régulation du cycle cellulaire, alors que dans le cytoplasme, elle exerce un rôle anti-apoptotique (Asada *et al.*, 1999) en se fixant à la procaspase 3 et empêchant son activation (Suzuki *et al.*, 1998).

NF- κ B exerce une action anti-apoptotique en induisant l'expression de gènes anti-apoptotiques, ou en inhibant ou diminuant l'expression de gènes pro-apoptotiques.

4.4.2.2. NF- κ B : facteur de transcription de gènes pro-apoptotiques

Peu d'études ont démontré l'implication de NF- κ B en tant que médiateur de l'apoptose. Cependant, l'activation de NF- κ B par des agents de chimiothérapie ou des signaux d'activation des cellules T, a sensibilisé les cellules à ces agents, en induisant l'apoptose. NF- κ B entraîne cet effet en transactivant les gènes codant pour Fas (APO-1, CD95) ou son ligand (FasL), tous deux impliqués dans une voie activatrice de l'apoptose (Kasibhatla *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 1998).

Une induction de c-myc et de p53 par NF- κ B est possible (Nakai *et al.*, 2000). C-myc est impliqué dans la survie de certaines cellules comme les hépatocytes (Bellas et Sonenshein, 1999) et le rôle de P53 dans l'apoptose est largement démontré.

4.4.2.3. NF- κ B : régulateur du cycle cellulaire

Le lien entre le cycle cellulaire et le processus apoptotique résulte d'un mécanisme de balance entre la mort et la prolifération de la cellule (Evan et Littlewood, 1998; Kasten et Giordano, 1998). Plusieurs études ont décrit l'existence d'une coordination entre le cycle cellulaire et l'activité de NF- κ B. Cette dernière est augmentée au niveau des phases G₀/G₁ (Baldwin *et al.*, 1991).

NF- κ B peut induire l'expression de la cycline D1 qui est un régulateur essentiel dans le passage des cellules de la phase G₁ à la phase S. Par conséquent, l'inhibition de NF- κ B entraîne un retard ou un arrêt de la progression des cellules dans le cycle (Guttridge *et al.*, 1999; Hinz *et al.*, 1999).

INTRODUCTION

Le promoteur du gène de la cycline A peut également être activé par NF- κ B malgré l'absence de séquence - κ B, par un mécanisme moléculaire encore inconnu (Joyce *et al.*, 1999).

En plus de son activité comme facteur de transcription, NF- κ B peut s'associer à d'autres protéines telles que le complexe cycline E/Cdk2 intervenant dans la transition G₁/S (Chen *et al.*, 1998a). C'est la partie carboxy-terminale de la protéine c-Rel qui intervient dans cette interaction. Cependant, le rôle de cette association avec NF- κ B dans la régulation de l'activité de Cdk2 n'a pas été élucidé.

4.4.2.4. NF- κ B interagit avec des protéines cellulaires impliquées dans la régulation de l'apoptose

La majorité des études concernant le rôle de NF- κ B dans les mécanismes de l'apoptose porte sur son activité en tant que facteur de transcription. Cependant, NF- κ B peut aussi intervenir dans les mécanismes apoptotiques en interagissant avec d'autres protéines. Le meilleur exemple reste à l'heure actuelle, l'interaction avec les coactivateurs transcriptionnels : CBP (CREB-Binding Protein) et P300 (cf. paragraphe 4.5.).

NF- κ B et P53 sont tous deux activés en réponse à des traitements génotoxiques comme une irradiation ou une exposition à des drogues cytotoxiques. Ces deux facteurs de transcription sont activés *via* des régulations post-traductionnelles. Ils se retrouvent donc ensemble dans le noyau et jouent un rôle important dans la survie cellulaire. Or, l'action de NF- κ B et de P53 est le plus souvent antagoniste dans la mise en place de l'apoptose.

Il a été montré que P53 et NF- κ B exercent des effets répresseurs réciproques en utilisant chacune pour soi les co-facteurs P300 et CBP disponibles dans le noyau (Ravi *et al.*, 1998b; Wadgaonkar *et al.*, 1999; Webster et Perkins, 1999). Ainsi, NF- κ B peut inhiber l'apoptose P53-dépendante en monopolisant les co-facteurs nécessaires à P53 pour remplir son rôle de facteur de transcription.

4.4.2.5. NF- κ B : substrat des caspases

NF- κ B joue aussi un rôle dans le phénomène apoptotique *via* les caspases. Ces dernières clivent leurs substrats au niveau de séquences consensus spécifiques (Nunez *et al.*, 1998). Ces substrats peuvent être divisés en deux catégories :

- la première comportent des protéines structurales de la cellule telles que l'actine ou les lamines nucléaires. La dégradation de ces protéines par les caspases entraîne la déstructuration de la cellule.

INTRODUCTION

- la seconde catégorie comprend des protéines régulatrices de l'apoptose qui sont activées ou inactivées par le clivage qu'assurent les caspases. Par exemple, le clivage de la protéine anti-apoptotique Bcl2 induit la mort cellulaire. Les protéines Rel appartiennent à cette catégorie. En effet, les protéines formant les complexes NF- κ B peuvent être des substrats des caspases. Ainsi, l'équipe de Ravi, ont pu observer que l'apoptose des cellules Jurkat induite par Fas, est accompagnée d'un clivage protéolytique des protéines P50 et P65 qui dépend de l'activité de la caspase 3 (Ravi *et al.*, 1998a). La protéine c-Rel possède trois sites de coupure par la caspase 3 (Barkett et Gilmore, 1999). c-Rel peut être clivée par la caspase 3 après un traitement par du TNF ou par un inhibiteur du protéasome. Dans tous les cas, l'inactivation de NF- κ B due à sa protéolyse par des caspases entraîne une suppression de son rôle anti-apoptotique.

Par ailleurs, I κ B α est aussi un substrat des caspases. Une fois clivée, la protéine I κ B α devient une forme naturelle de super-répresseur de NF- κ B lequel ne peut alors plus être activé. Une fois de plus, l'action des caspases, ici *via* I κ B α , empêche NF- κ B de jouer son rôle anti-apoptotique en induisant des gènes comme TRAF ou IAP (Barkett et Gilmore, 1999).

4.4.2.6. Conclusion NF- κ B et apoptose

NF- κ B intervient ainsi au niveau des processus apoptotiques en induisant l'expression de gènes ou en interagissant avec des protéines impliquées dans le cycle cellulaire ou dans la survie cellulaire. NF- κ B inhibe ou induit l'apoptose suite à une stimulation telle que celle provoquée une chimiothérapie ou encore par des rayonnements ionisants. Les mécanismes par lesquels NF- κ B choisit sa fonction restent mal connus. Cependant, la fonction pro- ou anti-apoptotique de NF- κ B serait déterminée par la nature du stimulus apoptotique (Kaltschmidt *et al.*, 2000). La fonction anti-apoptotique de NF- κ B reste celle qui est la plus décrite. En effet, de nombreuses études, sans donner d'explications moléculaires, décrivent une induction de l'apoptose après une inhibition de l'activité de NF- κ B (Giri et Aggarwal, 1998; van Hogerlinden *et al.*, 1999).

4.5. NF- κ B interagit avec d'autres facteurs et co-facteurs de transcription

Comme pour beaucoup de facteurs de transcription, l'activité de NF- κ B est modulée par des interactions avec des protéines nucléaires. Ces protéines peuvent agir de façon antagoniste ou synergique avec NF- κ B selon le contexte.

INTRODUCTION

4.5.1. Facteurs de transcription

La sous-unité P65 de NF- κ B peut interagir directement avec des facteurs généraux de transcription comme TFIIB (Transcription Factor II B) et TBP (Schmitz *et al.*, 1995). Dans les cellules de mammifères, une interaction fonctionnelle entre P65 et TBP active la transcription dépendante de NF- κ B (Kerr *et al.*, 1993).

NF- κ B peut aussi se lier au complexe AP-1. Cette interaction se fait au niveau du domaine Rel de P65 et avec la région bZIP des protéines Jun et Fos. AP-1 potentialise l'activité de NF- κ B (Stein *et al.*, 1993).

4.5.2. Co-facteurs transcriptionnels

Un grand nombre de facteurs de transcription interagissent avec des protéines nucléaires identifiées comme étant des co-facteurs transcriptionnels. Ces derniers ont la capacité d'augmenter ou de diminuer les fonctions transactivatrices des facteurs de transcription (Merika *et al.*, 1998). Parmi ces co-facteurs, les protéines P300 et CBP sont des co-activateurs de plusieurs facteurs de transcription. Ils activent notamment la protéine P65 de NF- κ B (Gerritsen *et al.*, 1997). Ces co-facteurs interagissent avec P65 au niveau de nombreux domaines et cette interaction peut être régulée par des phosphorylations de P65 grâce à l'activité de la protéine kinase A associée à I κ B (Zhong *et al.*, 1998).

Ces co-facteurs interagissent avec différentes protéines comme les récepteurs nucléaires, TFIIB, le complexe cycline E/Cdk2, c-myc, P53 et P65. La compétition de liaison des co-facteurs avec les différents facteurs de transcription joue un rôle important dans l'aboutissement de plusieurs voies de signalisation cellulaire (Janknecht et Hunter, 1996). Par exemple, si la quantité de P300 disponible est plus faible que la quantité de P65, cela va limiter la transactivation induite par le complexe NF- κ B contenant P65 (Hottiger *et al.*, 1998) (Sheppard *et al.*, 1998).

La protéine Bcl3 a été considérée au départ comme un inhibiteur de NF- κ B. A présent, cette protéine est mieux connue comme co-activateur transcriptionnel de l'homodimère P50 (Bours *et al.*, 1993). Des interactions de NF- κ B avec d'autres co-facteurs tels que le co-répresseur STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Bennett *et al.*, 1997) et le co-activateur STAT1 (Ohmori *et al.*, 1997) ont été décrits.

4.6. NF- κ B : radio- et chimiosensibilité

NF- κ B est activé par des agents cytotoxiques (Daunorubicine, CPT-11, etc.) ou encore des radiations ionisantes. Ce facteur de transcription est impliqué dans la réponse apoptotique des cellules suite à ce type de traitement. De nombreuses études ont été réalisées pour évaluer l'implication de l'activité du facteur de transcription NF- κ B dans la réponse cellulaire et dans la sensibilité aux traitements chimio- et radiothérapeutiques.

4.6.1. NF- κ B est la radiosensibilité

Durant ces quatre dernières années, plusieurs équipes se sont intéressées aux relations pouvant exister entre la radiosensibilité intrinsèque des cellules et l'activité de NF- κ B. La quasi-totalité de ces travaux ont utilisé la même approche, c'est-à-dire, que les cellules ont subi différents traitements afin de diminuer ou d'inhiber l'activité et/ou l'activation de NF- κ B avant l'irradiation et ensuite étudier leur réponse aux radiations ionisantes.

Selon les études, différentes techniques sont utilisées afin d'inhiber l'activité de NF- κ B. La méthode la plus courante reste la transfection des cellules par un vecteur contenant le gène codant la protéine I κ B α super-répresseur. Ainsi, récemment, l'équipe de Pajonk a mis en évidence dans des cellules cancéreuses de prostate et de lymphome d'Hodgkin, que l'inhibition de NF- κ B par I κ B α super-répresseur ne modifiait pas la radiosensibilité de ces types cellulaires. (Pajonk *et al.*, 1999). Par contre, d'autres études ayant utilisé ce même procédé pour inhiber NF- κ B, mais sur des cellules de cancer ORL humain (Kato *et al.*, 2000) ou sur des fibroblastes (Wang *et al.*, 1996a), ont montré que l'inhibition de l'activation de NF- κ B entraîne une augmentation de la radiosensibilité des cellules.

L'équipe de Yamagishi a obtenu des résultats similaires avec des cellules de glioblastomes humains, mais ces auteurs ont inhibé l'activité de NF- κ B en transfectant les cellules par le gène codant la forme naturelle de I κ B α . I κ B α est alors surexprimée, ce qui entraîne donc la séquestration intracytoplasmique d'un plus grand nombre de complexes NF- κ B (Yamagishi *et al.*, 1997).

Dernièrement, l'effet de NF- κ B dans la radiosensibilité a été étudié en empêchant l'activité de ce facteur de transcription par des inhibiteurs de protéasomes. Un prétraitement de cellules de lymphomes d'Hodgkin par l'inhibiteur de protéasomes MG-132, entraîne une augmentation de l'apoptose radio-induite accompagnée d'une radiosensibilisation des cellules (Pajonk *et al.*, 2000). De même, un prétraitement par un autre inhibiteur de protéasomes, le PS-341, induit les mêmes effets dans l'apoptose et la radiosensibilité de cellules de cancers colorectaux

INTRODUCTION

(Russo *et al.*, 2001). Ce dernier travail mené à la fois *in vitro* et *in vivo*, fait état d'une réduction de 84% du volume tumoral initial. Les auteurs encouragent donc l'utilisation du PS-341 en clinique en tant que radiosensibilisant.

La quasi-totalité de ces études démontre donc que l'inhibition de NF- κ B par diverses techniques, entraîne une augmentation de la radiosensibilité des cellules en étroite relation avec une augmentation de la réponse apoptotique.

La seule étude contre disant ces résultats (Pajonk *et al.*, 1999) a été fortement controversée par l'équipe de Russo (Russo *et al.*, 2001). En effet, à la fois les techniques utilisées et les interprétations de Pajonk *et al.*, ont été remises en question. Il semble que l'inhibition de NF- κ B dans les cellules de prostates et les lymphomes d'Hodgkin, entraîne une forte augmentation de l'apoptose radio-induite, ce qui sous-entend une augmentation de la radiosensibilité des cellules. Ainsi, l'ensemble des auteurs propose un pré-traitement visant à inhiber l'activité NF- κ B avant radiothérapie.

4.6.2. NF- κ B et la chimiosensibilité

L'activité de NF- κ B a également fait l'objet d'études sur la sensibilité des cellules à plusieurs agents de chimiothérapie.

L'approche est similaire à celle des études recherchant des relations entre NF- κ B et la radiosensibilité. Les auteurs inhibent l'activation de NF- κ B puis étudient ensuite l'impact de cette inhibition sur la sensibilité des cellules à différentes molécules.

Pour des fibroblastes, l'inhibition de NF- κ B par la protéine I κ B α super-répresseur, entraîne une augmentation de la réponse apoptotique des cellules à un traitement par la daunorubicine (Wang *et al.*, 1996a).

Par contre, l'étude de Bentires-Alj réalisée sur des cellules leucémiques ou d'adénocarcinomes humains, démontre que l'inhibition de NF- κ B par la même forme mutée de I κ B α , n'induit aucune modification de la cytotoxicité de la mytomicine C, du taxol®, de la vinblastine, de la camptothécine, ni de la daunorubicine ; alors que l'ensemble de ces traitements provoquent une augmentation de l'activité de NF- κ B en absence de I κ B α muté (Bentires-Alj *et al.*, 1999). Les auteurs de cette étude n'excluent pas l'implication de NF- κ B dans la sensibilité des cellules aux agents utilisés en chimiothérapie. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans les phénomènes de résistance à ces agents sont très complexes et surtout très variables selon les cellules considérées. Ces variations peuvent avoir pour origine :

INTRODUCTION

- le phénotype MDR (Multi Drug Resistance),
- des mutations de protéines impliquées dans l'apoptose ou dans le cycle cellulaire,
- le niveau de glutathion intracellulaire,
- les altérations de l'activité de topoisomérases II...

Aussi, il semble essentiel de déterminer pour chaque type de cellule cancéreuse si NF- κ B est la molécule caractéristique de leur niveau de sensibilité.

Plusieurs études concernant l'implication de l'activité de NF- κ B dans la sensibilité des cellules au CPT-11 ont également été réalisées. Après transfection *in vivo* du gène codant la protéine I κ B α super-répresseur, l'équipe de Wang a observé une augmentation de la sensibilité des cellules au CPT-11, ainsi qu'une diminution du volume tumoral (Wang *et al.*, 1999a). Après inhibition du protéasome par le PS-341, l'apoptose induite par le CPT-11 est significativement augmentée et le volume des tumeurs colorectales diminué (Cusack *et al.*, 2001). Un an auparavant, cette même équipe a démontré sur un panel de lignées cellulaires de cancers colorectaux ainsi que sur des modèles de xénogreffes, que l'inhibition de NF- κ B par la protéine mutée de I κ B α , entraîne une augmentation de l'apoptose induite par le CPT-11 et les auteurs ont conclu qu'en empêchant l'activation de NF- κ B par le CPT-11, les cellules n'induisent plus de processus de chimiorésistance (Cusack *et al.*, 2000). Enfin, l'inhibition de NF- κ B par la transfection de I κ B α super répresseur dans des lignées cellulaires issues de cancers ORL humains, n'induit pas de sensibilisation des cellules au cisplatine (Kato *et al.*, 2000).

4.7. Conclusion

Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans différents processus cellulaires comme la réponse immunitaire, l'inflammation, et la régulation de l'apoptose. Son activité est induite après divers stimuli tels que les radiations ionisantes. Ainsi, ces dernières années plusieurs équipes se sont intéressées à l'implication de NF- κ B dans la réponse cellulaire aux radiations ionisantes.

La majorité des études réalisées *in vitro* et *in vivo*, portant sur cette implication, présentent les mêmes conclusions quelle que soit l'origine cellulaire. L'inhibition de l'activation de NF- κ B par divers procédés, augmente la radiosensibilité et la réponse apoptotique. Les auteurs de ces études proposent d'inhiber NF- κ B par voie chimique avant radiothérapie afin d'augmenter l'efficacité du traitement. Par contre, l'implication de l'activité de NF- κ B dans la sensibilité des cellules aux agents utilisés en chimiothérapie reste controversée. Il semble que l'origine tumorale, ainsi que le type de molécules de chimiothérapie, entraînent une importante variation dans les résultats. Les auteurs expliquent ces divergences de résultats par les nombreuses voies moléculaires impliquées dans les phénomènes de résistance. L'inhibition de NF- κ B avant chimiothérapie n'est que très rarement préconisée.

CHAPITRE 5

MATERIELS ET METHODES

5. MATERIELS ET METHODES

5.1. Lignées cellulaires

La lignée KB (carcinome épidermoïde oral, ATCC CCL17) a été fournie par le Pr. A. Hanauske (Université de Munich) par l'intermédiaire du programme d'échange du PTMG "Preclinical Therapeutic Models Group" de l'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer). Les clones KB3, KB7 et KB8 ont été développés à partir de la lignée mère KB, au laboratoire de Recherche en Oncologie du Centre Alexis Vautrin. Celle-ci a été exposée au 5FU durant plusieurs cycles d'une semaine, puis elle a été clonée en utilisant la technique des dilutions limites. Les clones KB3, KB7 et KB8 obtenus, sont maintenus en culture sans pression de 5FU et leur indice de résistance (IC_{50}) au 5FU est vérifié toutes les trois semaines.

Ces lignées cellulaires codent pour une protéine P53 sauvage (Mirjolet et al. 2000) et sont infectées par le virus HPV-18 (Boshart et al. 1984).

L'ensemble de ces lignées sont cultivées en monocouche dans un incubateur Cytoperm Heraeus (Merck, Nogent-sur-Marne, France) maintenues à 37°C et sous une atmosphère contenant 5 % de CO_2 et 95 % d'humidité. L'entretien des lignées cellulaires s'effectue de façon hebdomadaire dans des flacons de culture de 75 cm² de marque Costar (Dutscher, Brumath, France). Après décollement du support par une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), la suspension cellulaire est numérée en présence de bleu trypan dilué au 1/10^{ème} puis 10⁴ cellules/ml sontensemencées dans 15 ml de milieu de culture de type RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté par 9 % de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur (Dutscher), 100 UI/ml de pénicilline (Invitrogen), 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen).

5.2. Analyse du temps de doublement

Afin de déterminer, pour chaque lignée cellulaire, le temps de doublement et le début de la phase exponentielle, des courbes de croissances ont été réalisées en utilisant le test de viabilité au bleu trypan (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Les cellules sont ensemencées à 10^4 cellules/ml dans des boîtes de culture six puits, puis sont trypsinée et comptées tous les jours durant sept jours. Chaque point est le résultat de trois mesures. Une linéarisation de la courbe de croissance peut être obtenue en représentant le logarithme du nombre de cellules en fonction du temps. Il est ensuite possible de calculer le temps de doublement par la formule suivante : $TD = y/p$, où TD représente le temps de doublement, y, le $\log_2$ et p, la pente de la droite.

5.3. Etudes de la survie cellulaire

La survie cellulaire a été mesurée par un test MTT après traitement par 5FU, et par essais clonogéniques après traitement par irradiation.

5.3.1. Sensibilité au 5FU

La sensibilité au 5FU est déterminée par le test MTT. Cette méthode colorimétrique, utilisant le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, Sigma) permet de mesurer la prolifération cellulaire et d'évaluer la cytotoxicité de xénobiotiques. Le MTT est un composé jaune pâle dont la métabolisation par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes entraîne la formation de cristaux de formazan de coloration brune.

Cet essai est réalisé en plaques 96 puits (Dutcher). Dans chaque puits sont déposés 200 μ l de suspension cellulaire à 10^4 cellules/ml. Après 96 h d'incubation, différentes concentrations de 5FU (0,01-5000 μ g/ml) sont ajoutées (20 μ l/puits) et laissées en contact pendant 72 h. Ensuite, chaque puits reçoit 50 μ l d'une solution de MTT à 2,5 mg/ml diluée dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, In Vitrogen). Après 3 h de contact à 37°C, nécessaires à la métabolisation du colorant, l'intégrité cellulaire est détruite par addition de 50 μ l de SDS (dodécylsulfate de sodium, Sigma) à 25 % (m/v) et l'absorbance est lue à 540 nm par un lecteur de microplaques Titertek Multiskan® MCC/340 (LabSystem, Cergy-Pontoise, France). Le zéro est déterminé à partir de puits contenant du milieu de culture, du tampon de dilution des xénobiotiques, de la solution de MTT et du SDS mais sans cellule ni xénobiotique.

Les valeurs de concentration permettant d'aboutir à un effet inhibiteur de 50 % sur la croissance cellulaire (IC_{50}) sont calculées d'après la méthode de l'équipe de Chou (Chou and Talalay 1987). Elle est basée sur l'équation :

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m} \right)^m$$

où f_a représente la fraction de cellules affectée par la dose D , f_u représente la fraction non affectée, D_m est la dose requise pour produire un effet médian et m est un coefficient appelé "Hill-type coefficient" caractérisant l'allure sigmoïde de la courbe. Le tracé $y=f(x)$, où $y=\log(f_a/f_u)$ et $x=\log(D)$ est une linéarisation de la courbe représentant l'effet-dose avec une pente de valeur m , un coefficient de corrélation r et une ordonnée à l'origine égale au $\log$ de D_m .

5.3.2. Sensibilité aux radiations ionisantes (^{60}Co)

La radiosensibilité des différentes lignées cellulaires a été déterminée par une technique d'essais clonogéniques en double couche d'agar. Cette méthode permet de mesurer la quantité de cellules dites clonogéniques, c'est-à-dire vivantes et capables de se diviser afin de former une colonie.

Cet essai est réalisé en plaques P6 (Costar). Dans chaque puits est coulée une sous couche d'1 ml d'agar (Bacto Agar, Difco, Detroit, MI) à 0,5 % dissous dans du RPMI contenant tout les suppléments décrit dans le paragraphe 5.1. Les suspensions cellulaires ont été ajustées en milieu RPMI complet contenant 0,3 % d'agar, puisensemencées au dessus des sous-couches, avec un volume de 1 ml par puits. Les plaques de cultures sont ensuite incubées dans les mêmes conditions que les boîtes de culture cellulaire en monocouche.

Pour chaque lignée cellulaire étudiée, des tests de linéarité ont été réalisés afin de déterminer le nombre optimal de cellules à ensemenecer de façon à obtenir à J14, entre 300 et 400 colonies dans les puits non irradiés. Ainsi les lignées KB, KB7 et KB8 ont été ensemenecées à 2000 cellules par puits et la lignée KB3 à 3000 cellules par puits.

Après ensemenecement, les cellules sont incubées pendant 1 h, puis irradiées à différentes doses (0,5 à 10 Gy) par une unité Theratron 780c ^{60}Co (Theratronics, Ottawa, Canada).

Après 14 jours d'incubation, les colonies sont comptées de façon semi-automatique avec le logiciel Inspector (Matrox, Canada). Seules les colonies de plus de 50 μm de diamètre sont prises en compte. Chaque point expérimental est issu de trois mesures répétées au moins trois fois.

Les résultats sont normalisés par rapport au contrôle non irradié afin d'obtenir des pourcentages de survie des cellules aux radiations.

Les courbes doses-réponses obtenues sont ajustées selon le modèle Linéaire et Quadratique défini par l'équation :

$$S=e^{-\alpha D-\beta D^2}$$

Les paramètres de radiosensibilité α , β et SF₂ (Surviving Fraction at 2 Gy) sont calculés selon Thames et al. (Thames et al. 1986).

5.4. Analyse du cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux est réalisée par un marquage des cellules par l'iodure de propidium (IP).

Le principe de cette technique repose sur un contenu des cellules en ADN différent selon les phases du cycle cellulaire.

L'IP a la propriété de s'intercaler dans l'ADN et le complexe acide-nucléique-IP ainsi formé fluoresce dans le rouge (600-650 nm) après une excitation à 488 nm. Ainsi, la fluorescence rouge d'une cellule marquée à l'IP sera proportionnelle à son contenu en ADN.

Après un traitement par une IC₅₀ de 5FU, ou après une irradiation à 2 ou 10 Gy, les cellules sont récupérées par trypsination. Les cellules sont ensuite lavées une fois avec du PBS froid, puis incubées durant 24 h à 4°C avec 2 ml de solution d'IP (Tableau 1). Durant cette incubation, les cellules sont perméabilisées par du Triton et l'IP peut ainsi s'intercaler dans l'ADN.

Tableau 1 : Composition de la solution d'IP

Citrate de sodium (m/v), Sigma)	0,1 %
Triton X100 (v/v, Sigma)	0,1 %
Iodure de propidium (Sigma)	50 mg/ml
H₂O	Qsp

Les cellules sont ensuite centrifugées 10 min à 400 g (Centrifugeuse Jouan GRA-12) à température ambiante, puis resuspendues dans 200 µl de PBS auxquels sont ajoutés 5 µl de RNase (50 µg/ml) (Sigma). Etant donné que l'IP s'intercale à la fois au sein des molécules d'ADN et d'ARN double-brin, les ARN sont éliminés par la RNase.

L'acquisition des échantillons se fait par cytométrie en flux (Cell Quest, FACSCalibur, Becton Dickinson), et l'analyse des cycles est réalisée par le logiciel ModFit LT™ (Becton Dickinson)

selon le modèle de Dean et Jett (Dean and Jett 1974). Pour chaque échantillon, un minimum de 10000 événements sont analysés. Les résultats présentés sont la moyenne d'au moins 3 expérimentations indépendantes.

5.5. Détection de l'apoptose

La détection des cellules apoptotiques se fait par un double marquage des cellules à la fois par l'IP et par l'annexine-V couplé au fluorochrome FITC, puis par une analyse par cytométrie en flux.

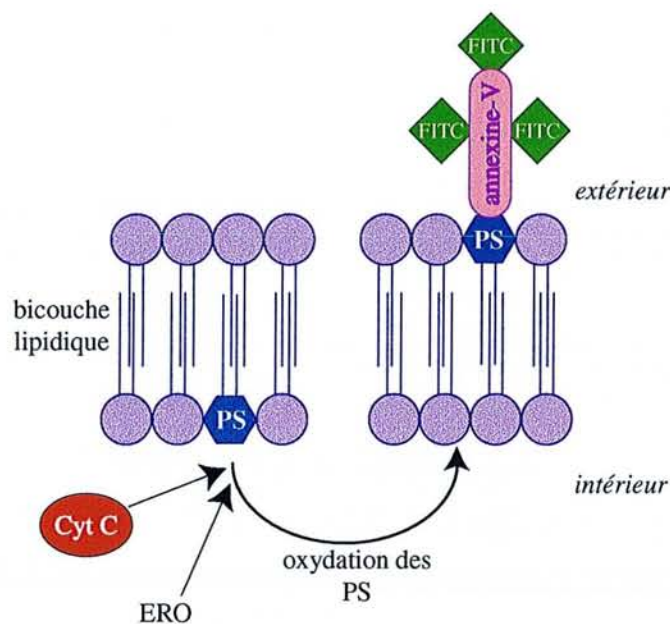


Figure 14 : Principe du marquage des cellules apoptotiques par l'annexine-V
Cyt C: Cytochrome C; PS: Phosphatidylsérine, ERO : espèces réactives de l'oxygène.

L'analyse se fait à partir de cellules fraîches. Ainsi, l'IP marque uniquement les cellules perméabilisées, c'est-à-dire celles qui sont en nécrose ou en apoptose tardive.

Durant la période précoce de la mise en place de l'apoptose, des cytochromes C sont libérés par les mitochondries. Les cytochromes C étant chargés positivement, ils interagissent avec les charges négatives des phosphatidylsérines (PS) situées sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Des espèces réactives de l'oxygène (ERO), formées durant cette réaction, entraînent l'oxydation des PS qui subissent alors une externalisation. (Kagan et al. 2000). Les molécules d'annexine-V ayant une affinité pour ces PS, peuvent ainsi s'y fixer et les marquer grâce à leur complexation avec des fluorochromes FITC (Figure 14).

Après un traitement par une dose d'IC₅₀ de 5FU, ou après une irradiation à 2 Gy, ou après une incubation par de la dexaméthasone ou du TNF α , les cellules en monocouche sont lavées par 5 ml de PBS puis décollées par une incubation de 5 min par une solution de RPMI contenant 5 mM d'EDTA (Sigma). Le surnageant de la culture cellulaire, le lavage au PBS ainsi que la suspension obtenue après décollement, sont récupérés dans un même tube et maintenus à 4°C jusqu'à l'analyse de l'échantillon.

Après une centrifugation durant 10 min à 400 g, le culot est lavé par 20 ml de PBS froid (afin d'éliminer toutes traces d'EDTA, car celui-ci est un chélateur de calcium, élément indispensable à la fixation de l'annexine-V sur les phosphatidylserines). Les cellules sont à nouveau centrifugées puis comptées au bleu trypan. 10⁵ cellules sont récupérées, centrifugées puis repercent dans 100 μ l de tampon de "binding" (Tableau 2) auxquels sont ajoutés 4,5 μ l d'annexine-V FITC (Pharmingen) et 1 μ l d'IP à 50 μ g/ml. Après 15 min d'incubation à l'obscurité et à 4°C, 400 μ l de tampon de "binding" sont ajoutés, puis les échantillons sont analysés par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson). Pour chaque échantillon, un minimum de 10000 événements sont analysés.

Tableau 2 : Composition du tampon de "binding"

Hepes / NaOH	10 mM, pH 7,4
NaCl	140 mM
CaCl ₂	2,5 mM

Le pourcentage de cellules en apoptose est calculé par le ratio: quantité de cellules en apoptose précoce (Figure 15). Certaines cellules en nécrose présentent une bicouche complètement désorganisée que des phosphatidyl sérines peuvent être externalisées sans induction moléculaire pro-apoptotique. Ces cellules sont alors présentes en B (Figure 15). Afin d'éviter de comptabiliser ces cellules comme étant en apoptose, nous ne prenons en compte uniquement les cellules en apoptose précoce, présentes en D (Figure 15). Les résultats présentés sont la moyenne d'au moins 3 expérimentations indépendantes.

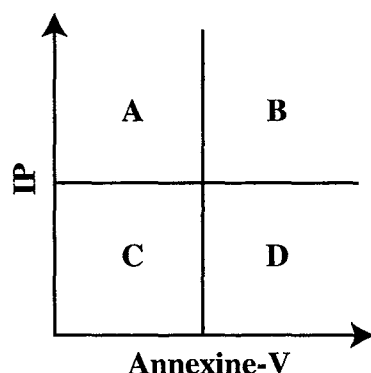


Figure 15 : Analyse de la détection de l'apoptose par la technique de l'annexine-V. A : cellules en nécrose ; B : cellules en apoptose tardive ou en nécrose ; C : cellules vivantes ; D : cellules en apoptose précoce.

5.6. Analyse de l'expression des gènes

5.6.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits selon la méthode de (Chomczynski and Sacchi 1987), à l'aide du réactif TRIzol® (Invitrogen) qui est une solution de phénol et d'isothiocyanate de guanidine. Le TRIzol® maintient l'intégrité des ARN lors de la dissociation des différents composants cellulaires. L'addition de chloroforme suivie d'une centrifugation sépare la solution en une phase aqueuse et une organique. Les ARN restent exclusivement dans la phase aqueuse. Après récupération de cette phase, les ARN sont précipités par addition d'isopropanol.

Après récupération des cellules par trypsination, et lavage au PBS, un culot d'environ $5 \cdot 10^6$ cellules est repris dans 1 ml de TRIzol®. Après 5 min de contact à température ambiante, 0,2 ml de chloroforme (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) sont ajoutés, et mélangés par agitation vigoureuse du tube durant 15 s. Après un repos de 2 à 3 min à température ambiante, les tubes sont centrifugés à 12000 g pendant 15 min à 4°C (Centrifugeuse Jouan MR18-22). La phase aqueuse obtenue est transférée dans un nouveau tube et 0,5 ml d'isopropanol (Prolabo) y sont mélangés par agitation douce. Après 10 min à température ambiante, les tubes sont centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est ensuite lavé par 1 ml d'éthanol à 75 % (Prolabo) puis centrifugé à 7500 g pendant 5 min à 4°C. L'éthanol est éliminé par aspiration puis par évaporation en plaçant les tubes ouverts à 37°C quelques minutes (bain sec, Fischer, Bioblock Scientific, Illkirch, France). Le culot est ensuite resuspendu dans 50 µl d'eau DEPC (diéthyl pyrocarbonate, inhibiteur de nucléases).

La concentration en ARN est évaluée par mesure de l'absorbance (DO, densité optique) à 260 nm d'une aliquote de l'échantillon diluée au 1/200^{ème} et placée dans une cuve en quartz de trajet optique 5 mm (Merck-Eurolab, Fontenay-sous-Bois, France).

Cette même dilution permet d'évaluer la qualité de la préparation d'ARN par la mesure de la DO à 280 nm (absorbance des protéines) et le calcul du rapport $R = DO_{260nm} / DO_{280nm}$. La préparation est qualifiée de non contaminée par les protéines, et donc de bonne qualité, si $R > 1,8$.

5.6.2. Transcription inverse (RT)

La réaction de transcription (RT) inverse permet de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'un ARNm.

La RT est réalisée dans un tube à PCR à paroi fine (650 µl, Sorenson, BioSceinces Inc, Dutcher, Brumath) à partir d'1 µg d'ARN totaux dans un volume de 11 µl (complété avec de l'eau DEPC). 1 µg d'amorces aléatoires (100 ng/µl, Random Primers, Invitrogen) est ajouté à cette solution. Après une incubation de 10 min à 70°C, les tubes sont transférés sur un bain de glace afin de permettre l'appariement des amorces. Dans chaque tube sont alors ajoutés: 4 µl de tampon de synthèse 5 X, 1 µl de désoxynucléotides triphosphates à 10 mM, 2 µl de dithiotréitol à 0,1 M et 200 unités de transcriptase inverse (Superscript II). L'ensemble de ces produits proviennent de chez Invitrogen.

Après 10 min à température ambiante, les tubes sont incubés 50 min à 42°C (phase de synthèse de l'ADN complémentaire), puis 15 min à 70°C (phase de dégradation de l'enzyme). Afin d'éliminer les ARN restant, 2,5 unités de RNase H sont ajoutées à chaque échantillon puis les tubes sont incubés durant 20 min à 37°C. Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

5.6.3. Amplification en chaîne de l'ADN (PCR)

La PCR permet l'amplification sélective de gènes cibles à partir d'ADNc grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques des gènes codant pour les protéines P21, P53 et E6/E7 du virus HPV-18 (Tableau 3).

L'étude de l'expression de ces gènes est réalisée par PCR semi-quantitative. Le gène de référence utilisé est le gène codant pour la β_2 -microglobuline (β_2m).

MATERIELS et METHODES

Tableau 3 : Descriptif des amorces spécifiques utilisées pour les différentes PCR

Gènes		Amorces (5' – 3')
p21	Sens	CCC AGT GGA CAG CGA GCA GC
	Anti-sens	ACT GCA GGC TTC CTG TGG GC
p53	Sens	TCT GTG ACT TGC ACG TAC TC
	Anti-sens	CAC GGA TCT GAA GGG TGA AA
e6/e7 HPV18	Sens	AAC ACG GCG ACC CTA CAA GCT
	Anti-sens	AAT GTT GCC TTA GGT CCA TGC
β₂m	Sens	ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA
	Anti-sens	ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG

Pour chaque PCR, cinq paramètres ont été optimisés successivement :

- la température d'appariement des amorces : 51, 53, 55, 57 et 59°C,
- la concentration en MgCl₂ : 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 et 3 mM
- le ratio des amorces gènes cibles / β2M : 0,5/1 ; 1,5/1 ; 2/1 ; 1/1 ; 1/0,5 ; 1/1,5 et 1/2,
- le nombre de cycles d'amplification : 26, 28, 30, 32 et 34 cycles,
- la quantité d'ADNc : 0,25 ; 0,50 ; 0,75 ; 1,00 ; 1,25 et 1,50 µl.

Pour les PCR p53 et p21, dans chaque tube à paroi fine (650 µl, Sorenson, BioSciences Inc, Dutcher, Brumath), sont ajoutés les différents réactifs nécessaires à l'amplification du gène cible (Tableau 4).

Pour le gène E6/E7, la PCR est réalisée par la technique "hot start", dans des tubes avec paraffine intégrée (PolyLabo).

MATERIELS et METHODES

Tableau 4 : Composition du mélange pour les différentes amplification de gènes

PCR	p53	p21	E6/E7 HPV 18
ADNc	0,5 µl	1 µl	5 µl
Tampon de PCR 10 X (Invitrogen)	2 µl	2 µl	6 µl + 4 µl
MgCl ₂ (25 mM, Sigma)	1,6 µl	1,2 µl	8 µl
dNTP (2,5 mM, Invitrogen)	1,6 µl	1,6 µl	8 µl
Amorce cible sens (5 µM)	2 µl	2 µl	10 µl
Amorce cible anti-sens (5 µM)	2 µl	2 µl	10 µl
Amorce β2m sens (5 µM)	2 µl	2 µl	10 µl
Amorce β2m anti-sens (5 µM)	2 µl	2 µl	10 µl
Taq DNA polymérase (Invitrogen, 5 U/µl)	0,2 µl	0,2 µl	1 µl
H ₂ O	qsp 20 µl	qsp 20 µl	qsp 100 µl

Après avoir été vortexés et centrifugés, les tubes sont placés dans un thermocycleur (Matercycler ® gradient, Eppendorf, Polylabo, Strasbourg, France) permettant d'alterner les phases de dénaturation, appariement et synthèse (Tableau 5).

Tableau 5 : Cycles d'amplification des différents gènes cibles

PCR	p53/β2m	p21/β2m	E6-E7/ β2m
95°C	5 min	5 min	5 min
Amplification	33 cycles	36 cycles	28 cycles
Dénaturation	94°C, 30 sec	94°C, 30 sec	95°C, 1 min
Appariement	57°C, 1 min	57°C, 1 min	58°C, 1 min
Synthèse	72°C, 1 min	72°C, 1 min	72°C, 1 min
72°C	8 min	8 min	7 min
4°C		infini	

5.6.4. Analyse des produits d'amplification

L'analyse des échantillons après PCR est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose.

4 µl de tampon de dépôt (Tableau 6) sont ajoutés aux produits de PCR, puis 10 µl sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose (Invitrogen) contenant 10 µg/ml de BET (bromure d'éthidium, Sigma).

MATERIELS et METHODES

Tableau 6 : Composition du tampon de dépôt

Bleu de bromophénol (Bio Rad)	0,25 %
Bleu de xylène-cyanol (Sigma)	0,25 %
TBE 10X (Invitrogen)	10 %
Glycérol (Sigma)	50 %
H₂O	qsp

La migration se fait dans un tampon de TBE (Tris-Borate-EDTA, Invitrogen). Les conditions de migration sont différentes selon la taille des produits d'amplifications (Tableau 7).

Tableau 7 : Taille des fragments d'amplification et conditions de migration pour les différents gènes étudiés

PCR	Taille (pb)	Agarose	TBE	Migration
p53 - β_2m	640 - 120	1 %	1 X	100 V, 3h00
p21 - β_2m		1 %	0,5 X	100 V, 2h30
E6-E7 - β_2m		1 %	0,5 X	100 V, 2h00

Après migration, les bandes d'ADN sont visualisées par transillumination UV grâce à la fluorescence du BET intercalé dans l'ADN. Le système d'analyse d'image utilisé est de type Gel Doc 1000 (logiciel Molecular Analyst® v1.2, Bio Rad). Pour chaque échantillon, le *ratio* d'expression relative (RER) est calculé. Il représente l'intensité de fluorescence de la bande du gène cible sur l'intensité de fluorescence de la bande du gène de référence, notamment la β_2 -microglobuline. Chaque RER correspond à la moyenne de trois expérimentations indépendantes réalisées en triplicata.

5.7. Analyse de l'expression de protéines par western blot

La détection des protéines P53, E6, E7 et I κ B est réalisée par la technique de western blot. Le principe est de séparer les protéines selon leur taille par électrophorèse, puis de les transférer sur une membrane afin de pouvoir mettre en évidence la protéine cible grâce à un anticorps primaire spécifique et un anticorps secondaire marqué à la peroxydase. Cette enzyme permettra la visualisation de la protéine étudiée par chimiluminescence.

5.7.1. Extraction des protéines totales

Les cellules sont récupérées par grattage du tapis cellulaire. Après une centrifugation à 400 g durant 10 min à 4°C, le culot cellulaire est lavé à deux reprises par du PBS froid puis après une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est repris dans un tampon CHAPS à 1 % (3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propane-sulfonate, Sigma) dilué dans une solution de Tris-HCl à 10 mM (pH 7,4), contenant 0,5 mM de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl, Sigma) afin de prévenir la dégradation des protéines. Les échantillons sont incubés durant 1 h sur un lit de glace en étant vortexés régulièrement.

La concentration en protéines des échantillons est évaluée à l'aide du kit BioRad Dc protein Assay (Marnes-la-Coquette, France). Cette technique colorimétrique est basée sur la méthode de Lowry *et al.* (Lowry et al. 1951). Brièvement, la réaction se réalise en deux étapes successives : premièrement les protéines réagissent avec des ions cuivre en solution alcaline, puis ces protéines réduisent le réactif de Folin.

Les échantillons à doser sont dilués au 5^{ème} et au 10^{ème} dans de l'eau et une gamme de BSA (0 à 1,4 mg/ml) est préparée à partir de BSA à 2 mg/ml (Sigma). Chaque point de la gamme ainsi que chaque échantillon, est déposé en double sur une plaque 96 puits (Dutcher), à raison de 5 µl par puits. A partir du kit BioRad, la solution A' est préparée en mélangeant 20 µl de solution S avec 1 ml de solution A (tartrate de cuivre). 25 µl de cette solution A' puis 200 µl de solution B (réactif de Folin) sont déposés dans chaque puits. La plaque est ensuite agitée, incubée à température ambiante durant 15 min, puis la densité optique de chaque puits est lue à 690 nm par un lecteur Titertek Multiscan® MCC/340. Le blanc est réalisé sur les puits ne contenant pas de BSA et les DO de chaque point de la gamme de BSA sont utilisés pour tracer la droite de calibration afin de calculer la concentration en protéines dans chaque puits.

La concentration des échantillons est calculée à partir de la moyenne de 4 mesures.

5.7.2. Séparation des protéines sur gels de polyacrylamide

Les gels sont préparés à l'aide du système Mini-Protéan III (BioRad). Le pourcentage en acrylamide du gel, dépend de la taille de la protéine à analyser. Ainsi pour P53 (53 kD), le gel de séparation est à 10 %, alors que pour les protéines E6 (18 kD), E7 (21 kD) et IκB (20 kD), il est à 12,5 %. Pour l'ensemble des protéines un gel de concentration à 5 % est utilisé (Tableau 8).

MATÉRIELS et MÉTHODES

Tableau 8 : Composition des gels de polyacrylamide

Composants, concentrations des solutions mères et fournisseurs	Gels de séparation		Gels de concentration
Concentration en acrylamide	12,5 %	10 %	5 %
Acrylamide-Bis 19:1 (Bio-Rad)	12,5 %	10 %	5 %
Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8, Sigma)	37 mM	37 mM	-
Tris-HCl (0,75 M, pH 6,8, Sigma)	-	-	17 mM
Glycérol (v/v, Sigma)	5 %	5 %	5 %
SDS (25 %, m/v, Sigma)	0,2 %	0,2 %	0,2 %
Ammonium Persulfate (10 %, m/v, Sigma)	0,08 %	0,08 %	0,11 %
TEMED (Bio Rad)	0,04 %	0,04 %	0,11 %
H ₂ O	qsp	qsp	qsp

Le gel de séparation est coulé en premier puis recouvert par de l'eau saturée en isobutanol (butanol-2, Prolabo). Après 20 min de polymérisation à 37°C, la surface du gel est rincée à l'eau puis séchée. Le gel de polymérisation est alors coulé puis le peigne mis en place afin de former les puits de dépôt. Après polymérisation, le peigne est retiré puis le bloc contenant le gel est immergé dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon de migration TGS (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 % (m/v), BioRad).

Les échantillons sont dilués dans du tampon CHAPS à 1 % de façon à obtenir 10 à 100 µg de protéines (10 µg pour IkB, 40 µg pour E7 et 100 µg pour P53 et E6) dans un volume de 18 µl. 18 µl de tampon Laemmli (Tableau 9) contenant 5 % de β-mercaptoéthanol (Sigma) sont ajoutés aux échantillons. L'ensemble est ensuite chauffé à 95°C pendant 5 min (Thermocycleur CrocodileII, Appligène) afin de dénaturer les protéines. Les échantillons sont ensuite placés sur un bain de glace afin d'éviter toute renaturation même partielle des protéines.

Tableau 9 : Composition du tampon de Laemmli (Bio Rad)

Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
Glycérol (v/v)	25 %
SDS (m/v)	2 %
Bleu de bromophénol (m/v)	0,01 %

La totalité de chaque échantillon est déposée dans les puits du gel ainsi que 10 µl d'un marqueur de taille allant de 8,3 à 208 kDa (Kaleidoscope Prestained Standards, BioRad). La migration se fait à 100 V (générateur POWER PAC 200, BioRad) pendant 1h30 à 2h00.

5.7.3. Transfert sur membranes

Les membranes utilisées sont en PVDF (fluorure de polyvinylidène) de type Immobilon-P de porosité 0,45 µm (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Les membranes sont activées avant le transfert selon le protocole suivant : 30 sec dans du méthanol (Prolabo), 2 min dans de l'eau puis 15 min dans du tampon de transfert (Tableau 10).

Tableau 10 : Composition du tampon de transfert

Tris (Sigma)	48 mM
Glycine (Sigma)	39 mM
SDS (^m / _v , Sigma)	0,375 ‰
Méthanol (^v / _v , Prolabo)	20 %
Eau	qsp

En fin de migration, le gel est démoulé et le gel de concentration est retiré. Le gel de séparation est incubé dans le tampon de transfert durant 15 min. Le transfert est réalisé à l'aide d'un système semi-sec de type Trans-Blot SD Cell (BioRad). Les couches successives pour le transfert sont placées selon la Figure 16.

Le transfert se fait à 80 mA par membrane durant 25 min (générateur POWER PAC 200, BioRad).

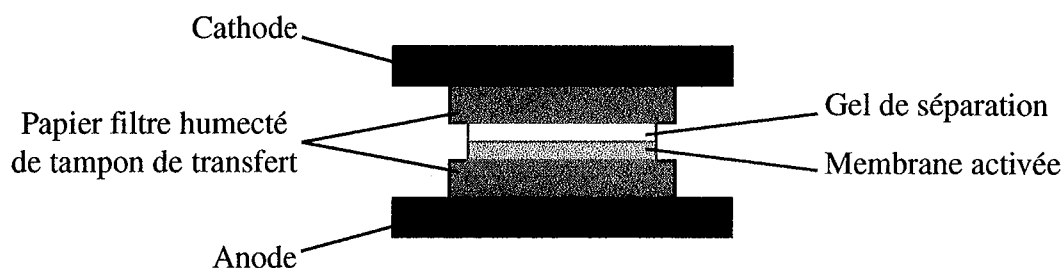


Figure 16 : Schéma du système de transfert semi-liquide des protéines du gel sur la membrane.

MATERIELS et METHODES

5.7.4. Immunomarquage des protéines étudiées.

Après le transfert, les membranes sont laissées 45 min sur un papier absorbant à température ambiante. Cette étape de séchage permet aux membranes de type immobilonP de réactiver des phosphopeptides vers la surface. Cette étape équivaut à une saturation.

Tableau 11 : Composition du tampon TBST

NaCl (Sigma)	500 mM
Tris /HCl (pH 7,5, Sigma)	20 mM
Tween 20 (‰, Sigma)	0,05 %

Les conditions de détection ont été optimisées pour chaque protéine. Les membranes sont incubées une nuit à 4°C sous agitation dans une boîte de type (PerfectWestern™ Containers, GenHunter Corporation, USA) avec 5 ml d'une solution de TBST (Tableau 11) contenant 0,5 % de lait écrémé en poudre et 2 % (m/v) de BSA (Sigma), dans laquelle sont dilués les anticorps primaires (Tableau 12). Les membranes sont ensuite lavées à trois reprises avec 15 ml de TBST pendant 15 min. Les membranes sont ensuite incubées pendant 1 h à température ambiante avec 5 ml d'une solution de TBST contenant 0,5 % de lait écrémé en poudre et 2 % de BSA (‰, Sigma), dans laquelle sont dilués les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase (Tableau 12). Les membranes sont ensuite lavées de la même façon que précédemment puis révélées.

Tableau 12 : Conditions d'immunomarquage pour chaque protéine étudiée

Protéines	Anticorps primaires		Anticorps secondaires	
	Dilutions	Références	Dilutions	Références
P53	1/1500	DO7, Dako	1/5000	Anti-souris, Sigma
E6	1/200	Santa Cruz, Tebu	1/1500	Anti-chèvre, Dako
E7	1/300	Santa Cruz, Tebu	1/1500	Anti-chèvre, Dako
IκB	1/4000	Chemicon international Inc	1/2500	Anti-lapin, Dako

5.7.5. Révélation

La révélation a été réalisée avec le kit ECL™ Western Blotting (Amersham-Pharmacia Biotech, Saclay, France) reposant sur l'émission de lumière résultant de la dissipation

d'énergie émise par une réaction chimique. Dans notre cas, la lumière provient de l'oxydation du luminol par la peroxydase couplée aux anticorps secondaires. Brièvement, les membranes sont séchées puis incubées durant 1 min dans 6 ml d'une solution de révélation (provenant d'un mélange équivolume des deux réactifs fournis dans le kit ECL™). Les membranes sont ensuite séchées avec du papier filtre (Polylabo), enveloppées dans du Saran puis mises en contact avec un film photographique spécifique au signal ECL (Hyperfilm™ ECL, Amersham-Pharmacia Biotech) dans une cassette de type Hypercassette™ (Amersham-Pharmacia Biotech). Après 30 s à 5 min de contact, les films sont développés de façon automatique (développeur 3M modèle XP2000).

5.8. Analyse de la fixation spécifique du facteur de transcription NF- κ B sur l'ADN : gel retard

La mise en évidence de l'activité NF- κ B est réalisée par la technique de gel retard. Un facteur de transcription, tel que NF- κ B, est actif quand il est transloqué dans le noyau d'une cellule et qu'il a la capacité de se fixer sur une séquence d'ADN spécifique afin d'activer la transcription de gènes.

Le principe du gel retard est de marquer par un élément radioactif une séquence ADN spécifique de la fixation d'une protéine ou d'un complexe protéique, dans notre cas NF- κ B, et de l'incuber avec une quantité fixe de protéines nucléaires. Ce mélange est ensuite séparé par électrophorèse sur un gel d'acrylamide. Par autoradiographie du gel de migration, nous pouvons ainsi détecter deux bandes : une en bas du gel qui représente la sonde ADN libre, une plus haute, dite retardée, qui représente la sonde complexée avec la protéine spécifique.

5.8.1. Extraction des protéines nucléaires

A partir de boîtes de culture de 225 cm² de superficie, les cellules sont récupérées avec leur milieu de culture par grattage. A partir de cette étape, les tubes sont maintenus à 4°C. Après centrifugation durant 10 min à 400 g, le culot est lavé avec 30 ml de PBS froid, puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Selon la description de Becuwe *et al.* (Becuwe et al. 1999) le culot est remis en suspension dans 5 ml de tampon A (Tableau 13), incubé durant 10 min, puis les cellules sont lysées mécaniquement (dounces, Polylabo).

MATERIELS et METHODES

Tableau 13 : Composition du tampon A

Composés, concentrations des solutions mères et fournisseurs	Concentrations finales
MgCl ₂ (1 M, Sigma)	1,5 mM
KCl (2,5 M, Sigma)	10 mM
Hepes (1 M, pH 7,9, Sigma)	10 mM
DTT (1 M, Sigma)	0,5 mM
H ₂ O	qsp

Ces poters ont la particularité d'éclater les cellules en laissant les noyaux intacts. La suspension obtenue est centrifugée 10 min à 400 g, le culot est repris dans 1 ml de tampon A et centrifugé à 17000 g durant 10 min. Le culot est repris par 200 µl de tampon C (Tableau 14), broyé durant 20 s directement dans le tube de 1,5 ml munis d'un potter adapté (polylabo). 0,25 % de NP40 (Sigma) sont ajoutés, les tubes sont incubés durant 30 min avec des agitations régulières par Vortex, puis centrifugés à 17000 g (Centrifugeuse Jouan MR1822) durant 30 min. Les surnageants sont congelés à -80°C, en présence de KCl (0,1 M).

Tableau 14 : Composition du tampon C

Composés, concentrations des solutions mères et fournisseurs	Concentrations finales
NaCl (5 M, Sigma)	450 mM
EDTA (250 mM, Sigma)	0,2 mM
MgCl ₂ (1 M, Sigma)	1,5 mM
Glycérol (% _{v/v} , Sigma)	25 %
DTT (1 M, Sigma)	0,5 mM
Hepes (1 M, pH 7,9, Sigma)	20 mM
PMSF (0,2 M, Sigma)	0,5 mM
H ₂ O	qsp

La concentration en protéines de chaque échantillon est déterminée avec le kit BioRad DC Protein Assay, selon la procédure décrite auparavant pour les protéines totales (cf. paragraphe 5.7.1.).

5.8.2. Marquages des sondes de NF-κB au ³²P

Les sondes et les nucléotides proviennent de chez InVitrogen.

1 µl de sondes sens à 10 ng/µl (5'-AGT TGA GGG GAC TTT-3') et 1 µl de sondes anti-sens à 10 ng/µl (5'-GCC TGG GAA AGT CCC-3') sont mélangés dans 8,5 µl d'eau et incubés durant 5 min sur un bain de glace. Puis, dans le même tube sont ajoutés: 2 µl de tampon de Klenow 10 X (Promega, Charbonnières, France), 2 µl de dATP (2 mM), 2 µl de dTTP (2 mM), 2 µl de dGTP (2 mM), 1 µl de α -³²P dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France), 0,5 µl de Klenow (5 U/µl, DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment, Promega). Après une incubation durant 30 min dans un bain marie à 37°C, les amorces sont purifiées par précipitation. Ainsi, 2 µl d'acétate de sodium (3 M, pH 4) et 22 µl d'éthanol absolu sont ajoutés. Après une incubation de 30 min à 4°C, les tubes sont centrifugés à 10000 g à 4°C durant 10 min, et le culot est repris dans 60 µl d'eau. Les amorces ainsi marquées peuvent être conservées à -20°C durant quelques jours.

5.8.3. Préparation des échantillons

Pour chaque échantillon, 5 µg de protéines nucléaires, dilués dans de l'eau afin d'avoir un volume final de 6 µl, sont incubés 10 min à 4°C avec 1 µl de tampon de liaison (Tableau 15) et 1 µl de dIdC (1 µg/µl, Sigma).

Après addition de 1 à 2 µl de sondes marquées, les tubes sont incubés durant 30 min sur un bain de glace.

Afin de démontrer la spécificité de la fixation, un compétiteur froid est utilisé. La sonde froide est produite de la même façon que celle marquée sauf que du dCTP non marqué est utilisé à la place du α -³²P dCTP et les amorces sont 100 fois plus concentrées (1 mg de chaque sonde).

Dans ces échantillons contrôles, 1 µl de la solution de compétiteur froid est ajouté dans le mélange contenant les protéines nucléaires, le tampon de liaison et le dIdC. Ensuite, ces échantillons sont traités de la même façon durant tout le reste du protocole.

Tableau 15 : Composition du tampon de liaison de NF- κ B sur les amorces

Composés, concentrations des solutions mères, fournisseurs	Concentrations finales
Tris/HCl (1 M, pH 7,4, Sigma)	100 mM
NaCl (2,5 M, Sigma)	500 mM
MgCl ₂ (1 M, Sigma)	10 mM
Glycérol (% _v , Sigma)	50 %
DTT (1 M, Sigma)	5 mM
H ₂ O	qsp

Avant de faire migrer les échantillons par électrophorèse, 1 μ l de tampon de migration (tampon de liaison saturé en bleu de bromophénol (BioRad)) est ajouté dans chaque tube.

5.8.4. *Electrophorèse et séchage*

Les gels sont préparés à l'aide du système Mini-Protean II (BioRad). Après nettoyage, les plaques de verre sont montées sur leur support selon les recommandations du fournisseur. Le gel d'acrylamide est composé de : 5% de bis-acrylamide (BioRad), 87,5 % de TBE 0,5 X (Tris-borate EDTA, Invitrogen), 0,8 % d'APS (100 mg/ml, Persulfate d'Ammonium, Sigma), 0,08 % de TEMED (N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthylènediamine, BioRad). Le gel est coulé entre les deux plaques de verre et le peigne est mis en place. Après 30 min de polymérisation, le peigne est retiré puis le gel est immergé avec son support dans la cuve d'électrophorèse contenant du tampon TBE 0,5 X.

La totalité des échantillons est déposée dans les différents puits. La migration se réalise à 150 V durant 10 min puis à 100 V jusqu'à ce que le front de migration soit à 1 cm du bas du gel. Aussitôt la migration achevée, les gels sont démoulés, déposés sur une feuille de papier filtre et recouverts de Saran. Rapidement le tout est placé dans le sécheur sous vide d'air (BioRad), face papier filtre vers le bas.

5.8.5. *Révélation*

Après 20 min de séchage sous vide à 80°C, les gels sont placés dans une cassette autoradiographique de type HypercassetteTM, munis d'un écran d'amplification (Amersham Pharmacia Biotech). Après mise en place d'un film photographique (Trimax, Kodak) entre le gel et l'écran, la cassette est placée à -80°C.

Après un contact de 24 à 72 h (selon "l'âge" du ^{32}P), les films photographiques sont révélés de façon automatique (développeur 3M modèle XP2000).

5.9. Détermination des protéines du complexe NF- κ B : Gel super-retard

Afin de déterminer les protéines composant le complexe NF- κ B, la technique du gel super-retard est utilisée. Le principe de cette technique est la même que celle du gel retard avec intervention supplémentaire d'un anticorps. Si ceux-ci reconnaissent un des composés du complexe protéique fixant la sonde marquée, il se forme alors un complexe anticorps-protéine-ADN. Ce complexe sera visualisé par une bande de migration encore plus retardée que celle du complexe protéine-ADN.

Ainsi, les protéines nucléaires sont incubées durant 15 min à température ambiante avec 1 μg d'anticorps dirigé contre P50 (Santa Cruz, Tebu, France) ou contre P65 (Santa Cruz), puis les échantillons sont mis en présence de la sonde marquée. L'ensemble des étapes suivantes sont les mêmes que pour la technique de gel retard. Cependant, il est conseillé d'utiliser un gel d'électrophorèse plus long afin de pouvoir séparer au mieux les différents complexes.

5.10. Modulation de l'activité NF- κ B

Afin de moduler l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NF- κ B, les cellules sont mises en contact avec du TNF α en tant qu'inducteur et de la dexaméthasone (DEX) en tant qu'inhibiteur. Plusieurs concentrations (10^{-5} , 10^{-6} et 2.10^{-6}M pour la DEX et 2,5, 5 et 10 ng/ml pour le TNF α) et temps de contact (14 et 24 h pour la DEX et 10 min, 30 min et 2 h pour le TNF α) ont été testés pour les deux types de traitements. Les conditions utilisées ont été choisies de façon à avoir l'effet voulu sur l'activité NF- κ B, avec la concentration et le temps de contact le plus faible possible pour les deux lignées.

5.10.1. Diminution de l'activité de NF- κ B par dexaméthasone (DEX)

Les lignées KB et KB3 sontensemencées à 2.10^4 cellules/ml. Quatre jours plus tard, les cellules sont traitées par 1 mM de DEX (Sigma) durant 24 h, puis sont, soit récupérées pour l'analyse de l'activité de NF- κ B ou pour la quantification de l'apoptose, soit irradiées au ^{60}Co .

5.10.2. Augmentation de l'activité de NF- κ B par le "Tumor Necrosis Factor alpha" (TNF α)

Les lignées KB et KB3 sontensemencées à 2.10^4 cellules/ml. Quatre jours plus tard, les cellules sont traitées par 2,5 ng/ml de TNF α (R&D Systems) durant 10 min. Après lavage du tapis cellulaire par du PBS, les cellules sont incubées durant 14 h avec du milieu de culture, puis récupérées dans les mêmes conditions qu'après traitement par la DEX.

5.11. Analyse statistique

Les tests statistiques utilisés sont des tests non paramétriques. Pour les corrélations, le test de Spearman ($p < 0,05$) a été utilisé et pour les comparaisons, le test U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

1- La protéine P53 est impliquée à la fois dans la mise en place de l'apoptose ou de blocages des cellules dans le cycle cellulaire après exposition au 5FU ou aux radiations ionisantes. Cependant, l'infection des cellules par le virus HPV-18 peut entraîner la dégradation de la protéine P53 et/ou la perte de sa fonctionnalité. Ainsi, nous avons étudié l'implication de cette protéine P53 à la fois dans la mise en place de l'apoptose et des blocages des cellules dans le cycle cellulaire après exposition par les deux types de stress génotoxiques de cellules HPV-18 positives ayant acquit une résistance au 5FU.

2- Avec l'ensemble des cellules composant notre modèle, une corrélation statistiquement significative entre la radiosensibilité et le pourcentage de cellules en apoptose basale a été mise en évidence. Comme le facteur de transcription NF- κ B est activé par les radiations ionisantes et que celui-ci est impliqué dans la régulation de la mise en place de l'apoptose, le rôle de l'activité constitutive de NF- κ B sur la radiosensibilité intrinsèque et sur la mise en place de l'apoptose spontanée a été étudié.

CHAPITRE 6

RESULTATS ET DISCUSSION

the 1990s, the incidence of *S. flexneri* infections has increased in the United Kingdom [10]. In the United States, *S. flexneri* has been reported as the most common serotype of *S. flexneri* isolated from children with acute colitis [11].

There is a paucity of data on the epidemiology of *S. flexneri* in the United Kingdom. In the 1970s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [12]. In the 1980s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [13]. In the 1990s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [14].

In the 1970s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [12]. In the 1980s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [13]. In the 1990s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [14].

In the 1970s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [12]. In the 1980s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [13]. In the 1990s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [14].

In the 1970s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [12]. In the 1980s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [13]. In the 1990s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [14].

In the 1970s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [12]. In the 1980s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [13]. In the 1990s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [14].

In the 1970s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [12]. In the 1980s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [13]. In the 1990s, *S. flexneri* was the most commonly isolated serotype of *S. flexneri* from patients with acute colitis in the United Kingdom [14].

6. RESULTATS ET DISCUSSION

6.1. Caractérisation des lignées

Le premier objectif de cette étude a été de décrire la croissance des différentes lignées cellulaires ainsi que de caractériser la sensibilité au 5FU et à la radiothérapie de la lignée mère KB et des trois clones KB3, KB7 et KB8, sélectionnés après une exposition continue au 5FU durant trois semaines.

Les quatre lignées cellulaires expriment une protéine P53 sauvage (Mirjolet, 2000; Mirjolet *et al.*, 2000) et sont infectées par le virus HPV-18 (Boshart *et al.*, 1984).

6.1.1. Courbes de croissance et temps de doublement

Pour l'ensemble des lignées cellulaires, après un ensemencement à 10^4 cellules/ml, la phase exponentielle de croissance commence entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour de culture et la confluence (plateau) est atteinte au 7^{ème} jour (Figure 17). Pour l'entretien des cultures, toutes les lignées cellulaires ont été trypsinées au 7^{ème} jour après ensemencement. Les analyses de cycle, d'apoptose ou encore d'expression de gènes ou de protéines, ont été réalisées au 4^{ème} jour, en début de phase exponentielle de croissance.

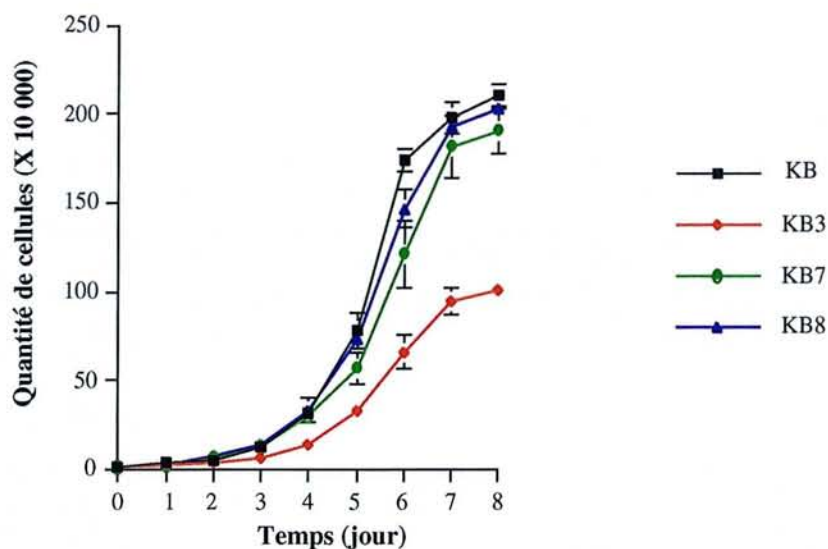


Figure 17 : Courbes de croissance des différentes lignées (n=3). Les résultats représentent la moyenne et les écarts types obtenus à partir de trois expérimentations indépendantes.

Les temps de doublement mesurés varient de 24 à 29 h (Tableau 16). La lignée mère KB présente le temps de doublement le plus court (24 h) à l'opposé du clone KB3 (29 h).

Tableau 16 : Temps de doublement des lignées cellulaires

Lignées	Equations de croissance	Temps de doublement
KB	$y = 0,296x + 4,316$ ($r=0,985$)	24 h *
KB3	$y = 0,247x + 4,226$ ($r=0,974$)	29 h
KB7	$y = 0,284x + 4,306$ ($r=0,990$)	25 h
KB8	$y = 0,298x + 4,288$ ($r=0,985$)	24 h

* Valeurs calculées à partir d'une équation de droite obtenue avec les moyennes de trois expérimentations indépendantes.

6.1.2. Sensibilité des cellules au 5FU

L'exposition continue au 5FU de la lignée KB a entraîné une augmentation significative de la chimiorésistance de façon plus ou moins importante pour les trois clones. Le clone KB3 est le plus chimiorésistant avec un indice de résistance de 3 par rapport à la lignée mère (Tableau 17).

RESULTATS et DISCUSSION

Tableau 17 : Sensibilité au 5FU des différents clones ($n \geq 8$) et indice de résistance

Lignées	IC ₅₀ (µg/ml)	Indice de résistance
KB	164 ± 31 *	1,0
KB3	485 ± 77	3,0
KB7	244 ± 44	1,5
KB8	323 ± 53	2,0

* moyenne ± écart type

6.1.3. Radiosensibilité des cellules

Dès les plus faibles doses d'irradiation, les clones diffèrent par leur radiosensibilité. Pour une raison de visibilité, les courbes de survie après irradiation au ^{60}Co n'ont pas été ajustées (Figure 18). Cependant, afin de déterminer le paramètre de fraction de survie à 2 Gy (SF_2), le modèle linéaire et quadratique a été utilisé.

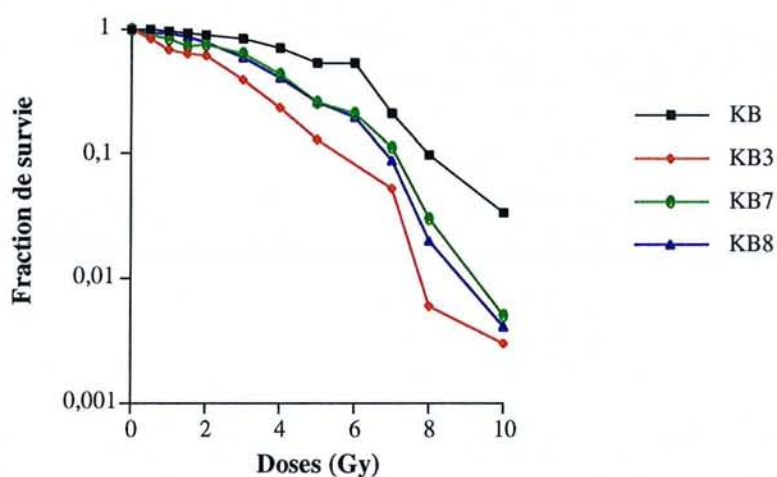


Figure 18 : Courbes de radiosensibilité ($n=8$). Les écarts types sont inférieurs à 15 %.

La lignée mère KB est la plus radiorésistante en présentant la SF_2 la plus élevée. A l'inverse, le clone KB3 présente la plus grande radiosensibilité et donc la plus faible SF_2 (Tableau 18). Les clones KB7 et KB8 ont un niveau de radiosensibilité similaire et intermédiaire (Figure 18). Les trois clones sont significativement plus radiosensibles que la lignée mère KB.

RESULTATS et DISCUSSION

Tableau 18 : Paramètre de radiosensibilité SF_2 (fraction de survie à 2 Gy) obtenu à partir du modèle linéaire et quadratique pour les quatre lignées cellulaires (n=8)

Lignées	SF_2
KB	$0,909 \pm 0,06$ *
KB3	$0,517 \pm 0,21$
KB7	$0,718 \pm 0,14$
KB8	$0,759 \pm 0,04$

* moyenne $\pm$ écart type

6.1.4. Corrélation entre la radio- et la chimiosensibilité

L'exposition de la lignée KB au 5FU durant 3 semaines a induit une augmentation de la chimiorésistance et de la radiosensibilité pour les trois clones par rapport à la lignée mère KB. Une corrélation statistiquement significative a pu être mise en évidence entre les paramètres de chimio- et radiosensibilité qui sont respectivement l' IC_{50} et la SF_2 (Figure 19).

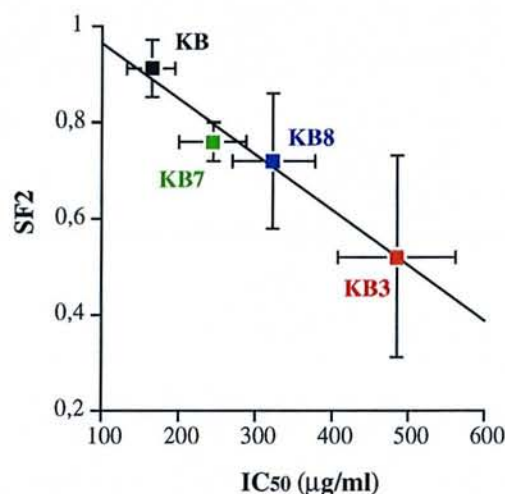


Figure 19 : Corrélation inverse entre l' IC_{50} au 5FU et le paramètre SF_2 (Test non paramétrique de Wilcoxon, $r = 0,987$, $p = 0,006$).

Ainsi, pour deux types de stress génotoxiques, les différentes lignées présentent une sensibilité inversée.

6.1.5. Conclusion

Une exposition continue au 5FU de la lignée KB a permis de sélectionner trois clones, et a entraîné à la fois une augmentation de la chimiorésistance, une diminution de la radiorésistance et un ralentissement de la prolifération cellulaire. Ainsi, pour notre modèle cellulaires, après l'échec d'un premier traitement par 5FU, dû une induction de la résistance des cellules à cet agent anti-cancéreux, une radiothérapie pourrait être envisagée.

Les mécanismes de répartition des cellules dans le cycle cellulaire, ainsi que de mise en place de l'apoptose ont été étudiés après exposition au 5FU et aux radiations ionisantes.

Afin d'étudier les mécanismes induits par le 5FU ou par la radiothérapie, la suite de l'étude a été réalisée sur les deux lignées cellulaires de sensibilité extrême, c'est-à-dire la lignée mère KB et le clone KB3.

6.2. Premier type de stress génotoxique : traitement par 5FU

6.2.1. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire après exposition au 5FU

Le 5FU peut induire des blocages à différents niveaux au cours du cycle cellulaire : G_0/G_1 (Pickard *et al.*, 1995), G_1/S (Huschtscha *et al.*, 1996; Piazza *et al.*, 1997), S (Pickard *et al.*, 1995; Yoneda *et al.*, 1998), ou encore G_2/M (Pickard *et al.*, 1995).

Après une exposition au 5FU, les cellules KB et KB3 s'arrêtent à l'interface G_1/S , mais avec une cinétique différente (Figure 20). En effet, la lignée KB s'accumule plus rapidement que le clone KB3 et la différence devient significative dès 8 h de traitement. Un plateau semble être atteint pour la lignée KB à partir de 24 h, alors que l'accumulation se poursuit à 48 h pour le clone KB3 sans toutefois atteindre l'intensité du blocage des cellules KB (Figure 20).

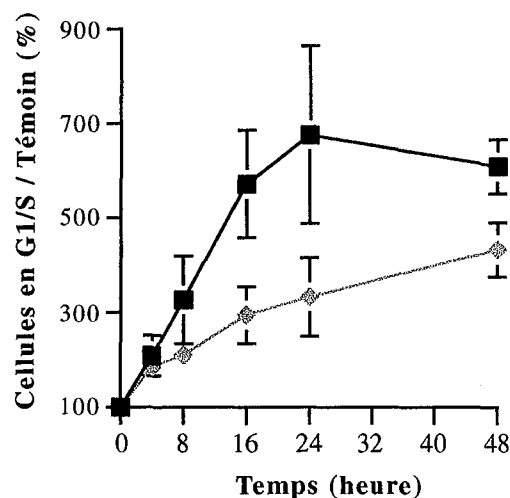


Figure 20 : Accumulation des cellules KB (■) et KB3 (◆) en G_1/S durant une exposition à une IC_{50} de 5FU. Les résultats sont normalisés par leur contrôle ($n=3$) (Mirjolet, 2000).

Le blocage en G_1/S du cycle cellulaire peut avoir pour origine l'induction de la protéine P53 sauvage (Dulic *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1994b). Cependant, la protéine P53 n'est pas la seule responsable de ce type de blocage. En effet, des lignées cellulaires exprimant une protéine P53 mutée et non fonctionnelle sont également capables de s'arrêter en G_1/S après exposition

RESULTATS et DISCUSSION

au 5FU (Mirjolet *et al.*, 2000). Des mécanismes moléculaires indépendants de P53 peuvent donc induire ce type de blocage dans le cycle cellulaire après exposition au 5FU.

Les lignées cellulaires KB et KB3 expriment une protéine P53 sauvage, mais sont infectées par le virus HPV-18 (Boshart *et al.*, 1984). Or, le virus HPV-18 code pour l'oncoprotéine E6 capable induire la dégradation de P53 par le protéasome 26S (Maki *et al.*, 1996; Scheffner *et al.*, 1990). La cinétique d'expression du transcrit et de la protéine P53 a été étudiée afin de vérifier si celle-ci est en relation avec la cinétique de mise en place du blocage en G₁/S.

6.2.2. Cinétique d'expression des transcrits et des protéines P53 après exposition au 5FU

L'accumulation de la protéine P53 sauvage après exposition au 5FU a été démontrée pour des cellules HPV négatives (Yang *et al.*, 1996). Cette accumulation est essentiellement due à une stabilisation de la protéine (Kastan *et al.*, 1991; Kastan *et al.*, 1992; Zhan *et al.*, 1993). Parfois, cette induction peut également provenir d'une augmentation des transcrits p53 (Sun *et al.*, 1995).

Pour les lignées KB et KB3, le traitement par une dose équitoxique de 5FU (IC₅₀) induit une augmentation de la quantité de transcrit p53 (Figure 21). Cette augmentation est significative à partir de 16 h d'exposition au 5FU pour la lignée KB et à partir de 32 h pour le clone KB3. De plus, cette induction est plus intense pour la lignée KB, avec un facteur d'induction atteignant $3,40 \pm 0,09$ et $1,90 \pm 0,04$ % respectivement pour KB et KB3.

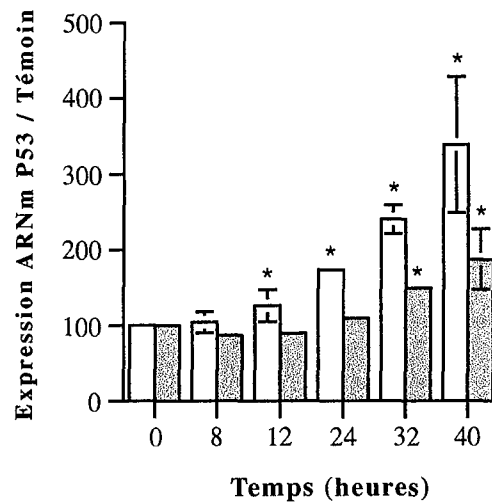


Figure 21 : Variations d'expression du transcrit p53 lors d'une exposition à une IC_{50} de 5FU pour KB (□) et KB3 (▨). Les résultats représentent les moyennes des ratios d'expression p53/ β_2m normalisés par rapport à un témoin non traité (n=3). * Induction statistiquement significative par rapport au témoin (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

L'expression de la protéine P53 avec ou sans traitement par 5FU, a été mise en évidence par western blot. Une différence significative d'expression constitutive de la protéine P53 a été observée entre les lignées KB et KB3 (Figure 22). Pour des lignées exprimant une protéine sauvage P53, il a été mis en évidence qu'au niveau basal, cette protéine n'est pas ou très peu exprimée, alors que dans les lignées cellulaires exprimant une protéine P53 mutée, cette expression basale est importante. Cependant, afin de pouvoir observer une bande en western blot caractérisant l'expression constitutive de P53 sauvage dans nos lignées cellulaires, il est nécessaire de déposer dix fois plus de protéines totales que pour des lignées exprimant une protéine mutée (Mirjolet *et al.*, 2000). De façon basale, la lignée KB exprime moins la protéine P53 que le clone KB3, mais dans les deux lignées cellulaires, cette expression reste faible.



Figure 22 : Niveau constitutif d'expression de la protéine P53 dans KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.

RESULTATS et DISCUSSION

Pour les deux lignées cellulaires, l'expression de P53 diminue faiblement durant les huit premières heures d'exposition au 5FU, et augmente de façon significative dès 12 h de traitement pour KB et dès 24 h pour KB3 (Figure 23).

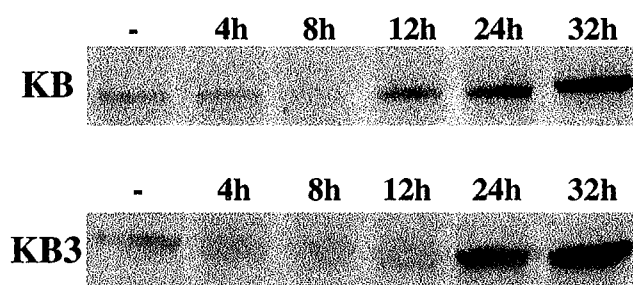


Figure 23 : Variation d'expression de la protéine P53 après une exposition des cellules KB et KB3 à une IC_{50} de 5FU. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.

L'accumulation de P53 après exposition au 5FU apparaît avec un décalage d'environ 12 h entre KB et KB3. Ce décalage temporel a également été observé pour l'induction de l'expression des transcrits p53 (Figure 21).

Par une action d'ubiquitine ligase, E6 induit la dégradation de la protéine P53 par le protéasome 26S. Malgré l'infection des lignées KB et KB3 par le virus HPV-18, la protéine P53 a pu être détectée, alors que les équipes de Matlashewski et de Band, ont seulement réussi à mettre en évidence une grande quantité d'ARNm de p53 dans leur modèle cellulaire infecté par HPV (Band *et al.*, 1991; Matlashewski *et al.*, 1986). Par contre, plus récemment, l'équipe de Butz a démontré à partir des cellules du cancer du col utérin, infectées par HPV, que la présence de la protéine E6 n'empêchait pas toujours l'expression de P53 ni son induction suite à un dommage de l'ADN (Butz *et al.*, 1999). Nous observons les mêmes résultats avec notre modèle cellulaire de carcinome épidermoïde oral exposé au 5FU.

Une autre protéine virale, E7, est également impliquée dans la transition des cellules de la phase G_1 vers la phase S. Son action s'oppose à celle de P53. En effet, la protéine E7 favorise le passage des cellules de la phase G_1 vers la phase S du cycle cellulaire et a donc une action opposée à la protéine P53 qui induit le blocage en G_1/S via l'induction de l'expression de P21. P21 est un inhibiteur universel des cyclines et va entre autres, inhiber la phosphorylation de Rb et ainsi empêcher la libération du facteur E_2F (Bartek et Lukas, 2001; Xiong *et al.*, 1993). La protéine virale E7 joue un rôle direct sur le passage des cellules de la phase G_1 vers la phase S. En se fixant sur les protéines Rb hypophosphorylées, E7 entraîne le découplage des protéines Rb- E_2F . E_2F ainsi libéré va pouvoir jouer son rôle de facteur de transcription en

RESULTATS et DISCUSSION

induisant l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire (thymidine kinase, dihydrofolate réductase, ADN-Polymérase α). (Chellappan *et al.*, 1992).

6.2.3. Effet du 5FU sur l'expression des transcrits et des protéines virales E6 et E7

Le 5FU est utilisé en clinique pour son activité anti-virale, notamment au niveau des cellules du tractus utéro-vaginal infectées par le virus HPV (Clark *et al.*, 1998; Holmes *et al.*, 1999). Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur l'impact du traitement anticancéreux par 5FU sur des cellules de carcinomes HPV positives, ni sur l'effet de ce traitement sur l'expression des oncoprotéines virales E6 et E7.

Les oncoprotéines virales E6 et E7 sont traduites à partir d'un transcrit commun, nommé ARNm bicistronique (Stacey *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 1994).

Une diminution significative de l'expression des transcrits E6/E7 a été observée à partir de 24 h de traitement par une dose IC_{50} de 5FU pour la lignée KB et à partir de 32 h pour le clone KB3 (Figure 24).

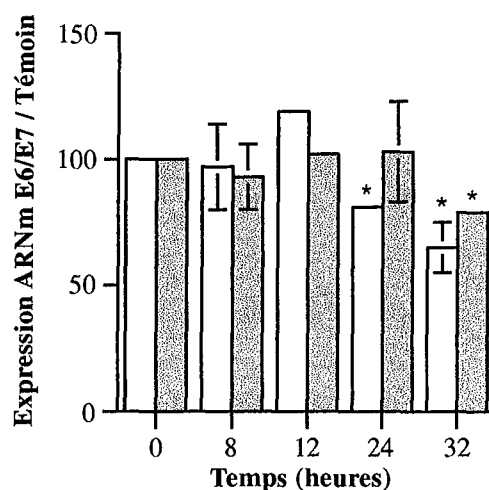


Figure 24 : Variations d'expression du transcrit E6/E7 après une exposition des cellules KB (□) et KB3 (■) à une IC_{50} de 5FU. Les résultats représentent les moyennes des ratios d'expression E6/E7 / β_2m normalisés par rapport à un témoin non traité (n=3). * Variation statistiquement significative par rapport au témoin (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

L'expression constitutive de la protéine E6 est plus importante dans la lignée mère KB que dans le clone KB3 (Figure 25). Cette différence d'expression de E6 est en relation avec la

RESULTATS et DISCUSSION

différence d'expression de la protéine P53 entre les deux lignées. Cette relation s'explique par la capacité de E6 à induire la dégradation de P53 (Huibregtse *et al.*, 1991).

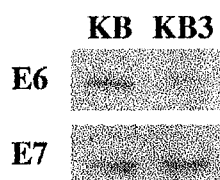


Figure 25 : Niveau constitutif d'expression des protéines E6 et E7 dans KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.

Pour la lignée KB, l'expression de la protéine E6 augmente légèrement après 8 h d'exposition au 5FU, puis diminue sensiblement à 24 et 32 h (Figure 26).

Pour le clone KB3, l'expression de la protéine E6 diminue légèrement après 4 et 8 h d'exposition au 5FU, puis augmente à 12 h pour enfin rediminuer après 32 h de traitement (Figure 26).

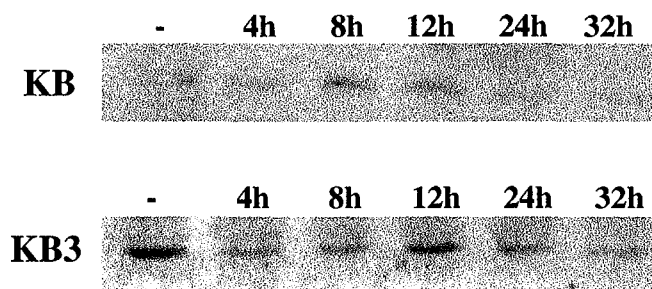


Figure 26 : Variations d'expression de la protéine E6 après une exposition des cellules KB et KB3 à une IC_{50} de 5FU. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.

Pour les deux lignées cellulaires, la diminution de l'expression de la protéine E6 après un traitement par 5FU durant 24 h ou 32 h, pour KB et KB3 respectivement, est en relation avec la diminution des transcrits E6/E7 qui a lieu aux mêmes moments (Figure 24).

Comme pour l'expression constitutive des protéines P53 et E6, leur expression respective varie après traitement de façon inversée au cours de l'exposition au 5FU. Ainsi, pour les deux lignées cellulaires, quand l'expression de P53 augmente, celle de E6 diminue, et inversement.

Contrairement à E6, la protéine E7 est exprimée constitutivement de façon similaire dans les lignées KB et KB3 (Figure 25).

RESULTATS et DISCUSSION

Pour la lignée KB, l'expression de la protéine E7 reste stable durant les 12 premières heures d'exposition au 5FU, puis diminue à 24 et 32 h (Figure 27).

Pour le clone KB3, l'expression de la protéine E7 reste constante durant les 24 premières heures d'exposition au 5FU, puis diminue après 32 h de traitement (Figure 27).

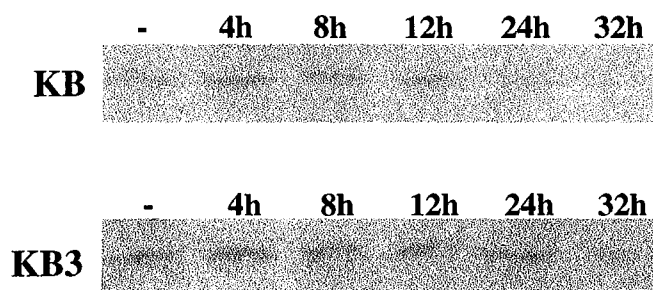


Figure 27 : Variations d'expression de la protéine E7 après une exposition des cellules KB et KB3, à une IC_{50} de 5FU. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.

Comme pour E6, l'expression de la protéine E7 varie de façon similaire et dans les mêmes délais de traitement par 5FU, que l'expression des transcrits E6/E7.

La différence d'expression constitutive des protéines E6 et E7 peut provenir d'une différence de leur traduction respective bien qu'elles partagent le même ARNm. En effet, les ribosomes, responsables de la traduction, peuvent s'arrêter sur un codon d'initiation AUG, et éviter l'autre (Stacey *et al.*, 2000), aboutissant ainsi à une différence de quantité de protéines traduites à partir du même ARNm bicistronique.

Le traitement par 5FU induit l'expression de P53 avec un décalage de 12 h entre les deux lignées. Cette induction d'expression est en relation avec une diminution de l'expression de E6 qui se réalise avec le même décalage temporel entre les lignées KB et KB3. Comme pour la protéine E6, l'expression protéique de E7 diminue au cours de l'exposition au 5FU.

6.2.4. Effet du 5FU sur l'expression des transcrits p21

Etant donné que les protéines E6 et E7 peuvent réprimer l'activité transactivatrice de P53 en se fixant sur des co-facteurs TBP, CBP et P300 (Massimi et Banks, 1997; O'Connor, 2000; Patel *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999), la fonctionnalité de la protéine P53 avant et après une exposition des cellules KB et KB3 au 5FU a été démontrée précédemment par une étude d'expression des ARNm de mdm2 dont la transcription est induite spécifiquement par

RESULTATS et DISCUSSION

P53 (Mirjolet, 2000). De plus, la cinétique d'expression des transcrits de p21 a été mesurée après exposition au 5FU afin de vérifier si P53 induit cette expression et donc si P53 est impliquée dans le blocage des cellules en G₁/S.

Pour la lignée KB, l'expression du transcrit p21 est induite de façon significative à partir de 16 h d'exposition au 5FU (Figure 28). Cette induction se poursuit après 24 et 32 h de traitement. Pour le clone KB3, cette induction n'est significative qu'à partir de 24 h d'exposition au 5FU (Figure 28).

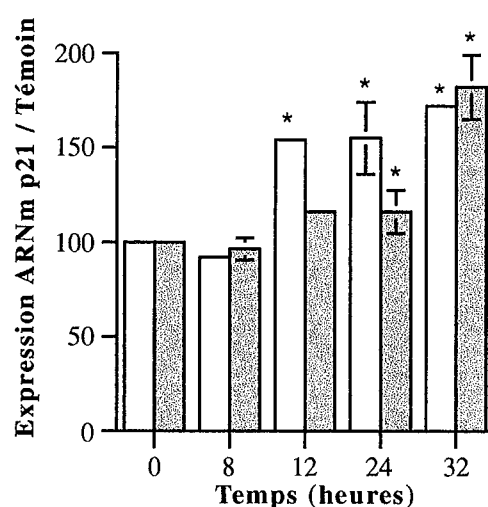


Figure 28 : Variations d'expression du transcrit p21 après exposition des cellules KB (□) et KB3 (▨) à une IC₅₀ de 5FU. Les résultats représentent les moyennes des ratios d'expression p21/β2m normalisés par rapport à un témoin non traité (n=3). * Variation statistiquement significative par rapport au témoin (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).

Pour les deux lignées, l'induction du gène p21 est observée simultanément à l'induction de l'expression de la protéine P53 (Figure 28, Figure 23). Ainsi, dans ce modèle cellulaire, la contamination par le virus HPV-18 n'inhibe pas totalement l'expression de P53 et n'empêche ni son induction par le 5FU, ni son activité transactivatrice.

P53 induit l'expression du gène codant P21, impliquée dans la mise en place du blocage des cellules en G₁/S. Cependant, l'accumulation des cellules en G₁/S est détectable dès 4 h d'exposition au 5FU alors que l'induction de P53 et du gène p21 n'apparaît qu'à 12 ou 24 h selon la lignée cellulaire.

D'autre part, avant 12 ou 24 h de traitement, pour KB et KB3 respectivement, la protéine E7, inductrice de l'entrée des cellules en phase S, est exprimée. Sachant que *via* l'induction de

RESULTATS et DISCUSSION

l'expression de la protéine P21, P53 empêche la libération du facteur de transcription E₂F, et que E7 favorise cette libération, la mise en place du blocage en G₁/S entre 4 et 12 h de traitement par 5FU semble provenir d'un mécanisme indépendant de la libération de E₂F, et donc indépendant de P53.

Un autre mécanisme, impliquant la thymidylate synthase (TS), peut être responsable de la mise en place du blocage en G₁/S. En effet, l'inhibition de l'activité de l'enzyme TS par le métabolite FdUMP du 5FU, inhibe la synthèse de l'ADN. Dans une étude récente, l'inhibition de la TS a été mise en évidence par la formation d'un complexe ternaire après exposition au 5FU des lignées KB et KB3 (Mirjolet, 2000). Ainsi, les cellules ne pouvant plus dupliquer leur ADN, s'arrêtent en G₁/S. Ce mécanisme pourrait donc expliquer la mise en place précoce du blocage en G₁/S. De plus, des lignées cellulaires, n'exprimant pas P53 ou exprimant une protéine P53 mutée non fonctionnelle, sont capables de mettre en place un arrêt en G₁/S suite à une exposition au 5FU. Ceci met en évidence le fait que la protéine P53 n'est pas toujours nécessaire à l'initiation du blocage en G₁/S après un stress (Mirjolet *et al.*, 2000). Suite à la diminution de l'expression de la protéine E7, l'accumulation de P53 peut inhiber la libération du facteur E₂F *via* l'induction de l'expression de p21. La protéine P53 peut alors participer aux mécanismes au maintien du blocage en G₁/S à partir de 12 h d'exposition au 5FU pour la lignée KB et à partir de 24 h pour le clone KB3.

Après exposition au 5FU, les cellules bloquées dans le cycle cellulaire peuvent initier le mécanisme d'apoptose.

6.2.5. Induction de l'apoptose par le 5FU

La voie d'induction de l'apoptose par le 5FU la plus décrite est dépendante de la protéine P53 (Koshiji *et al.*, 1997; Yoneda *et al.*, 1998).

Par la technique de marquage des cellules à l'annexine-V et à l'IP, puis une analyse par cytométrie en flux, une induction du pourcentage de cellules en apoptose a été mise en évidence à partir de 24 h d'exposition au 5FU pour la lignée KB et de 32 h pour le clone KB3 (Figure 29).

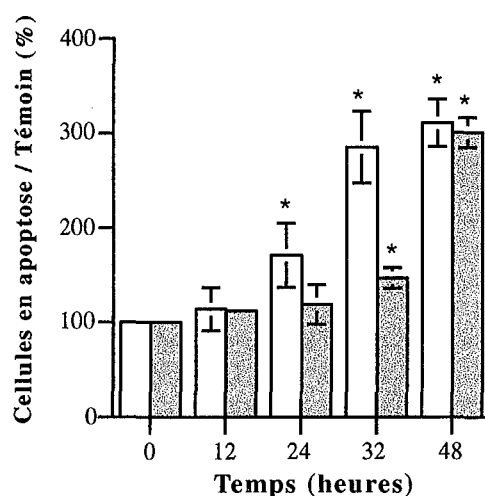


Figure 29 : Variations du pourcentage des cellules en apoptose pour KB (□) et KB3 (▨) durant une exposition à une dose d'IC₅₀ de 5FU. Les résultats sont normalisés par rapport à un témoin non traité (n=3). * Variation statistiquement significative par rapport au témoin (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).

L'apoptose induite par le 5FU pour les deux lignées cellulaires, se met en place environ 12 h après l'accumulation de la protéine P53. Ainsi, la protéine P53 peut être à l'origine de ce phénomène.

Des études utilisant différents types cellulaires infectés par HPV ont démontré que la protéine E6 pouvait inhiber l'induction de l'apoptose (Jackson et Storey, 2000; Thomas et Banks, 1998). Pour KB et KB3, le 5FU entraîne une diminution de l'expression de la protéine E6, en relation avec une induction de P53. Ainsi, malgré la contamination des cellules KB et KB3 par le virus HPV-18, le traitement par 5FU entraîne une mise en place de l'apoptose.

La mise en place du blocage en G₁/S est observée dès 4 h d'exposition au 5FU pour les deux lignées alors que l'apoptose n'est détectée de façon significative qu'à partir de 24 h pour la lignée KB et 32 h pour le clone KB3. Aux temps de mise en place de l'apoptose, la majorité des cellules sont bloquées en G₁/S (environ 80 % des cellules pour les deux lignées). Les cellules subissant l'apoptose proviendraient alors de ce blocage.

L'ensemble des mécanismes induits par le 5FU, se réalise avec un décalage de 12 h entre KB et KB3. Ce décalage pourrait provenir d'une différence de prolifération entre les deux lignées cellulaires caractérisée par une différence de temps de doublement (Tableau 16).

6.2.6. Conclusion

L'exposition au 5FU a entraîné un blocage des cellules en G₁/S. De plus, malgré l'infection de ces cellules par le virus HPV-18, le traitement par 5FU a provoqué l'induction de l'expression du transcrit et de la protéine P53 à la fois pour la lignée KB et pour le clone KB3. La mise en place du blocage en G₁/S se fait avant l'induction de la protéine P53 et du gène p21. L'initiation de ce processus pourrait être dû à un arrêt de la synthèse de l'ADN suite à l'inhibition de la TS par le 5FU. P53 pourrait tout de même être impliquée dans ce phénomène. En effet, l'induction de P53 accompagnée de celle du transcrit p21 à partir de 12 ou 24 h de traitement, peut intervenir dans le maintien du blocage en G₁/S ou dans son renforcement.

Par contre, le processus d'apoptose pourrait ne dépendre que de l'accumulation de la protéine P53, puisque pour les deux lignées cellulaires, une augmentation de la proportion de cellules en apoptose n'est détectée qu'après induction de la protéine P53.

L'expression des transcrits et des protéines virales E6 et E7 est diminuée après 24 ou 32 h d'exposition au 5FU, pour KB et KB3, respectivement. La variation de l'expression de E6 est en relation inverse avec la variation de P53.

Les différences de comportement entre les deux lignées présentant une différence de sensibilité au 5FU, sont une différence d'intensité de blocage en G₁/S et une différence de cinétique d'environ 12 h dans la mise en place des mécanismes d'apoptose. Ce décalage peut être en relation avec la différence de prolifération entre les deux lignées cellulaires.

Le traitement par 5FU entraîne donc les mêmes effets (arrêt en G₁/S et apoptose) sur des lignées, exprimant une protéine P53 sauvage, infectées ou non par le virus HPV. De plus, le 5FU a également une action antivirale vis-à-vis du virus HPV (Clark *et al.*, 1998; Holmes *et al.*, 1999). Le traitement par 5FU pourrait donc avoir un double intérêt dans le traitement de carcinomes infectés par HPV, par ses actions antivirales et antitumorales.

6.3. Second type de stress génotoxique : radiothérapie

6.3.1. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire après radiothérapie

Après irradiation, de nombreuses études ont mis en évidence un blocage en G_1/S et/ou en G_2/M et/ou une accumulation en phase S due à un ralentissement de la synthèse de l'ADN (Hartwell et Kastan, 1994; Iliakis, 1997; Schwartz *et al.*, 1997).

Après un marquage des cellules à l'IP et une analyse par cytométrie en flux, la répartition des cellules dans le cycle cellulaire après une irradiation à 2 Gy a été étudiée. Les cellules KB et KB3 subissent un blocage en G_2/M et une accumulation en phase S (Figure 30).

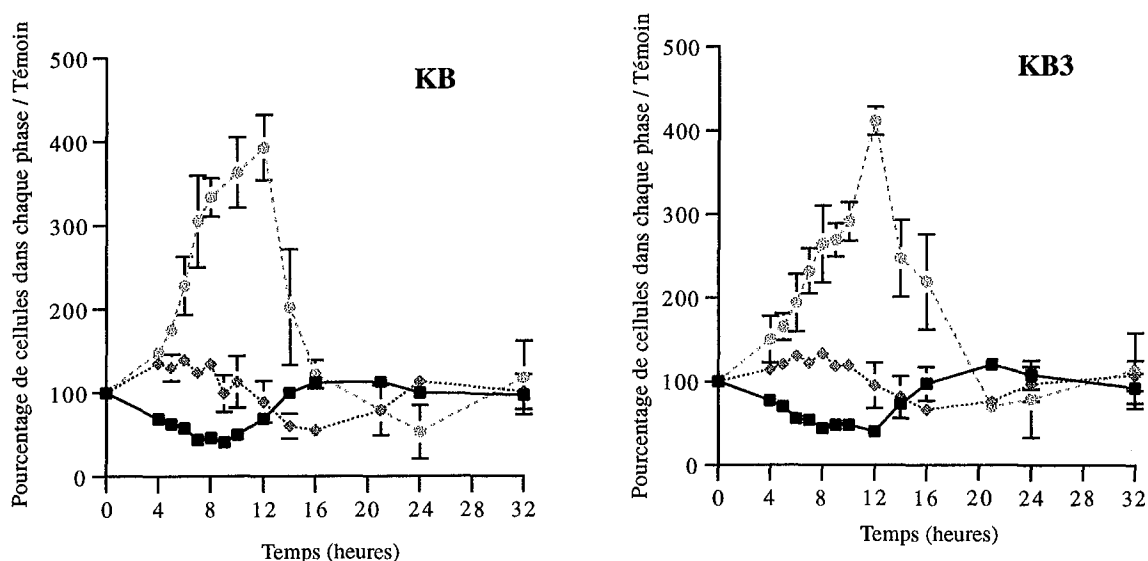


Figure 30 : Répartition des cellules dans les phases G_1 (■), S (◆) et G_2 (●) du cycle cellulaire après une irradiation de 2 Gy. Les résultats représentent les moyennes et écarts types des pourcentages de cellules dans chaque phase, normalisés par rapport à un témoin non irradié. (n=3).

Durant les 8 premières heures pour la lignée KB et les 12 premières heures pour le clone KB3, la quantité de cellules en phase G_1 du cycle cellulaire diminue. Puis, au delà de 12 h, la proportion de cellules en G_1 augmente afin de retrouver le pourcentage initial (Figure 30).

Durant les 8 premières heures qui suivent l'irradiation à 2 Gy, une accumulation statistiquement significative des cellules en phase S peut être observée pour les deux lignées (Figure 30). Cette accumulation peut provenir d'un ralentissement de la synthèse de l'ADN après irradiation déjà démontré précédemment (Maity *et al.*, 1994; Sailer *et al.*, 1998).

RESULTATS et DISCUSSION

Après une irradiation à 2 Gy, un blocage des cellules en G₂/M a pu être mis en évidence pour les deux lignées cellulaires. Nous pouvons observer une différence de mise en place de ce blocage avec un maximum entre 10 et 12 h pour KB et à 12 h pour KB3. Au delà de 12 h après irradiation, les cellules sortent de ce blocage et le pourcentage d'accumulation des cellules en G₂/M diminue rapidement (Figure 30). L'arrêt en G₂/M radio-induit joue un rôle important dans la radiosensibilité des cellules. En effet, après inhibition de cet arrêt par des agents tels que le méthylxanthine ou la staurosporine, les cellules sont plus radiosensibles (Bernhard *et al.*, 1996; Busse *et al.*, 1978; Powell *et al.*, 1995; Russell *et al.*, 1995). Inversement, les cellules présentant un arrêt en G₂/M long sont radiorésistantes (McKenna *et al.*, 1991; Su and Little, 1993). Il existe donc une relation entre l'arrêt en G₂/M et sa durée, et la radiosensibilité (Tamamoto *et al.*, 1999). En fait, durant cet arrêt, des systèmes de réparation des dommages de l'ADN peuvent se mettre en place et ainsi rendre les cellules plus résistantes au stress infligé (Schwartz *et al.*, 1997).

Cependant, pour notre modèle cellulaire, aucune relation entre l'intensité du blocage en G₂/M et le niveau de radiosensibilité des cellules n'a pu être observée puisque cette intensité est similaire entre les lignées KB et KB3, alors que leur radiosensibilité est différente. Par contre, la lignée KB atteint un maximum de cellules en G₂/M 4 h avant le clone KB3. Ainsi, le blocage maximum en G₂/M est plus long pour les cellules KB que pour les cellules KB3. Ce phénomène peut être un élément d'explication à l'origine de la différence de radiosensibilité entre ces deux lignées cellulaires et peut provenir de la différence de prolifération entre KB et KB3.

Selon le type cellulaire, l'implication de la protéine P53 dans le blocage en G₂/M est différente. Certains auteurs décrivent P53 comme un inducteur de la mise en place et du maintien de ce blocage (Bunz *et al.*, 1998; Winters *et al.*, 1998) et d'autres auteurs décrivent que P53 induit la sortie des cellules de ce blocage (Guillouf *et al.*, 1995; Leach *et al.*, 1998; Skladanowski et Larsen, 1997).

De plus, les protéines virales E6 et E7 sont également impliquées dans la répartition des cellules dans le cycle cellulaire. E6 a une action directe sur l'expression de la protéine P53 en induisant sa dégradation et E7 induit le passage des cellules de la phase G₁ vers la phase S. E7 peut aussi agir au niveau du passage des cellules de la phase G₂ vers la mitose en interagissant de façon spécifique avec la kinase de l'histone 1 (Davies *et al.*, 1993). E7 peut s'associer à d'autres protéines cellulaires impliquées dans le contrôle du cycle telles que les complexes

cdk2-cycline E/A impliqués dans la régulation de la phase S et du passage G₂/M (McIntyre *et al.*, 1996; Tommasino *et al.*, 1993).

Pour vérifier l'implication de chacune de ces protéines, P53, E6 et E7, dans la répartition des cellules dans le cycle cellulaire après irradiation, leur expression respective a été étudiée après irradiation.

6.3.2. Cinétique d'expression de la protéine P53 après radiothérapie

Les lignées KB et KB3 expriment une protéine P53 sauvage (Mirjolet, 2000) mais sont infectées par le virus HPV-18 (Boshart *et al.*, 1984).

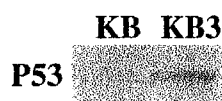


Figure 31 : Niveau constitutif d'expression de la protéine P53 dans KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.

Au niveau constitutif, la lignée KB exprime plus la protéine P53 que le clone KB3 (Figure 31). De nombreuses études ont mis en évidence que les radiations ionisantes induisaient l'accumulation de la protéine sauvage P53 (Pluquet et Hainaut, 2001). Cette accumulation est déclenchée après des cassures double-brin de l'ADN. Par exemple, la kinase DNA-PK est activée lorsque ses sous-unités KU70 et KU80 se fixent au niveau d'une cassure double-brin de l'ADN, et phosphoryle alors P53 (Lees-Miller *et al.*, 1992; Shieh *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 1998) ainsi que la protéine Mdm-2. *In vitro*, ces phosphorylations empêchent la dégradation de la protéine P53 (Mayo *et al.*, 1997).

Dans le but d'appréhender le rôle de la protéine P53 sauvage après irradiation de nos lignées cellulaires HPV-18 positives, nous avons donc étudié pour KB et KB3, les variations de l'expression de la protéine P53 après une irradiation à 2 Gy.

Après une irradiation à 2 Gy, l'expression de la protéine P53 est induite dès 8 h après irradiation pour la lignée cellulaire KB, et 12 h pour le clone KB3 (Figure 32). Pour les deux lignées, l'expression de P53 diminue 24 h après une irradiation à 2 Gy (Figure 32).

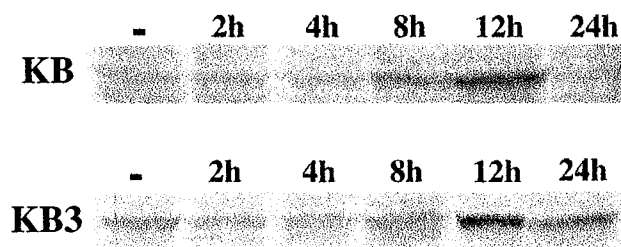


Figure 32 : Variations d'expression de la protéine P53 après une irradiation de 2Gy des cellules KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.

Ainsi, malgré l'infection des lignées KB et KB3 par le virus HPV-18, la protéine sauvage P53 peut être radio-induite après une irradiation à 2 Gy, comme pour des cellules HPV-négatives (Canman *et al.*, 1998; Giaccia et Kastan, 1998; Kastan *et al.*, 1991).

Pour les lignées cellulaires KB et KB3, l'expression de la protéine P53 est induite après le début de la mise en place du blocage en G_2/M . Par contre, juste après l'accumulation de P53 radio-induite, le pourcentage de cellules en G_2/M diminue rapidement. Ainsi, pour notre modèle cellulaire, il semble que P53 induise la levée du blocage en G_2/M .

Actuellement, le seul mécanisme moléculaire connu pouvant expliquer l'induction par P53 de l'entrée des cellules en phase M se fait *via* l'inhibition de l'expression de la protéine Wee1. La protéine Wee1 est responsable de la phosphorylation inhibitrice de la kinase Cdc-2 en position tyrosine 15 (Parker *et al.*, 1991; Russell et Nurse, 1987). Ainsi, en son absence, le complexe Cycline B1/Cdc-2 est activé et les cellules passent le point de contrôle G_2/M (Leach *et al.*, 1998).

6.3.3. Effet de la radiothérapie sur l'expression des transcrits et des protéines virales E6 et E7

L'expression des transcrits E6/E7 diminue significativement à partir de 12 h après une irradiation à 2 Gy, pour les deux lignées cellulaires (Figure 33).

RESULTATS et DISCUSSION

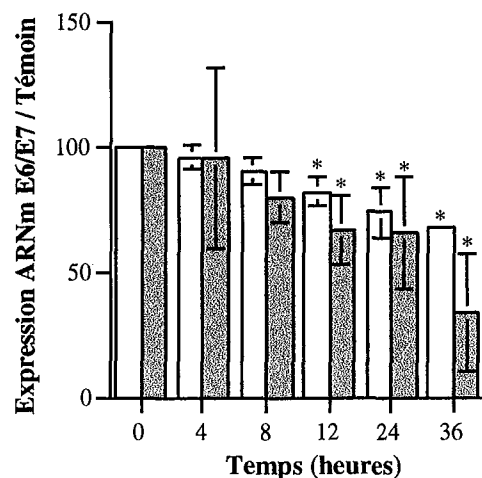


Figure 33 : Variations d'expression du transcrit E6/E7 après une irradiation à 2 Gy des cellules KB (□) et KB3 (▨). Les résultats représentent les moyennes des ratios d'expression E6/E7 / β_2m normalisés par rapport à un témoin non irradié (n=3). * Variation statistiquement significative par rapport au témoin (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

L'expression constitutive de la protéine E6 est plus importante pour la lignée KB que pour le clone KB3 (Figure 34).

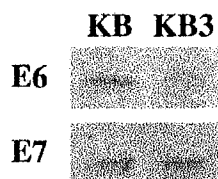


Figure 34 : Niveau constitutif d'expression des protéines E6 et E7 dans KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.

Pour la lignée KB, l'expression de la protéine E6 reste constante durant les 4 premières heures après irradiation puis diminue 8 h après une irradiation à 2 Gy (Figure 35).

Pour le clone KB3, l'expression de la protéine E6 reste constante durant les 8 premières heures après irradiation puis diminue 12 h après une irradiation à 2 Gy (Figure 35).

RESULTATS et DISCUSSION

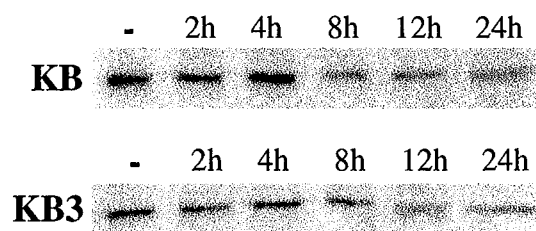


Figure 35 : Variation d'expression de la protéine E6 après une irradiation de 2Gy des cellules KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.

Pour les deux lignées cellulaires, la diminution d'expression de E6 est en relation avec l'induction de l'expression de la protéine P53. Cette variation inverse d'expression de P53 et de E6 peut être expliquée par l'action de E6 sur la dégradation de P53 (Huibregtse *et al.*, 1991). En effet, plus la protéine E6 est exprimée, plus elle peut ubiquitiner de protéines P53 qui seront ensuite dégradées par le protéasome 26S.

La variation d'expression de la protéine E6 est en relation avec la variation d'expression des transcrits E6/E7 pour les deux lignées cellulaires (Figure 33).

Tout comme la protéine E6, l'expression de la protéine E7 reste constante durant les premières heures après une irradiation à 2 Gy, puis diminue à partir de 8 h pour la lignée KB et 12 h pour le clone KB3 (Figure 36). Ainsi, comme pour la protéine E6, la variation de l'expression de la protéine E7 est en relation avec l'expression du transcrit E6/E7 (Figure 33).

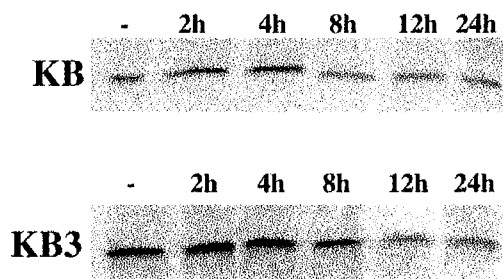


Figure 36 : Variations d'expression de la protéine E7 après une irradiation de 2Gy des cellules KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.

Ainsi, contrairement à l'étude de l'équipe de Santin travaillant sur des lignées cellulaires de carcinomes du col utérin humains, l'irradiation n'a induit l'expression ni des transcrits ni des protéines E6 et E7 (Santin *et al.*, 1998). Au contraire, pour nos deux lignées cellulaires, ces expressions sont diminuées après une irradiation à 2 Gy.

RESULTATS et DISCUSSION

Durant les 8 premières heures pour la lignée KB et les 12 premières heures pour le clones KB3, la quantité de cellules en phase G_1 du cycle cellulaire diminue. Puis, au delà de 12 h, la proportion de cellules en G_1 augmente afin de retrouver le pourcentage initial (Figure 30). Cette réaugmentation se fait au même moment que la diminution de l'expression de la protéine E7, respectivement à 8 et 12 h après irradiation pour la lignée KB et le clone KB3. En effet, comme la protéine E7 induit le passage des cellules de la phase G_1 vers la phase S (Chellappan *et al.*, 1992), lorsque l'expression de cette protéine est diminuée, les cellules restent plus longtemps en phase G_1 .

6.3.4. Effet de la radiothérapie sur l'expression des transcrits p21

Après une irradiation à 2 Gy, nous avons observé une induction de l'expression de la protéine P53 pour les deux lignées cellulaires. Cependant, contrairement au traitement par 5FU, l'irradiation n'a pas induit de blocage en G_1/S des cellules.

En plus de son action sur l'arrêt en G_1/S , la protéine P21 est également impliquée dans le maintien du blocage en G_2/M en inhibant l'activité kinase de Cdc-2 (Boulaire *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2000).

Pour les deux lignées cellulaires, aucune variation significative d'expression du gène codant pour P21 n'a pu être mise en évidence après une irradiation à 2 Gy, même au delà de 12 h, où une accumulation de la protéine P53 a été observée (Figure 37). Ainsi, pour les lignées KB et KB3, une irradiation à 2 Gy entraîne une induction de l'expression protéique de P53, mais cette dernière ne transactive pas le gène p21. N'étant pas activée, la protéine P21 n'induit ni l'arrêt des cellules en G_1/S , ni le maintien des cellules en G_2/M .

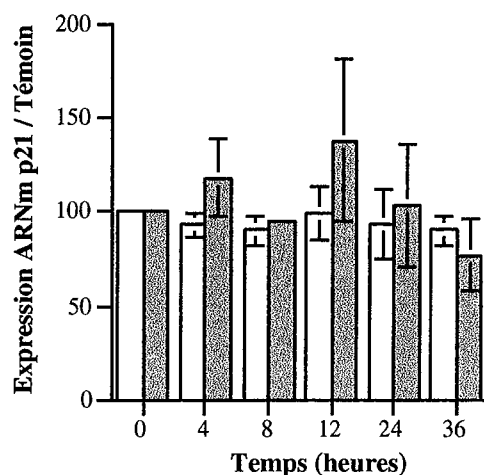


Figure 37 : Variations d'expression du transcrit p21 après une irradiation à 2 Gy des cellules KB (□) et KB3 (▨). Les résultats représentent les moyennes des ratios d'expression p21/ β_2 m normalisés par leur contrôle (n=3). * Variation statistiquement significative par rapport à un témoin non irradié (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Puisque pour notre modèle cellulaire, l'accumulation de P53 n'entraîne pas d'induction de l'expression de p21, nos résultats peuvent être comparés à ceux de Bunz *et al.* Cette équipe a démontré que P53 maintient le blocage des cellules en G_2/M après irradiation, uniquement quand cette protéine induit l'expression de P21 (Bunz *et al.*, 1998).

6.3.5. Effet de la radiothérapie sur le pourcentage de cellules en apoptose

Pour la lignée mère KB, la plus radorésistante, aucune variation du pourcentage de cellules en apoptose n'a pu être mise en évidence durant les 24 h qui suivent une irradiation à 2 Gy (Figure 38).

Pour le clone KB3, le plus radiosensible, une induction significative du pourcentage de cellules en apoptose est observée dès 8 h après une irradiation à 2 Gy (Figure 38).

Plusieurs études ont démontré que le devenir des cellules qui sortent du blocage en G_2/M serait la mort par apoptose (Guillouf *et al.*, 1995; Leach *et al.*, 1998). Pour le clone KB3, la mise en place de l'apoptose se produit avant la sortie des cellules en G_2/M (Figure 30). Ainsi, dans notre modèle, ces deux phénomènes seraient indépendants.

De même, la mise en place de l'apoptose se produit également avant l'accumulation de la protéine P53 (Figure 32).

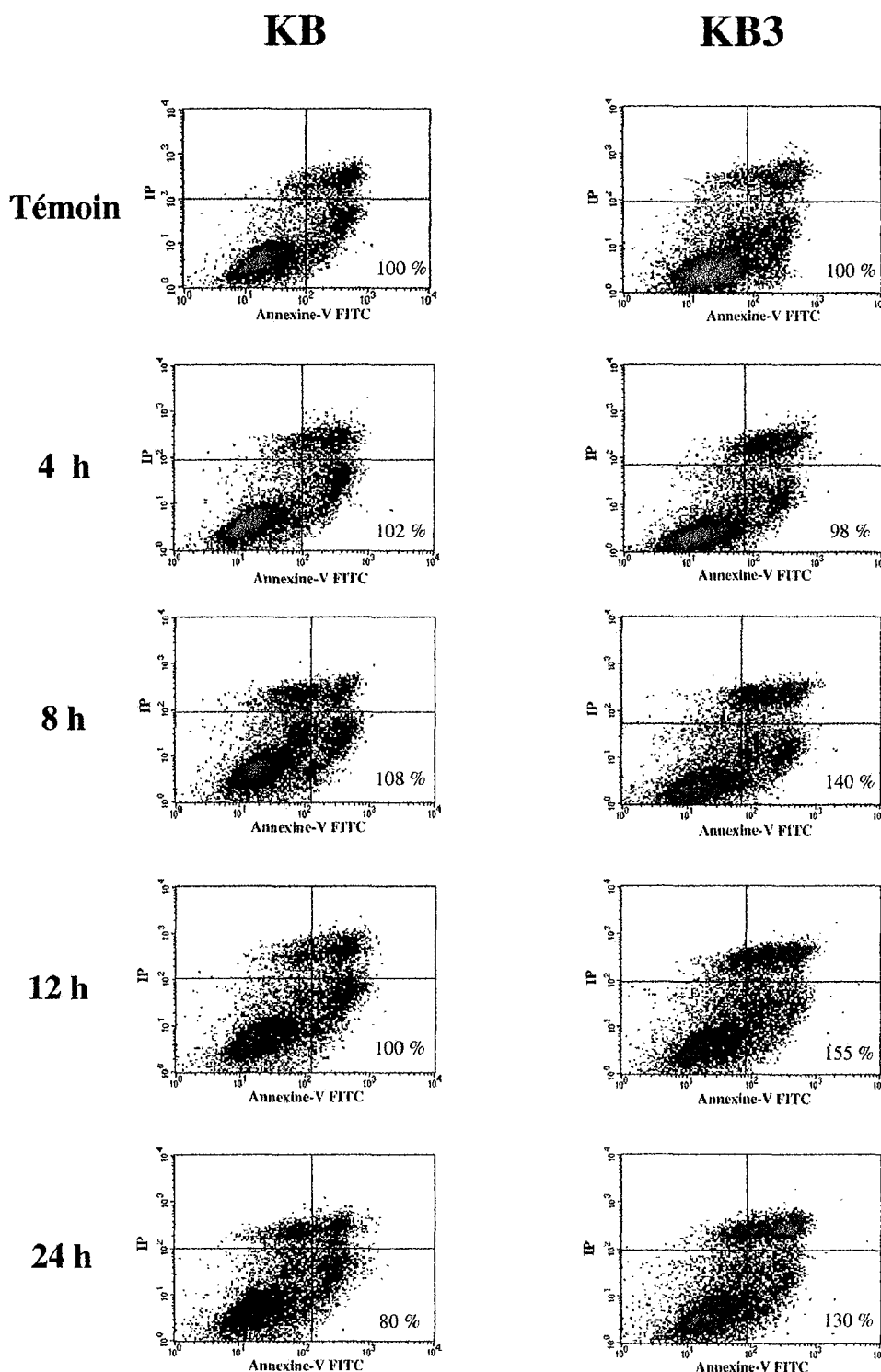


Figure 38 : Variation du pourcentage de cellules KB et KB3 en apoptose après 2 Gy d'irradiation. Les résultats sont normalisés par rapport au témoin non irradié. Ces cytogrammes sont représentatifs de trois expérimentations indépendantes.

Ainsi, l'induction de l'apoptose par une irradiation à 2 Gy pour le clone KB3, serait indépendant à la fois de la protéine P53 et de la sortie du blocage en G₂/M.

RESULTATS et DISCUSSION

La différence de mise en place de l'apoptose entre KB et KB3 peut, au moins en partie, expliquer la différence de radiosensibilité.

6.3.6. Conclusion

La radiothérapie induit l'accumulation de la protéine P53 sauvage dans les lignées KB et KB3 HPV-18 positives. Cette accumulation est observée au même moment que la diminution de l'expression de la protéine virale E6, impliquée dans la dégradation de P53. Une irradiation à 2 Gy a également entraîné la diminution de l'expression de la protéine virale E7 et la variation de l'expression des protéines E6 et E7 est en relation avec la variation de l'expression de leur transcrit commun.

Durant les premières heures après irradiation, une accumulation des cellules en phase S a été observée, ainsi qu'une diminution de la proportion de cellules en phase G₁. La ré-augmentation du pourcentage de cellules en G₁ à son niveau d'origine, est observée au même moment que la diminution de l'expression de la protéine E7.

Pour les deux lignées cellulaires, une irradiation à 2 Gy a entraîné un blocage des cellules en G₂/M dont la sortie se fait au même moment que l'accumulation maximale de la protéine P53. Enfin, seul le clone KB3 déclenche le mécanisme d'apoptose durant les 24 h après irradiation. Cette apoptose se met en place avant l'induction de la protéine P53, et avant la sortie des cellules du blocage en G₂/M.

Pour notre modèle cellulaire, l'irradiation a entraîné la mise en place d'un blocage des cellules en G₂/M *via* un mécanisme indépendant de la protéine P53. Par contre, la sortie des cellules de ce blocage serait dépendante de P53.

Le mécanisme d'apoptose, observé pour le clone KB3, semble également provenir d'un mécanisme indépendant de P53 et n'est pas la conséquence du blocage en G₂/M.

Les différences à la fois, du temps de blocage maximum en G₂/M et d'induction de l'apoptose entre les deux lignées cellulaires, peuvent participer à l'explication de la différence de radiosensibilité entre KB et KB3. Cependant, d'autres mécanismes peuvent également intervenir dans la réponse des cellules aux radiations ionisantes ainsi qu'à leur radiosensibilité.

6.4. Implication de l'activité constitutive de NF- κ B dans le niveau basal d'apoptose et la radiosensibilité

Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que l'inflammation et la régulation de la mise en place de l'apoptose. Dans la majorité des cas, NF- κ B a un effet anti-apoptotique *via*, entre autres, la transactivation de gènes dont les produits ont une action anti-apoptotique comme les protéines A20 et cIAP. Ce facteur de transcription est activé par de nombreux stimuli dont les radiations ionisantes. Ainsi, ces dernières années plusieurs équipes se sont intéressées à l'implication de NF- κ B dans la réponse cellulaire aux radiations ionisantes. Le plus souvent, ces études concernaient le rôle de la radio-activation de NF- κ B dans la réponse cellulaire. En 1998, l'équipe de Lezoualc'h a démontré qu'une importante activité constitutive de NF- κ B conférait une résistance des cellules neuronales au stress oxydatif (Lezoualc'h *et al.*, 1998). A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'influence de l'activité constitutive sur la radiosensibilité cellulaire. Cependant, il est empiriquement admis que des cellules ayant une importante activité constitutive de NF- κ B sont radiorésistantes, sans toutefois être démontré.

L'objectif de cette étude a été d'appréhender l'implication de l'activité constitutive de ce facteur de transcription dans la radiosensibilité des cellules KB et KB3 ainsi que dans la capacité de ces lignées cellulaires à entrer en apoptose spontanément.

6.4.1. Activité constitutive de NF- κ B dans KB et KB3

Par la technique de gel retard, nous avons pu démontrer que la lignée mère KB, la plus radiorésistante, possède une activité constitutive NF- κ B plus importante que le clone KB3 (Figure 39).

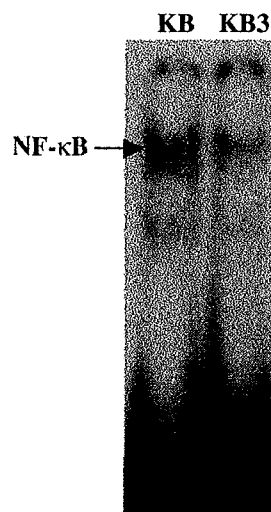


Figure 39 : Activité constitutive de NF- κ B pour KB et KB3. Cette image est représentative de 5 expérimentations indépendantes.

6.4.2. Nature du complexe NF- κ B dans KB et KB3

Les deux lignées cellulaires expriment le complexe NF- κ B P50/P65 (Figure 40). Celui-ci est le plus communément décrit comme étant activateur d'un grand nombre de gènes (McKay et Cidlowski, 1999).

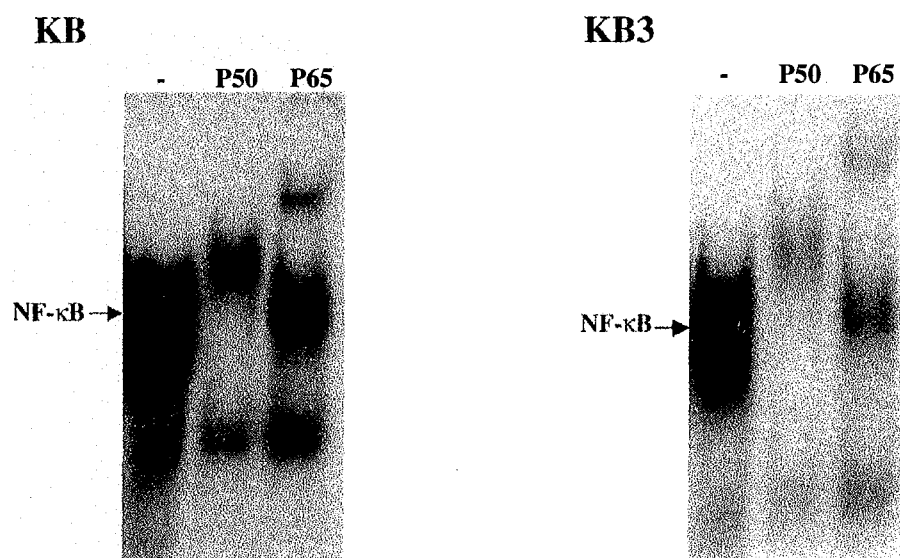


Figure 40 : Super shift pour KB et KB3 avec les anticorps anti-P50 (piste 2) et anti-P65 (piste 3), comparés aux échantillons sans anticorps (-). Ces images sont représentatives de 3 expérimentations indépendantes.

RESULTATS et DISCUSSION

6.4.3. Modulation de l'activité de NF- κ B

Il est possible de moduler l'activité de NF- κ B positivement par le TNF α (Barkett et Gilmore, 1999) et négativement par la DEX (Auphan *et al.*, 1995). Afin de démontrer l'implication de la différence d'activité constitutive de NF- κ B entre KB et KB3, sur leur différence à la fois de radiosensibilité et d'apoptose basale, cette activité a été modulée par une exposition au TNF α ou à la DEX.

Pour chacun de ces traitements, plusieurs conditions ont été testées. Les conditions choisies sont celles qui ont entraîné l'effet souhaité sur l'activité de NF- κ B avec la concentration du modulateur la plus faible et le temps de contact le plus court possible.

Ainsi, une exposition à 2,5 ng/ml de TNF α durant 10 min a entraîné une induction significative de l'activité NF- κ B pour les deux lignées (Figure 41). A l'inverse, une exposition à 10^{-6} M de DEX durant 24 h a inhibé en quasi totalité l'activité du facteur de transcription NF- κ B pour KB et KB3 (Figure 41). La spécificité de la bande retardée a été vérifiée en utilisant un compétiteur non radio-marqué sur les échantillons KB et KB3 traités par du TNF α (Figure 41).

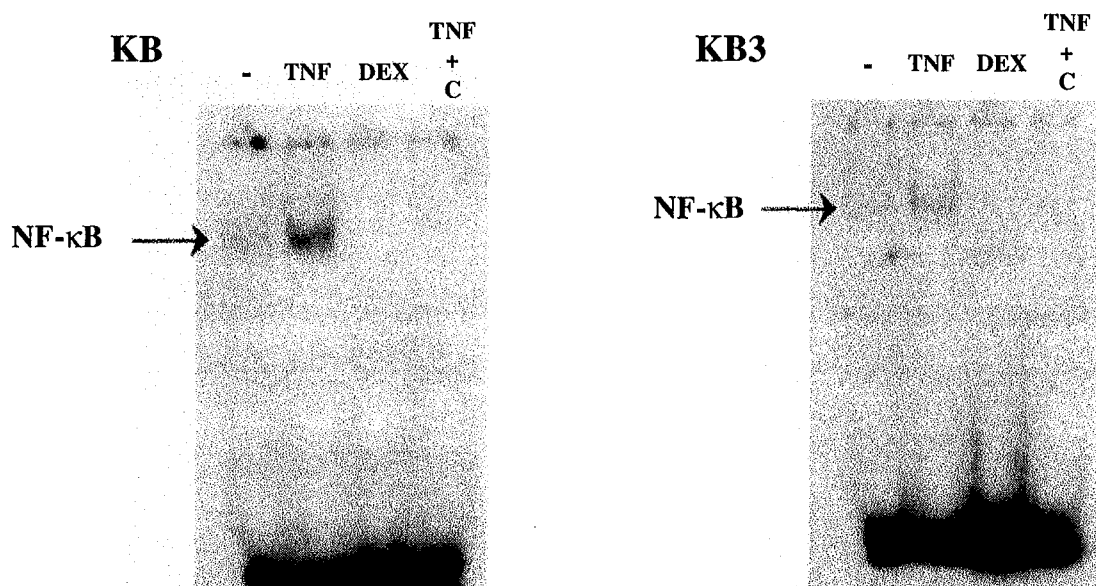


Figure 41 : Modulation de l'activité constitutive de NF- κ B par une exposition à du TNF α (piste 2) ou de la dexaméthasone (piste 3). La vérification de la spécificité de la bande retardée a été réalisée avec un compétiteur (C) non radio-marqué (piste 4). Ces images sont représentatives de 3 expérimentations indépendantes.

RESULTATS et DISCUSSION

L'activation de NF- κ B fait suite à la décomplexation de celui-ci avec la protéine I κ B. Deux cas de figures ont été décrit à propos du devenir de I κ B après l'activation de NF- κ B. Cette protéine est soit dégradée par le protéasome 26 S après avoir subi des ubiquitinations (Zandi et Karin, 1999), soit recyclée (Imbert *et al.*, 1996). Pour les lignées KB et KB3, l'expression de la protéine I κ B diminue significativement à partir de 1 heure après exposition des cellules au TNF α qui active NF- κ B (Figure 42). Nous pouvons en conclure que pour les deux lignées cellulaires KB et KB3, I κ B est dégradée après être décomplexée de NF- κ B.

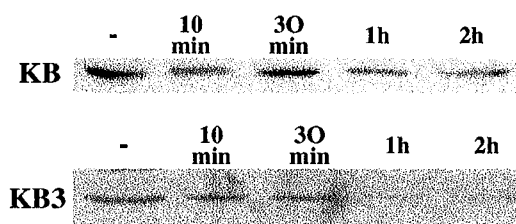


Figure 42 : Cinétique d'expression de la protéine I κ B α pour les cellules KB et KB3, après exposition au TNF α durant 10 minutes. Ces images sont représentatives de 3 expérimentations indépendantes.

6.4.4. Impact de la modulation de NF- κ B sur le pourcentage de cellules en apoptose

Au niveau basal, les lignées KB et KB3 présentent une différence statistiquement significative du pourcentage de cellules en apoptose basale ($p < 0,05$) avec respectivement 5 ± 1 % et 16 ± 4 % pour KB et KB3 (Figure 43). Avec l'ensemble des clones développés au départ (KB3, KB7 et KB8), le paramètre SF₂ et le pourcentage de cellules en apoptose basale corrént de façon statistiquement significative ($r = 0,907$, $p = 0,007$). Cette corrélation a déjà été observée cliniquement. Les auteurs concluent que le pourcentage de cellule en apoptose avant traitement pourrait être un paramètre prédictif de la radiosensibilité (Levine *et al.*, 1995).

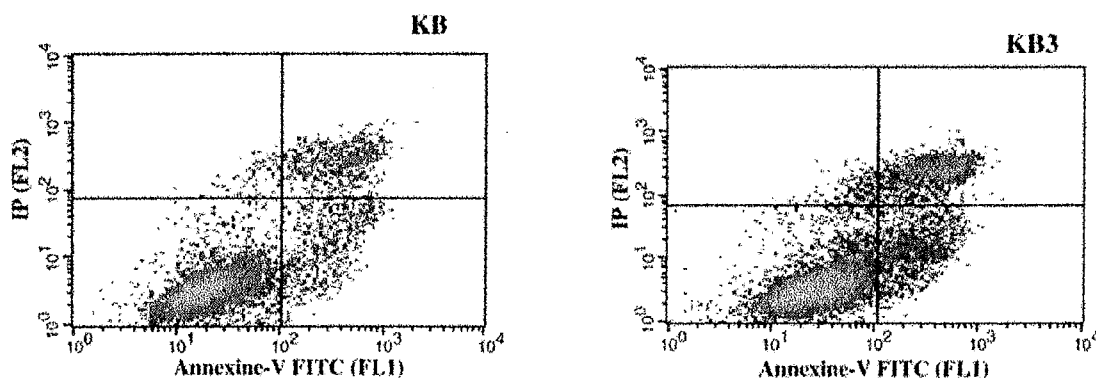


Figure 43 : Cytogramme de l'apoptose basale pour KB et KB3. Analyse par cytométrie en flux après un double marquage Annexine-V et IP. Ces images sont représentatives de 5 expérimentations indépendantes.

Pour chaque lignée, le pourcentage de cellules en apoptose a été mesuré après exposition au $\text{TNF}\alpha$ et à la DEX dans les mêmes conditions que précédemment.

Exposition à la DEX

Pour la lignée KB, la diminution de l'importante activité constitutive de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ par la DEX, a entraîné une augmentation statistiquement significative d'un facteur $1,63\pm 0,05$ du pourcentage de cellules en apoptose ($p<0,05$, Figure 44). Pour les cellules KB3, l'exposition à la DEX a conduit à une augmentation non significative du pourcentage de cellules en apoptose. Cependant, l'activité constitutive de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pour cette lignée était déjà très faible avant l'inhibition par la DEX (Figure 39).

Exposition au $\text{TNF}\alpha$

Pour le clone KB3, l'induction de la faible activité constitutive de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ par le $\text{TNF}\alpha$ a entraîné une diminution significative d'un facteur $0,58\pm 0,03$ de la quantité de cellules en apoptose ($p<0,05$, Figure 44). Pour la lignée KB, cette exposition à du $\text{TNF}\alpha$ n'a aucun effet significatif sur le pourcentage des cellules en apoptose (Figure 44). Cependant, pour KB, il semble techniquement difficile de détecter une diminution significative de son pourcentage de cellules en apoptose puisque celui-ci est déjà très faible avant exposition aux modulateurs (5%, Figure 43).

Le $\text{TNF}\alpha$ est largement décrit comme étant un inducteur de l'apoptose (Hsu *et al.*, 1996).

D'autres études ont démontré que $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pouvait supprimer l'apoptose induite par le $\text{TNF}\alpha$ (Van Antwerp *et al.*, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1998). Dans nos conditions, le $\text{TNF}\alpha$ n'a aucun effet sur la lignée KB et conduit à une diminution de la quantité de cellules en apoptose pour le clone KB3.

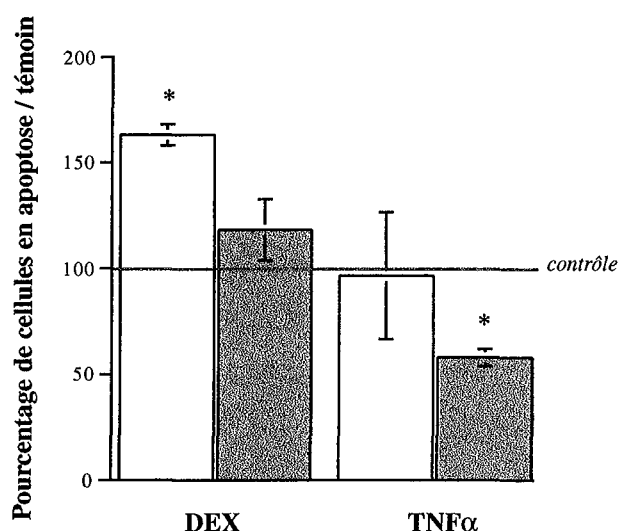


Figure 44 : Variation du pourcentage de cellules en apoptose par rapport au témoin, après exposition à la dexaméthasone (DEX) ou au TNF α pour KB (□) et KB3 (■) (n=3) * Variation statistiquement significative par rapport au contrôle (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

La modulation de l'activité de NF- κ B entraîne donc une variation du pourcentage de cellules en apoptose. Etant donné que l'induction de cette activité provoque une diminution de la quantité de cellules apoptotiques et qu'inversement, l'inhibition de cette activité conduit à une augmentation de la quantité de cellules en apoptose, NF- κ B jouerait un rôle anti-apoptotique pour notre modèle cellulaire.

Ainsi, il existe une relation entre la différence d'activité constitutive de NF- κ B entre KB et KB3 et le niveau basal de cellules en apoptose.

6.4.5. Impact de la modulation de NF- κ B sur la radiosensibilité

. Nous avons démontré dans le paragraphe précédent que le pourcentage d'apoptose basal est en relation avec l'activité constitutive de NF- κ B. De plus, pour notre modèle cellulaire, une corrélation entre l'apoptose basale et la radiosensibilité a été observée. L'activité constitutive de NF- κ B pourrait donc être impliquée dans cette corrélation. Afin d'étudier l'impact de l'activité constitutive de NF- κ B sur la radiosensibilité des lignées cellulaires, nous avons étudié leur radiosensibilité après un pré-traitement par de la DEX pour KB, afin d'inhiber la forte activité constitutive NF- κ B dans cette lignée, et par du TNF α pour KB3, afin d'induire la faible activité de NF- κ B dans ces cellules.

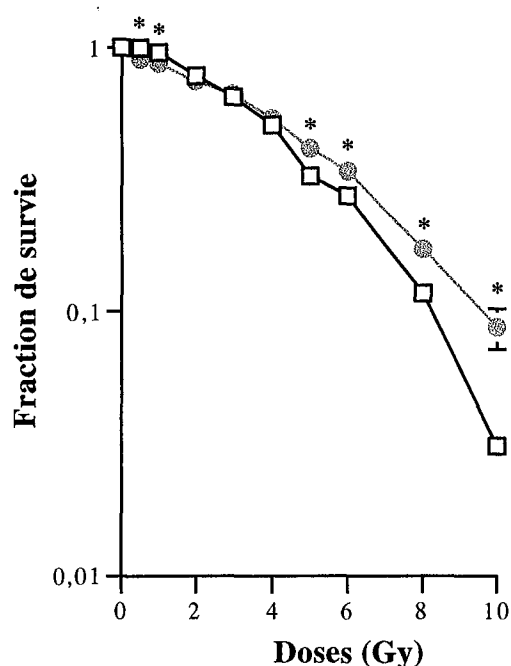


Figure 45 : Courbes de radiosensibilité de KB après un pré-traitement à la DEX (⊗) ou sans pré-traitement (□). Les résultats représentent les moyennes et les écarts types de 3 expérimentations indépendantes, * Variations statistiquement significatives entre les points des deux courbes, test non paramétrique U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Pour la lignée KB, le pré-traitement par la DEX induit une radiosensibilisation statistiquement significative à faible dose d'irradiation (< 3 Gy) (Figure 45), avec une augmentation du paramètre α d'un facteur 2 (Tableau 19). En utilisant la transfection du super-répresseur I κ B pour inhiber l'activité de NF- κ B, l'équipe de Pajonk n'a pas mis en évidence une radiosensibilisation des lignées cellulaires de Lymphome d'Hodgkin et de prostate (Pajonk *et al.*, 1999). Par contre, sur des cellules de glioblastome, la transfection par I κ B super-répresseur a entraîné une augmentation de la radiosensibilité cellulaire (Yamagishi *et al.*, 1997). Comme le super-répresseur inhibe à la fois l'activité de NF- κ B et sa radio-activation, cette technique d'inhibition ne nous donne pas le même résultat que l'exposition à la DEX. En effet, la DEX n'inhibe que l'activité constitutive, c'est-à-dire celle présente au moment de l'irradiation, et n'empêche pas la radio-activation de NF- κ B (Figure 46). L'exposition par de la DEX permet donc uniquement de moduler le niveau constitutif de NF- κ B.

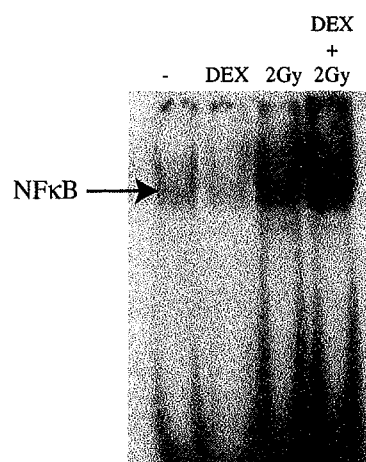


Figure 46 : Activité de NF- κ B après une exposition à la dexaméthasone (piste 2) seule, une irradiation à 2 Gy (piste 3) ou une irradiation à 2 Gy réalisées après un prétraitement à la DEX (piste 4), comparé au contrôle (piste 1).

Plus récemment, en inhibant l'activité NF- κ B par des inhibiteurs de protéasomes, plusieurs équipes ont mis en évidence que cette inhibition était accompagnée d'une radiosensibilisation cellulaire ou même d'une réduction du volume tumoral dans une étude *in vivo* (Pajonk et McBride, 2001; Russo *et al.*, 2001).

Tableau 19 : Paramètres de radiosensibilité de KB et KB3 avec ou sans prétraitement. Ces paramètres sont calculés à partir des courbes de survie obtenue à partir de la moyenne de trois expérimentations indépendantes et ajustées avec le modèle linéaire et quadratique.

	Lignées cellulaires			
	KB		KB3	
	Témoin	DEX	Témoin	TNF α
SF₂	0,799	0,758	0,480	0,632
α	0,052	0,114	0,064	0,054
β	0,030	0,012	0,151	0,087

Pour la lignée KB, un prétraitement par de la DEX, entraîne une augmentation de la radorésistance avec des doses d'irradiation supérieures à 5 Gy (Figure 45). Cette constatation est illustrée par une diminution significative du paramètre β de 60 % (Tableau 19). Récemment, une étude a mis en évidence avec des cellules de Lymphomes d'Hodgkin, qu'une exposition à la DEX entraînait une augmentation de la radorésistance sans modifier l'activité du facteur de transcription NF- κ B (Pajonk *et al.*, 2000). De même, pour KB, cet effet inversé

RESULTATS et DISCUSSION

à partir de 5 Gy par rapport aux irradiations à plus faible dose, peut être expliqué par une action de la DEX *via* une voie indépendante de NF- κ B.

Concernant le clone KB3, le prétraitement par du TNF α induit une augmentation de la radorésistance des cellules de façon significative dès 2 Gy (Figure 47). Cette augmentation de la radorésistance est illustrée par une augmentation d'un facteur 1,3 du paramètre SF₂ (Tableau 19).

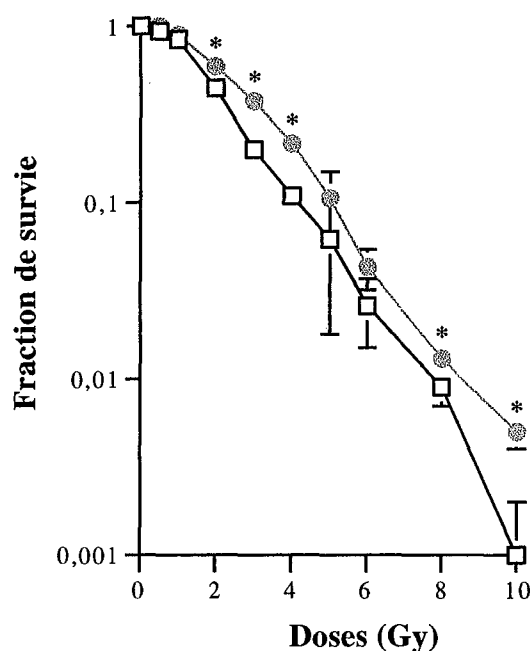


Figure 47 : Courbes de radiosensibilité de KB3 avec un pré-traitement par du TNF α (●) ou sans prétraitement (□). Les résultats représentent les moyennes et les écarts types de 3 expérimentations indépendantes. * Variations statistiquement significatives entre les deux courbes, test non paramétrique U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

La diminution de l'activité constitutive de NF- κ B par la DEX, radiosensibilise les cellules KB à faible dose sans empêcher la radioactivation du facteur de transcription. Par contre à plus fortes doses, la DEX entraîne une augmentation de la radorésistance des cellules KB *via* un effet pouvant être indépendant de l'action sur l'activité NF- κ B. Inversement, pour KB3, l'augmentation de l'activité constitutive de NF- κ B suite à un traitement par du TNF α , rend les cellules plus radorésistantes.

RESULTATS et DISCUSSION

Il semble donc utile de diminuer l'activité constitutive de NF- κ B avant une radiothérapie. Cependant, la DEX ne semble pas être le meilleur prétraitement à envisager puisque ce glucocorticoïde peut rendre, dans certaines conditions les cellules plus radiorésistantes (Mariotta *et al.*, 1999; Pajonk *et al.*, 2000). Une autre voie d'inhibition de NF- κ B telle que par un traitement par des anti-protéasomes pourrait être une approche intéressante afin de radiosensibiliser les cellules cancéreuses.

6.4.6. Conclusion

Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires dont la régulation de l'apoptose et la réponse aux radiations ionisantes.

La modulation de l'activité de NF- κ B entraîne une variation du niveau basal de l'apoptose, démontrant ainsi une relation entre le pourcentage de cellules en apoptose basale et l'activité constitutive de NF- κ B. Dans notre modèle cellulaire, NF- κ B semble donc avoir une action anti-apoptotique.

Dans la littérature, il est sous-entendu qu'une importante activité constitutive de NF- κ B prédit une forte radiorésistance des cellules, cependant aucune étude n'a démontré cette relation. La modulation de cette activité sur les lignées KB et KB3, présentant une différence de radiosensibilité, démontre une relation entre l'activité de NF- κ B au moment de l'irradiation et la radiosensibilité des cellules. Ainsi, dans notre modèle cellulaire, plus l'activité de NF- κ B au moment de l'irradiation est élevée, plus les cellules vont résister à la radiothérapie. De plus, l'activité de ce facteur de transcription agit également sur le pourcentage de cellules en apoptose basale *via* une action anti-apoptotique.

L'activité constitutive de NF- κ B est donc impliquée dans le pourcentage d'apoptose basale et dans la radiosensibilité de notre modèle cellulaire. Ces deux paramètres corrèlent de façon significative. Ainsi, le pourcentage de cellules en apoptose avant traitement et l'activité constitutive de NF- κ B pourraient être des paramètres prédictifs de la radiosensibilité.

Il semble donc intéressant de développer des traitements pour inhiber l'activité de NF- κ B en clinique telles que les anti-protéasomes, qui en empêchant la dégradation de I κ B, maintiennent inactif le facteur de transcription NF- κ B.

Le facteur de transcription NF- κ B semble jouer un rôle central dans la radiosensibilité des cellules KB et KB3. NF- κ B peut agir au niveau de différents mécanismes impliqués dans la radiosensibilité tels que l'apoptose ou le phénomène de détoxification, en induisant l'expression de gènes codant pour des enzymes de détoxification (MnSOD (Kiningham *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1999), GST π (Xia *et al.*, 1996)...).

CHAPITRE 7

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons mis en évidence que la chimiorésistance acquise des clones KB3, KB7 et KB8, obtenus après exposition continue au 5FU des cellules KB, est accompagnée d'une augmentation de la radiosensibilité et d'un ralentissement de la prolifération cellulaire.

Pour les lignées cellulaires KB et KB3, de chimio- et radiosensibilité les plus extrêmes, la répartition des cellules dans le cycle cellulaire ainsi que l'apoptose ont été étudiées après exposition au 5FU ou aux radiations ionisantes.

Pour les deux lignées cellulaires, le 5FU induit un arrêt en G_1/S alors qu'une irradiation à 2 Gy entraîne uniquement un arrêt en G_2/M . Les lignées KB et KB3 expriment une protéine P53 sauvage mais sont infectées par le virus du papillome humain de type 18 (HPV-18). Ce virus code pour l'oncoprotéine E6 qui entraîne la dégradation de P53 par le protéasome 26S. Selon l'origine des cellules, E6 peut inhiber, totalement ou partiellement, l'expression et l'induction de la protéine P53. Ainsi, après les deux types de traitements, la cinétique d'expression de la protéine P53 a été étudiée, ainsi que les relations entre cette expression et les blocages dans le cycle chimio- ou radio-induits.

Le 5FU induit l'expression de P53 pour KB et KB3 à partir de 12 et 24 h d'exposition respectivement. Cette induction est en relation avec l'augmentation de l'expression du transcrit de p21. Cependant, l'initiation du blocage en G_1/S (dès 4 h) serait indépendant de l'induction de P53 qui apparaît plus tardivement. Toutefois, P53 pourrait être impliquée dans le maintien ou le renforcement de ce blocage dans le cycle.

Quant à elle, l'irradiation à 2 Gy induit l'expression de P53 pour KB et KB3 à partir de 8 et 12 h après traitement respectivement pour KB et KB3. Cette induction n'entraîne pas de variation d'expression du transcrit p21, mais elle est en relation avec la sortie des cellules du blocage en G_2/M .

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Pour les deux types de traitements, les variations de l'expression de la protéine P53 sont en relation inverse avec les variations de l'expression de l'oncoprotéine E6. Le 5FU et les radiations ionisantes provoquent une diminution de l'expression du transcrit et des protéines virales E6 et E7. Cette dernière n'empêche pas les arrêts dans le cycle cellulaire dans notre modèle cellulaire.

Le 5FU induit le mécanisme d'apoptose pour les deux lignées alors que les radiations ionisantes provoquent ce mécanisme uniquement pour les cellules KB3, qui sont les plus radiosensibles. Après exposition au 5FU, l'apoptose est induite après l'accumulation de la protéine P53, et commence après la mise en place du blocage en G_1/S . Par contre, après irradiation, l'induction de l'apoptose est observée avant l'accumulation de la protéine P53 et n'est pas une conséquence du blocage en G_2/M . La mise en place de l'apoptose est en relation avec la sensibilité des cellules à une exposition au 5FU ou à une irradiation. En effet, la lignée KB qui est la plus chimiosensible, initie l'apoptose avant le clone KB3 après une exposition au 5FU. De façon similaire, la seule lignée à induire l'apoptose après irradiation est le clone KB3, qui est le plus radiosensible.

Pour le même modèle cellulaire, le 5FU et les radiations ionisantes entraînent des mécanismes moléculaires différents aboutissant à une différence de sensibilité des cellules selon le type d'exposition. Après 5FU ou irradiation, une induction de P53 a été observée, mais cette protéine semble être impliquée dans des processus différents. Sachant que selon les sites de phosphorylation de P53, celle-ci peut entraîner différents mécanismes, il serait intéressant d'étudier ces sites de phosphorylations après les deux types d'expositions ainsi que de les comparer entre les lignées de sensibilités différentes.

Nous avons pu mettre en évidence que des lignées HPV-18 positives pouvaient exprimer et induire la protéine P53 et que l'expression de celle-ci est en relation inverse avec l'expression de E6, cependant l'origine de la diminution de l'expression de E6/E7 reste à élucider.

La seconde partie de ce travail fût d'étudier la relation entre l'activité constitutive du facteur de transcription NF- κ B avec la radiosensibilité et le pourcentage de cellules en apoptose spontanée.

Une différence d'activité constitutive de NF- κ B a été observée entre la lignée KB la plus radorésistante et le clone KB3 le plus radiosensible. Cette relation conforte l'hypothèse que plus l'activité constitutive de NF- κ B est importante, plus la lignée cellulaire sera résistante aux radiations ionisantes. Afin de confirmer l'implication de l'activité de NF- κ B sur la

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

radiosensibilité, nous avons fait varier cette activité puis nous avons étudié les conséquences sur la radiosensibilité.

Cette activité a été modulée par exposition des cellules au $\text{TNF}\alpha$ et à la dexaméthasone. La diminution de l'activité de NF- κ B par la dexaméthasone entraîne une augmentation du pourcentage de cellules en apoptose et inversement, l'augmentation de l'activité de NF- κ B par le $\text{TNF}\alpha$ entraîne une diminution de ce pourcentage. Ces résultats démontrent que le facteur de transcription est impliqué dans le pourcentage de cellules en apoptose basale, et que pour notre modèle cellulaire, NF- κ B a une action anti-apoptotique.

Dans les mêmes conditions de modulation de l'activité de NF- κ B, la radiosensibilité des cellules a été évaluée et comparée à celle sans exposition à la dexaméthasone ou au $\text{TNF}\alpha$. Plus l'activité de NF- κ B est élevée au moment de l'irradiation, plus les cellules vont résister au traitement. Ainsi, il semble intéressant de moduler cette activité avant une irradiation afin de sensibiliser les cellules. Cette approche a fait l'objet de plusieurs études *in vitro* et *in vivo* utilisant des antiprotéasomes comme inhibiteurs de NF- κ B. Ces premières études aboutissent à des résultats prometteurs puisque l'inhibition de l'activité de NF- κ B avant radiothérapie peut entraîner une réduction du volume tumoral de plus de 80 % par rapport à une irradiation seule. Le développement de nouveaux modulateurs de NF- κ B spécifiques permettrait d'étendre ces études de radiopotentialisation.

L'explication moléculaire de l'impact de cette activité constitutive de NF- κ B sur la radiosensibilité pourrait également ouvrir une perspective intéressante dans la poursuite de ce travail. La première approche moléculaire à envisager serait d'étudier les mécanismes de détoxification puisque NF- κ B peut réguler l'expression de certaines enzymes impliquées dans ce processus.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aggarwal, B.B.** Apoptosis and nuclear factor-kappaB: a tale of association and dissociation [In Process Citation]. *Biochem Pharmacol* 2000; **60**: 1033-1039.
- Agoff, S.N., Hou, J., Linzer, D.I. and Wu, B.** Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* 1993; **259**: 84-87.
- Almog, N. and Rotter, V.** Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1333**: F1-27.
- Androphy, E.J., Lowy, D.R. and Schiller, J.T.** Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 1987; **325**: 70-73.
- Appella, E. and Anderson, C.W.** Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol Biol (Paris)* 2000; **48**: 227-245.
- Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K. and Mizutani, S.** Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *Embo J* 1999; **18**: 1223-1234.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M.** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; **281**: 1305-1308.
- Attardi, L.D., Reczek, E.E., Cosmas, C., Demicco, E.G., McCurrach, M.E., Lowe, S.W. and Jacks, T.** PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev* 2000; **14**: 704-718.
- Auborn, K.J., Galli, R.L., Dilenzo, T.P. and Steinberg, B.M.** Identification of DNA-protein interactions and enhancer activity at the 5' end of the upstream regulatory region in human papillomavirus type 11. *Virology* 1989; **170**: 123-130.
- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A. and Karin, M.** Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; **270**: 286-290.
- Averbeck, D.** [Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes]. *Cancer Radiother* 2000; **4**: 335-354.
- Baeuerle, P.A. and Henkel, T.** Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 141-179.
- Baldwin, A.S., Jr.** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 649-683.
- Baldwin, A.S., Jr., Azizkhan, J.C., Jensen, D.E., Beg, A.A. and Coodly, L.R.** Induction of NF-kappa B DNA-binding activity during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 4943-4951.

BIBLIOGRAPHIE

- Band, V., De Caprio, J.A., Delmolino, L., Kulesa, V. and Sager, R.** Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol* 1991; **65**: 6671-6676.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. and Ziv, Y.** Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998; **281**: 1674-1677.
- Barak, Y., Gottlieb, E., Juven Gershon, T. and Oren, M.** Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 1994; **8**: 1739-1749.
- Barkett, M. and Gilmore, T.D.** Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**: 6910-6924.
- Barnes, P.J. and Karin, M.** Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1066-1071.
- Bartek, J. and Lukas, J.** Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* 2001; **490**: 117-122.
- Basu, S., Rosenzweig, K.R., Youmell, M. and Price, B.D.** The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF kappa B following DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **247**: 79-83.
- Becuwe, P., Bianchi, A., Keller, J.M. and Dauca, M.** Effects of the peroxisome proliferator clofibric acid on superoxide dismutase expression in the human HepG2 hepatoma cell line. *Biochem Pharmacol* 1999; **58**: 1025-1033.
- Bellas, R.E. and Sonenshein, G.E.** Nuclear factor kappaB cooperates with c-Myc in promoting murine hepatocyte survival in a manner independent of p53 tumor suppressor function. *Cell Growth Differ* 1999; **10**: 287-294.
- Ben-Dori, R., Resnitzki, D. and Kimchi, A.** Reduction in p53 synthesis during differentiation of Friend-erythroleukemia cells. Correlation with the commitment to terminal cell division. *FEBS Lett* 1983; **162**: 384-389.
- Bennett, B.L., Cruz, R., Lacson, R.G. and Manning, A.M.** Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB. *J Biol Chem* 1997; **272**: 10212-10219.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R. and Weissberg, P.** Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis [see comments]. *Science* 1998; **282**: 290-293.
- Benson, J.D. and Howley, P.M.** Amino-terminal domains of the bovine papillomavirus type 1 E1 and E2 proteins participate in complex formation. *J Virol* 1995; **69**: 4364-4372.
- Bentires-Alj, M., Dejardin, E., Viatour, P., Van Lint, C., Froesch, B., Reed, J.C., Merville, M.P. and Bours, V.** Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene* 2001; **20**: 2805-2813.
- Bentires-Alj, M., Hellin, A.C., Ameyar, M., Chouaib, S., Merville, M.P. and Bours, V.** Stable inhibition of nuclear factor kappaB in cancer cells does not increase sensitivity to cytotoxic drugs. *Cancer Res* 1999; **59**: 811-815.
- Beraud, C., Henzel, W.J. and Baeuerle, P.A.** Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 429-434.
- Bernhard, E.J., Muschel, R.J., Bakanauskas, V.J. and McKenna, W.G.** Reducing the radiation-induced G2 delay causes HeLa cells to undergo apoptosis instead of mitotic death. *Int J Radiat Biol* 1996; **69**: 575-584.
- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. and zur Hausen, H.** A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J* 1984; **3**: 1151-1157.

BIBLIOGRAPHIE

- Boulaire, J., Fotedar, A. and Fotedar, R. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol (Paris)* 2000; **48**: 190-202.
- Bours, V., Bentires-Alj, M., Hellin, A., Viatour, P., Robe, P., Delhalle, S., Benoit, V. and Merville, M. Nuclear factor-kappaB, cancer, and apoptosis [In Process Citation]. *Biochem Pharmacol* 2000; **60**: 1085-1089.
- Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K. and Siebenlist, U. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 1993; **72**: 729-739.
- Bubb, V., McCance, D.J. and Schlegel, R. DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology* 1988; **163**: 243-246.
- Buchhop, S., Gibson, M.K., Wang, X.W., Wagner, P., Sturzbecher, H.W. and Harris, C.C. Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 3868-3874.
- Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B.R. and Kley, N. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 1995; **377**: 646-649.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; **282**: 1497-1501.
- Buschmann, T., Potapova, O., Bar-Shira, A., Ivanov, V.N., Fuchs, S.Y., Henderson, S., Fried, V.A., Minamoto, T., Alarcon-Vargas, D., Pincus, M.R., Gaarde, W.A., Holbrook, N.J., Shiloh, Y. and Ronai, Z. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2743-2754.
- Busse, P.M., Bose, S.K., Jones, R.W. and Tolmach, L.J. The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. III. Enhancement of X-ray-induced killing during G2 arrest. *Radiat Res* 1978; **76**: 292-307.
- Butz, K., Whitaker, N., Denk, C., Ullmann, A., Geisen, C. and Hoppe-Seyler, F. Induction of the p53-target gene GADD45 in HPV-positive cancer cells. *Oncogene* 1999; **18**: 2381-2386.
- Caelles, C., Helmberg, A. and Karin, M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes [see comments]. *Nature* 1994; **370**: 220-223.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. and Siliciano, J.D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998; **281**: 1677-1679.
- Carillo, S., Pariat, M., Jariel-Encontre, I., Steff, A.M. and Piechaczyk, M. Le catabolisme protéique intracellulaire. Partie 1 : les mécanismes de dégradation. *Médecine/Sciences* 1995; **11**: 723-734.
- Ceraline, J., Deplanque, G., Duclos, B., Limacher, J.M., Hajri, A., Noel, F., Orvain, C., Frebourg, T., Klein-Soyer, C. and Bergerat, J.P. Inactivation of p53 in normal human cells increases G2/M arrest and sensitivity to DNA-damaging agents. *Int J Cancer* 1998; **75**: 432-438.
- Challberg, M.D. and Kelly, T.J. Animal virus DNA replication. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 671-717.
- Chan, T.A., Hwang, P.M., Hermeking, H., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes Dev* 2000; **14**: 1584-1588.
- Chaturvedi, M.M., Kumar, A., Darnay, B.G., Chainy, G.B., Agarwal, S. and Aggarwal, B.B. Sanguinarine (pseudochelethrythrine) is a potent inhibitor of NF-kappaB

BIBLIOGRAPHIE

- activation, IkappaBalpha phosphorylation, and degradation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30129-30134.
- Chellappan, S., Kraus, V.B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P.M., Phelps, W.C. and Nevins, J.R.** Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 4549-4553.
- Chen, C., Edelstein, L.C. and Gelinas, C.** The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 2687-2695.
- Chen, F.E. and Ghosh, G.** Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 1999; **18**: 6845-6852.
- Chen, Y., Martinez, L.A., LaCava, M., Coghlan, L. and Conti, C.J.** Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression to cyclin D1. *Oncogene* 1998a; **16**: 1913-1920.
- Chen, Y.Q., Ghosh, S. and Ghosh, G.** A novel DNA recognition mode by the NF-kappa B p65 homodimer. *Nat Struct Biol* 1998b; **5**: 67-73.
- Chiang, C.M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T.F., Broker, T.R. and Chow, L.T.** Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 5799-5803.
- Chinami, M., Inoue, M., Masunaga, K., Fukuma, T., Shingu, M. and Toyoda, T.** Nucleic acid binding by zinc finger-like motif of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol Methods* 1996; **59**: 173-176.
- Chinnaiyan, A.M., Tepper, C.G., Seldin, M.F., O'Rourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Dixit, V.M.** FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; **271**: 4961-4965.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**: 156-159.
- Chou, T.C. and Talalay, P. (1987).** Application Of The Median-Effect Principle For The Assessment Of Low Dose Risk Of Carcinogens And For The Quantitation Of Synergism And Antagonism Of Chemotherapeutic Agents. In *New Avenues in developmental Cancer Chemotherapy*, Harrap, K.R. & Connors, T.A. (eds) pp. 37-64. Academic Press: New-York.
- Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H. and Ballard, D.W.** Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 10057-10062.
- Ciccolini, F., Di Pasquale, G., Carlotti, F., Crawford, L. and Tommasino, M.** Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene* 1994; **9**: 2633-2638.
- Clark, P.R., Roberts, M.L. and Cowsert, L.M.** A novel drug screening assay for papillomavirus specific antiviral activity. *Antiviral Res* 1998; **37**: 97-106.
- Cohen, G.M.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; **326**: 1-16.
- Cole, S.T. and Danos, O.** Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol* 1987; **193**: 599-608.
- Coleman, T.A., Kunsch, C., Maher, M., Ruben, S.M. and Rosen, C.A.** Acquisition of NFkB1-selective DNA binding by substitution of four amino acid residues from NFkB1 into RelA. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 3850-3859.
- Coleman, T.R. and Dunphy, W.G.** Cdc2 regulatory factors. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 877-882.

BIBLIOGRAPHIE

- Cripe, T.P., Alderborn, A., Anderson, R.D., Parkkinen, S., Bergman, P., Haugen, T.H., Pettersson, U. and Turek, L.P. Transcriptional activation of the human papillomavirus-16 P97 promoter by an 88-nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP-1-responsive modules. *New Biol* 1990; **2**: 450-463.
- Crook, T., Tidy, J.A. and Vousden, K.H. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 1991; **67**: 547-556.
- Cusack, J.C., Jr., Liu, R. and Baldwin, A.S., Jr. Inducible chemoresistance to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (CPT-11) in colorectal cancer cells and a xenograft model is overcome by inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res* 2000; **60**: 2323-2330.
- Cusack, J.C., Jr., Liu, R., Houston, M., Abendroth, K., Elliott, P.J., Adams, J. and Baldwin, A.S., Jr. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res* 2001; **61**: 3535-3540.
- Davies, R., Hicks, R., Crook, T., Morris, J. and Vousden, K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 1993; **67**: 2521-2528.
- Day, P.M., Roden, R.B., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 1998; **72**: 142-150.
- Dean, P.N. and Jett, J.H. Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. *J Cell Biol* 1974; **60**: 523-527.
- Del Vecchio, A.M., Romanczuk, H., Howley, P.M. and Baker, C.C. Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol* 1992; **66**: 5949-5958.
- Desaintes, C. and Demeret, C. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol* 1996; **7**: 339-347.
- Desaintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M. and Thierry, F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *Embo J* 1997; **16**: 504-514.
- DeWeese, T.L., Walsh, J.C., Dillehay, L.E., Kessis, T.D., Hedrick, L., Cho, K.R. and Nelson, W.G. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins alter cell cycle progression but not radiosensitivity of carcinoma cells treated with low-dose-rate radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; **37**: 145-154.
- Ding, H.F., Lin, Y.L., McGill, G., Juo, P., Zhu, H., Blenis, J., Yuan, J. and Fisher, D.E. Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J Biol Chem* 2000; **275**: 38905-38911.
- Dong, G., Broker, T.R. and Chow, L.T. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* 1994; **68**: 1115-1127.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. and Crawford, L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991; **352**: 824-827.
- Dostatni, N., Thierry, F. and Yaniv, M. A dimer of BPV-1 E2 containing a protease resistant core interacts with its DNA target. *Embo J* 1988; **7**: 3807-3816.
- Dotto, G.P. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 2000; **1471**: M43-56.
- Drapkin, R., Reardon, J.T., Ansari, A., Huang, J.C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A. and Reinberg, D. Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 1994; **368**: 769-772.

BIBLIOGRAPHIE

- Duffey, D.C., Chen, Z., Dong, G., Ondrey, F.G., Wolf, J.S., Brown, K., Siebenlist, U. and Van Waes, C. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaBalpha of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 1999; **59**: 3468-3474.
- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Reed, S.I. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 1994; **76**: 1013-1023.
- Dutta, A., Ruppert, J.M., Aster, J.C. and Winchester, E. Inhibition of DNA replication factor RPA by p53 [see comments]. *Nature* 1993; **365**: 79-82.
- Dyson, N., Guida, P., Munger, K. and Harlow, E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* 1992; **66**: 6893-6902.
- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K. and Harlow, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; **243**: 934-937.
- el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y. and et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; **54**: 1169-1174.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; **75**: 817-825.
- Epinat, J.C. and Gilmore, T.D. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene* 1999; **18**: 6896-6909.
- Evan, G. and Littlewood, T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; **281**: 1317-1322.
- Favaudon, V. [Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. *Cancer Radiother* 2000; **4**: 355-368.
- Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F.B., Pan, Z.Q., Harper, J.W., Elledge, S.J., O'Donnell, M. and Hurwitz, J. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 8655-8659.
- Frantz, B., Nordby, E.C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C.V., Kincaid, R.L., Tocci, M.J., O'Keefe, S.J. and O'Neill, E.A. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. *Embo J* 1994; **13**: 861-870.
- Frantz, B. and O'Neill, E.A. The effect of sodium salicylate and aspirin on NF-kappa B. *Science* 1995; **270**: 2017-2019.
- Franzoso, G., Bours, V., Azarenko, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kanno, T., Brown, K. and Siebenlist, U. The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites. *Embo J* 1993; **12**: 3893-3901.
- Franzoso, G., Bours, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kelly, K. and Siebenlist, U. The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature* 1992; **359**: 339-342.
- Freedman, D.A. and Levine, A.J. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 7288-7293.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N. and Ronai, Z. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev* 1998a; **12**: 2658-2663.

BIBLIOGRAPHIE

- Fuchs, S.Y., Adler, V., Pincus, M.R. and Ronai, Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998b; **95**: 10541-10546.
- Gao, C. and Tsuchida, N. Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn J Cancer Res* 1999; **90**: 180-187.
- Gerritsen, M.E., Williams, A.J., Neish, A.S., Moore, S., Shi, Y. and Collins, T. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 2927-2932.
- Ghosh, G., van Duyne, G., Ghosh, S. and Sigler, P.B. Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* 1995; **373**: 303-310.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 225-260.
- Giaccia, A.J. and Kastan, M.B. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998; **12**: 2973-2983.
- Gilmore, T.D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 1999; **18**: 6842-6844.
- Giri, D.K. and Aggarwal, B.B. Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 1998; **273**: 14008-14014.
- Giri, I. and Yaniv, M. Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *Embo J* 1988a; **7**: 2823-2829.
- Giri, I. and Yaniv, M. Study of the E2 gene product of the cottontail rabbit papillomavirus reveals a common mechanism of transactivation among papillomaviruses. *J Virol* 1988b; **62**: 1573-1581.
- Goldstein, D.J., Andresson, T., Sparkowski, J.J. and Schlegel, R. The BPV-1 E5 protein, the 16 kDa membrane pore-forming protein and the PDGF receptor exist in a complex that is dependent on hydrophobic transmembrane interactions. *Embo J* 1992; **11**: 4851-4859.
- Goodhead, D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* 1994; **65**: 7-17.
- Gottlieb, E., Haffner, R., King, A., Asher, G., Gruss, P., Lonai, P. and Oren, M. Transgenic mouse model for studying the transcriptional activity of the p53 protein: age- and tissue-dependent changes in radiation-induced activation during embryogenesis. *Embo J* 1997; **16**: 1381-1390.
- Gottlieb, E. and Oren, M. p53 facilitates pRb cleavage in IL-3-deprived cells: novel pro-apoptotic activity of p53. *Embo J* 1998; **17**: 3587-3596.
- Goulian, M., Bleile, B.M., Dickey, L.M., Grafstrom, R.H., Ingraham, H.A., Neynaber, S.A., Peterson, M.S. and Tseng, B.Y. Mechanism of thymineless death. *Adv Exp Med Biol* 1986; **195 Pt B**: 89-95.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. and Harris, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; **54**: 4855-4878.
- Grem, J.L. (1990). Fluorinated Pyrimidines. In *Cancer chemotherapy: Principles and Practice*, Chabner, B.A. & Collins, J.M. (eds) pp. 189-190. Lippincott, J.B.: Philadelphia.
- Grossman, S.R. and Laimins, L.A. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene* 1989; **4**: 1089-1093.

BIBLIOGRAPHIE

- Grumont, R.J., Rourke, I.J. and Gerondakis, S. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999; **13**: 400-411.
- Gu, J., Nie, L., Wiederschain, D. and Yuan, Z.M. Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 8533-8546.
- Guillouf, C., Rosselli, F., Krishnaraju, K., Moustacchi, E., Hoffman, B. and Liebermann, D.A. p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 1995; **10**: 2263-2270.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G. and Baldwin, A.S., Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 5785-5799.
- Hainaut, P. and Hollstein, M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000; **77**: 81-137.
- Ham, J., Dostatni, N., Gauthier, J.M. and Yaniv, M. The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *Trends Biochem Sci* 1991; **16**: 440-444.
- Hartwell, L.H. and Kastan, M.B. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; **266**: 1821-1828.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; **387**: 296-299.
- Hawkins, D.S., Demers, G.W. and Galloway, D.A. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 1996; **56**: 892-898.
- He, Z., Henricksen, L.A., Wold, M.S. and Ingles, C.J. RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature* 1995; **374**: 566-569.
- Hermann, D.M., Kuroiwa, T., Hata, R., Gillardon, F., Ito, U. and Mies, G. Expression of redox factor-1, p53-activated gene 608 and caspase-3 messenger RNAs following repeated unilateral common carotid artery occlusion in gerbils--relationship to delayed cell injury and secondary failure of energy state. *Neuroscience* 2001; **102**: 779-787.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997; **1**: 3-11.
- Hickman, E.S., Bates, S. and Vousden, K.H. Perturbation of the p53 response by human papillomavirus type 16 E7. *J Virol* 1997; **71**: 3710-3718.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C. and Strauss, M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2690-2698.
- Hollander, M.C., Sheikh, M.S., Bulavin, D.V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T.A., Kim, K.E., Tolosa, E., Ashwell, J.D., Rosenberg, M.P., Zhan, Q., Fernandez-Salguero, P.M., Morgan, W.F., Deng, C.X. and Fornace, A.J., Jr. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet* 1999; **23**: 176-184.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; **253**: 49-53.
- Holmes, M.M., Weaver, S.H., 2nd and Vermillion, S.T. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of 5-fluorouracil for the treatment of cervicovaginal human papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999; **7**: 186-189.
- Hottiger, M.O., Felzien, L.K. and Nabel, G.J. Modulation of cytokine-induced HIV gene expression by competitive binding of transcription factors to the coactivator p300. *Embo J* 1998; **17**: 3124-3134.

BIBLIOGRAPHIE

- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. and Goeddel, D.V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; **84**: 299-308.
- Huang, H., Li, C.Y. and Little, J.B. Abrogation of P53 function by transfection of HPV16 E6 gene does not enhance resistance of human tumour cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1996; **70**: 151-160.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M. and Howley, P.M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* 1991; **10**: 4129-4135.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M. and Howley, P.M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 4918-4927.
- Huschtscha, L.I., Bartier, W.A., Ross, C.E. and Tattersall, M.H. Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs in vitro. *Br J Cancer* 1996; **73**: 54-60.
- Huxford, T., Huang, D.B., Malek, S. and Ghosh, G. The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* 1998; **95**: 759-770.
- Iliakis, G. Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin Oncol* 1997; **24**: 602-615.
- Imbert, V., Rupec, R.A., Livolsi, A., Pahl, H.L., Traenckner, E.B., Mueller-Dieckmann, C., Farahifar, D., Rossi, B., Auberger, P., Baeuerle, P.A. and Peyron, J.F. Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell* 1996; **86**: 787-798.
- Ip, Y.T. and Davis, R.J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**: 205-219.
- Israeli, D., Tessler, E., Haupt, Y., Elkeles, A., Wilder, S., Amson, R., Telerman, A. and Oren, M. A novel p53-inducible gene, PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis. *Embo J* 1997; **16**: 4384-4392.
- Jaattela, M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor-alpha/cachectin. *Lab Invest* 1991; **64**: 724-742.
- Jackson, S. and Storey, A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000; **19**: 592-598.
- Jacobs, M.D. and Harrison, S.C. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 1998; **95**: 749-758.
- Janknecht, R. and Hunter, T. Versatile molecular glue. Transcriptional control. *Curr Biol* 1996; **6**: 951-954.
- Javelaud, D., Wietzerbin, J., Delattre, O. and Besancon, F. Induction of p21Waf1/Cip1 by TNFalpha requires NF-kappaB activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene* 2000; **19**: 61-68.
- Jewers, R.J., Hildebrandt, P., Ludlow, J.W., Kell, B. and McCance, D.J. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol* 1992; **66**: 1329-1335.
- Jin, S., Inoue, S. and Weaver, D.T. Functions of the DNA dependent protein kinase. *Cancer Surv* 1997; **29**: 221-261.
- Johannes, F.J., Horn, J., Link, G., Haas, E., Siemienski, K., Wajant, H. and Pfizenmaier, K. Protein kinase Cmu downregulation of tumor-necrosis-factor-induced apoptosis correlates with enhanced expression of nuclear-factor-kappaB-dependent protective genes. *Eur J Biochem* 1998; **257**: 47-54.

- Johnson, P., Chung, S. and Benchimol, S.** Growth suppression of Friend virus-transformed erythroleukemia cells by p53 protein is accompanied by hemoglobin production and is sensitive to erythropoietin. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 1456-1463.
- Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., Klein, J.U., Lee, R.J., Segall, J.E., Westwick, J.K., Der, C.J. and Pestell, R.G.** Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 25245-25249.
- Ju, J., Pedersen-Lane, J., Maley, F. and Chu, E.** Regulation of p53 expression by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 3769-3774.
- Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D.L. and Oren, M.** Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene* 1993; **8**: 3411-3416.
- Kagan, V.E., Fabisiak, J.P., Shvedova, A.A., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Schor, N.F. and Kawai, K.** Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett* 2000; **477**: 1-7.
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Hofmann, T.G., Hehner, S.P., Droge, W. and Schmitz, M.L.** The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* 2000; **267**: 3828-3835.
- Kanda, T., Watanabe, S., Zanma, S., Sato, H., Furuno, A. and Yoshiike, K.** Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif. *Virology* 1991; **185**: 536-543.
- Karin, M.** How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999; **18**: 6867-6874.
- Kasibhatla, S., Genestier, L. and Green, D.R.** Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 1999; **274**: 987-992.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R.W.** Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; **51**: 6304-6311.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. and Fornace, A.J., Jr.** A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992; **71**: 587-597.
- Kasten, M.M. and Giordano, A.** pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 132-140.
- Kato, T., Duffey, D.C., Ondrey, F.G., Dong, G., Chen, Z., Cook, J.A., Mitchell, J.B. and Van Waes, C.** Cisplatin and radiation sensitivity in human head and neck squamous carcinomas are independently modulated by glutathione and transcription factor NF-kappaB. *Head Neck* 2000; **22**: 748-759.
- Kawai, H., Nie, L., Wiederschain, D. and Yuan, Z.M.** Dual role of p300 in the regulation of p53 stability. *J Biol Chem* 2001; **276**: 45928-45932.
- Kelland, L.R. and Tonkin, K.S.** In vitro chemosensitivity of four new carcinoma of the cervix cell lines: relationship to radiosensitivity. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; **25**: 1211-1218.
- Kerr, L.D., Ransone, L.J., Wamsley, P., Schmitt, M.J., Boyer, T.G., Zhou, Q., Berk, A.J. and Verma, I.M.** Association between proto-oncoprotein Rel and TATA-binding protein mediates transcriptional activation by NF-kappa B. *Nature* 1993; **365**: 412-419.

BIBLIOGRAPHIE

- Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y. and Shkedy, D. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 14973-14977.
- Kiningham, K.K., Xu, Y., Daosukho, C., Popova, B. and St Clair, D.K. Nuclear factor kappaB-dependent mechanisms coordinate the synergistic effect of PMA and cytokines on the induction of superoxide dismutase 2. *Biochem J* 2001; **353**: 147-156.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 12180-12184.
- Kishi, H., Nakagawa, K., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Taya, Y. and Yamaizumi, M. Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J Biol Chem* 2001; **276**: 39115-39122.
- Kopp, E. and Ghosh, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; **265**: 956-959.
- Koshiji, M., Adachi, Y., Taketani, S., Takeuchi, K., Hioki, K. and Ikehara, S. Mechanisms underlying apoptosis induced by combination of 5-fluorouracil and interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**: 376-381.
- Kovacs, A., Weber, M.L., Burns, L.J., Jacob, H.S. and Vercellotti, G.M. Cytoplasmic sequestration of p53 in cytomegalovirus-infected human endothelial cells. *Am J Pathol* 1996; **149**: 1531-1539.
- Krikos, A., Laherty, C.D. and Dixit, V.M. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 1992; **267**: 17971-17976.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. and Vousden, K.H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997; **387**: 299-303.
- Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V. and Kastan, M.B. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 7491-7495.
- Kurland, J.F., Kodym, R., Story, M.D., Spurgers, K.B., McDonnell, T.J. and Meyn, R.E. NF-kappa B1 (p50) Homodimers Contribute to Transcription of the bcl-2 Oncogene. *J Biol Chem* 2001; **276**: 45380-45386.
- Kushner, D.B. and Ricciardi, R.P. Reduced phosphorylation of p50 is responsible for diminished NF-kappaB binding to the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2169-2179.
- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J. and Pavletich, N.P. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain [comment]. *Science* 1996; **274**: 948-953.
- Lane, D.P. and Crawford, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; **278**: 261-263.
- Le Page, C., Sanceau, J., Drapier, J.C. and Wietzerbin, J. Inhibitors of ADP-ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **243**: 451-457.
- Leach, S.D., Scatena, C.D., Keefer, C.J., Goodman, H.A., Song, S.Y., Yang, L. and Pietenpol, J.A. Negative regulation of Wee1 expression and Cdc2 phosphorylation during p53-mediated growth arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1998; **58**: 3231-3236.
- Lechner, M.S. and Laimins, L.A. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 1994; **68**: 4262-4273.

BIBLIOGRAPHIE

- Lechner, M.S., Mack, D.H., Finicle, A.B., Crook, T., Vousden, K.H. and Laimins, L.A. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *Embo J* 1992; **11**: 3045-3052.
- Lee, H.H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. and Cheng, G. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999a; **96**: 9136-9141.
- Lee, J.M. and Bernstein, A. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 5742-5746.
- Lee, K.Y., Chang, W., Qiu, D., Kao, P.N. and Rosen, G.D. PG490 (triptolide) cooperates with tumor necrosis factor-alpha to induce apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem* 1999b; **274**: 13451-13455.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. and Griffith, J. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 1995; **81**: 1013-1020.
- Leechanachai, P., Banks, L., Moreau, F. and Matlashewski, G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* 1992; **7**: 19-25.
- Lees-Miller, S.P., Sakaguchi, K., Ullrich, S.J., Appella, E. and Anderson, C.W. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 5041-5049.
- Lenardo, M. and Siebenlist, U. Bcl-3-mediated nuclear regulation of the NF-kappa B transactivating factor. *Immunol Today* 1994; **15**: 145-147.
- Levine, E.L., Renehan, A., Gossiel, R., Davidson, S.E., Roberts, S.A., Chadwick, C., Wilks, D.P., Potten, C.S., Hendry, J.H., Hunter, R.D. and et al. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 1995; **37**: 1-9.
- Lezoualc'h, F., Sagara, Y., Holsboer, F. and Behl, C. High constitutive NF-kappaB activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells. *J Neurosci* 1998; **18**: 3224-3232.
- Li, C.C., Dai, R.M., Chen, E. and Longo, D.L. Phosphorylation of NF-KB1-p50 is involved in NF-kappa B activation and stable DNA binding. *J Biol Chem* 1994a; **269**: 30089-30092.
- Li, C.C., Korner, M., Ferris, D.K., Chen, E., Dai, R.M. and Longo, D.L. NF-kappa B/Rel family members are physically associated phosphoproteins. *Biochem J* 1994b; **303**: 499-506.
- Li, J.J., Oberley, L.W., Fan, M. and Colburn, N.H. Inhibition of AP-1 and NF-kappaB by manganese-containing superoxide dismutase in human breast cancer cells. *Faseb J* 1998; **12**: 1713-1723.
- Li, N. and Karin, M. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 13012-13017.
- Li, N. and Karin, M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *Faseb J* 1999; **13**: 1137-1143.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; **91**: 479-489.
- Li, X. and Coffino, P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol* 1996; **70**: 4509-4516.

BIBLIOGRAPHIE

- Liang, S.H. and Clarke, M.F. A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 1999; **274**: 32699-32703.
- Lin, Y., Ma, W. and Benchimol, S. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet* 2000; **26**: 122-127.
- Lin, Y.Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R. and Hawiger, J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1995; **270**: 14255-14258.
- Linzer, D.I. and Levine, A.J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; **17**: 43-52.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A. and Elledge, S.J. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 2000a; **14**: 1448-1459.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; **86**: 147-157.
- Liu, Y., McKalip, A. and Herman, B. Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation. *J Cell Biochem* 2000b; **78**: 334-349.
- Lohrum, M.A., Woods, D.B., Ludwig, R.L., Balint, E. and Vousden, K.H. C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 8521-8532.
- Lonn, U. and Lonn, S. Interaction between 5-fluorouracil and DNA of human colon adenocarcinoma. *Cancer Res* 1984; **44**: 3414-3418.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.R. and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; **193**: 265-275.
- Lu, H. and Levine, A.J. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 5154-5158.
- Lu, J.Z., Sun, Y.N., Rose, R.C., Bonnez, W. and McCance, D.J. Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J Virol* 1993; **67**: 7131-7139.
- Maity, A., McKenna, W.G. and Muschel, R.J. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother Oncol* 1994; **31**: 1-13.
- Maki, C.G., Huibregtse, J.M. and Howley, P.M. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res* 1996; **56**: 2649-2654.
- Mariotta, M., Perewusnyk, G., Koechli, O.R., Little, J.B., von Knebel Doeberitz, M., Mirimanoff, R.O. and Rutz, H.P. Dexamethasone-induced enhancement of resistance to ionizing radiation and chemotherapeutic agents in human tumor cells. *Strahlenther Onkol* 1999; **175**: 392-396.
- Massimi, P. and Banks, L. Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 proteins. *Virology* 1997; **227**: 255-259.
- Massimi, P., Pim, D., Bertoli, C., Bouvard, V. and Banks, L. Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* 1999; **18**: 7748-7754.
- Matlashewski, G., Banks, L., Pim, D. and Crawford, L. Analysis of human p53 proteins and mRNA levels in normal and transformed cells. *Eur J Biochem* 1986; **154**: 665-672.

BIBLIOGRAPHIE

- Matsui, K., Fine, A., Zhu, B., Marshak-Rothstein, A. and Ju, S.T.** Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J Immunol* 1998; **161**: 3469-3473.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. and Elledge, S.J.** Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 10389-10394.
- Mayo, L.D., Turchi, J.J. and Berberich, S.J.** Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res* 1997; **57**: 5013-5016.
- McBride, A.A., Byrne, J.C. and Howley, P.M.** E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 510-514.
- McBride, A.A., Romanczuk, H. and Howley, P.M.** The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 1991; **266**: 18411-18414.
- McGlennen, R.C.** Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med* 2000; **20**: 383-406.
- McIlwrath, A.J., Vasey, P.A., Ross, G.M. and Brown, R.** Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res* 1994; **54**: 3718-3722.
- McIntyre, M.C., Frattini, M.G., Grossman, S.R. and Laimins, L.A.** Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol* 1993; **67**: 3142-3150.
- McIntyre, M.C., Ruesch, M.N. and Laimins, L.A.** Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* 1996; **215**: 73-82.
- McKay, L.I. and Cidlowski, J.A.** Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999; **20**: 435-459.
- McKenna, W.G., Iliakis, G., Weiss, M.C., Bernhard, E.J. and Muschel, R.J.** Increased G2 delay in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and v-myc. *Radiat Res* 1991; **125**: 283-287.
- Meek, D.W.** Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal* 1998; **10**: 159-166.
- Mercer, W.E.** Checking on the cell cycle. *J Cell Biochem Suppl* 1998; **30-31**: 50-54.
- Merika, M., Williams, A.J., Chen, G., Collins, T. and Thanos, D.** Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* 1998; **1**: 277-287.
- Meyer, A.N., Xu, Y.F., Webster, M.K., Smith, A.E. and Donoghue, D.J.** Cellular transformation by a transmembrane peptide: structural requirements for the bovine papillomavirus E5 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 4634-4638.
- Meyer, S., Kohler, N.G. and Joly, A.** Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 1997; **413**: 354-358.
- Mirjolet, J.F.** Role de la Thymidylate Synthase et de P53 dans la résistance cellulaire au 5-Fluorouracile. *Thèse de l'Université Henri Poincaré - Nancy I* 2000.
- Mirjolet, J.F., Barberi Heyob, M., Didelot, C., Peyrat, J.P., Abecassis, J., Millon, R. and Merlin, J.L.** Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *Br J Cancer* 2000; **83**: 1380-1386.
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M. and Reed, J.C.** Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994a; **54**: 3131-3135.

BIBLIOGRAPHIE

- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. and Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994b; **9**: 1799-1805.
- Mora, P.T., Chandrasekaran, K. and McFarland, V.W. An embryo protein induced by SV40 virus transformation of mouse cells. *Nature* 1980; **288**: 722-724.
- Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F. and Deppert, W. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *Embo J* 1995; **14**: 4442-4449.
- Muller, C.W. and Harrison, S.C. The structure of the NF-kappa B p50:DNA-complex: a starting point for analyzing the Rel family. *FEBS Lett* 1995; **369**: 113-117.
- Muller, C.W., Rey, F.A., Sodeoka, M., Verdine, G.L. and Harrison, S.C. Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 1995; **373**: 311-317.
- 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. and Dixit, V.M. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; **85**: 817-827.
- Nagata, S. and Golstein, P. The Fas death factor. *Science* 1995; **267**: 1449-1456.
- Nakai, M., Qin, Z.H., Chen, J.F., Wang, Y. and Chase, T.N. Kainic acid-induced apoptosis in rat striatum is associated with nuclear factor-kappaB activation. *J Neurochem* 2000; **74**: 647-658.
- Natarajan, K., Singh, S., Burke, T.R., Jr., Grunberger, D. and Aggarwal, B.B. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 9090-9095.
- Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y. and Inohara, N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; **17**: 3237-3245.
- O'Connor, M.J. Targeting of transcriptional cofactors by the HPV E6 protein: another tale of David and Goliath. *Trends Microbiol* 2000; **8**: 45-47.
- Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U. and Stahl, H. p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *Embo J* 1993; **12**: 2389-2396.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000a; **288**: 1053-1058.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. and Taya, Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 2000b; **102**: 849-862.
- Offer, H., Wolkowicz, R., Matas, D., Blumenstein, S., Livneh, Z. and Rotter, V. Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett* 1999; **450**: 197-204.
- Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H., Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N. and Taniguchi, T. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 22627-22630.
- Ohmori, Y., Schreiber, R.D. and Hamilton, T.A. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 1997; **272**: 14899-14907.
- Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., Kruzel, E. and et al. Wild-type human

BIBLIOGRAPHIE

- p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 3032-3040.
- Oyama, T., Ran, S., Ishida, T., Nadaf, S., Kerr, L., Carbone, D.P. and Gabrilovich, D.I. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1998; **160**: 1224-1232.
- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M. and Donner, D.B. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; **401**: 82-85.
- Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**: 6853-6866.
- Pahl, H.L., Krauss, B., Schulze-Osthoff, K., Decker, T., Traenckner, E.B., Vogt, M., Myers, C., Parks, T., Warring, P., Muhlbacher, A., Czernilofsky, A.P. and Baeuerle, P.A. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *J Exp Med* 1996; **183**: 1829-1840.
- Pajonk, F. and McBride, W.H. Ionizing radiation affects 26S proteasome function and associated molecular responses, even at low doses. *Radiother Oncol* 2001; **59**: 203-212.
- Pajonk, F., Pajonk, K. and McBride, W.H. Inhibition of NF-kappaB, clonogenicity, and radiosensitivity of human cancer cells [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 1956-1960.
- Pajonk, F., Pajonk, K. and McBride, W.H. Apoptosis and radiosensitization of hodgkin cells by proteasome inhibition [see comments]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; **47**: 1025-1032.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. and Maniatis, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994; **78**: 773-785.
- Parker, L.L., Atherton-Fessler, S., Lee, M.S., Ogg, S., Falk, J.L., Swenson, K.I. and Piwnicka-Worms, H. Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner. *Embo J* 1991; **10**: 1255-1263.
- Parker, W.B. and Cheng, Y.C. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther* 1990; **48**: 381-395.
- Patel, D., Huang, S.M., Baglia, L.A. and McCance, D.J. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *Embo J* 1999; **18**: 5061-5072.
- Petti, L.M., Reddy, V., Smith, S.O. and DiMaio, D. Identification of amino acids in the transmembrane and juxtamembrane domains of the platelet-derived growth factor receptor required for productive interaction with the bovine papillomavirus E5 protein. *J Virol* 1997; **71**: 7318-7327.
- Piazza, G.A., Rahm, A.K., Finn, T.S., Fryer, B.H., Li, H., Stoumen, A.L., Pamukcu, R. and Ahnen, D.J. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res* 1997; **57**: 2452-2459.
- Pickard, M., Dive, C. and Kinsella, A.R. Differences in resistance to 5-fluorouracil as a function of cell cycle delay and not apoptosis. *Br J Cancer* 1995; **72**: 1389-1396.
- Pierce, J.W., Schoenleber, R., Jesmok, G., Best, J., Moore, S.A., Collins, T. and Gerritsen, M.E. Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 1997; **272**: 21096-21103.

BIBLIOGRAPHIE

- Pim, D., Collins, M. and Banks, L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 1992; **7**: 27-32.
- Pim, D., Massimi, P. and Banks, L. Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene* 1997; **15**: 257-264.
- Pim, D., Storey, A., Thomas, M., Massimi, P. and Banks, L. Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene* 1994; **9**: 1869-1876.
- Pines, J. The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol* 1994; **5**: 305-313.
- Pise-Masison, C.A., Radonovich, M., Sakaguchi, K., Appella, E. and Brady, J.N. Phosphorylation of p53: a novel pathway for p53 inactivation in human T-cell lymphotropic virus type 1-transformed cells. *J Virol* 1998; **72**: 6348-6355.
- Pluquet, O. and Hainaut, P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett* 2001; **174**: 1-15.
- Powell, S.N., DeFrank, J.S., Connell, P., Eogan, M., Preffer, F., Dombkowski, D., Tang, W. and Friend, S. Differential sensitivity of p53(-) and p53(+) cells to caffeine-induced radiosensitization and override of G2 delay. *Cancer Res* 1995; **55**: 1643-1648.
- Prives, C. and Hall, P.A. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; **187**: 112-126.
- Ravi, R., Bedi, A. and Fuchs, E.J. CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB. *Cancer Res* 1998a; **58**: 882-886.
- Ravi, R., Mookerjee, B., van Hensbergen, Y., Bedi, G.C., Giordano, A., El-Deiry, W.S., Fuchs, E.J. and Bedi, A. p53-mediated repression of nuclear factor-kappaB RelA via the transcriptional integrator p300. *Cancer Res* 1998b; **58**: 4531-4536.
- Reed, J.C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; **17**: 3225-3236.
- Reisman, D., Elkind, N.B., Roy, B., Beamon, J. and Rotter, V. c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ* 1993; **4**: 57-65.
- Remm, M., Brain, R. and Jenkins, J.R. The E2 binding sites determine the efficiency of replication for the origin of human papillomavirus type 18. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 6015-6021.
- Richon, V.M., Ramsay, R.G., Rifkind, R.A. and Marks, P.A. Modulation of the c-myc, c-myc and p53 mRNA and protein levels during induced murine erythroleukemia cell differentiation. *Oncogene* 1989; **4**: 165-173.
- Roberts, S., Ashmole, I., Rookes, S.M. and Gallimore, P.H. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol* 1997; **71**: 3554-3562.
- Rodriguez, M.S., Thompson, J., Hay, R.T. and Dargemont, C. Nuclear retention of IkappaBalpha protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 9108-9115.
- Romashkova, J.A. and Makarov, S.S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999; **401**: 86-90.
- Ruppert, J.M. and Stillman, B. Analysis of a protein-binding domain of p53. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 3811-3820.
- Russell, K.J., Wiens, L.W., Demers, G.W., Galloway, D.A., Plon, S.E. and Groudine, M. Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 1639-1642.

- Russell, P. and Nurse, P.** Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 1987; **49**: 559-567.
- Russo, S.M., Tepper, J.E., Baldwin, A.S., Jr., Liu, R., Adams, J., Elliott, P. and Cusack, J.C., Jr.** Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; **50**: 183-193.
- Sailer, B.L., Barrasso, A.M., Valdez, J.G., Cobo, J.M., D'Anna, J.A. and Crissman, H.A.** Reduction in the radiation-induced late S phase and G2 blocks in HL-60 cell populations by amiloride, an efficient inhibitor of the Na⁺/H⁺ transporter. *Cancer Res* 1998; **58**: 413-420.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. and Appella, E.** DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 1998; **12**: 2831-2841.
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M.** Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; **91**: 443-446.
- Santin, A.D., Hermonat, P.L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Pecorelli, S. and Parham, G.P.** Radiation-enhanced expression of E6/E7 transforming oncogenes of human papillomavirus-16 in human cervical carcinoma. *Cancer* 1998; **83**: 2346-2352.
- Sarnow, P., Ho, Y.S., Williams, J. and Levine, A.J.** Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; **28**: 387-394.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. and Howley, P.M.** The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; **75**: 495-505.
- Scheffner, M., Takahashi, T., Huibregtse, J.M., Minna, J.D. and Howley, P.M.** Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. *J Virol* 1992; **66**: 5100-5105.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M.** The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; **63**: 1129-1136.
- Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K. and Baldwin, A.S., Jr.** Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; **270**: 283-286.
- Schmid, P., Lorenz, A., Hameister, H. and Montenarh, M.** Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development* 1991; **113**: 857-865.
- Schmidt, K.N., Amstad, P., Cerutti, P. and Baeuerle, P.A.** The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol* 1995; **2**: 13-22.
- Schmitt, A., Harry, J.B., Rapp, B., Wettstein, F.O. and Iftner, T.** Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J Virol* 1994; **68**: 7051-7059.
- Schmitz, M.L., Stelzer, G., Altmann, H., Meisterernst, M. and Baeuerle, P.A.** Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NF-kappa B with TATA-binding protein, transcription factor IIB, and coactivators. *J Biol Chem* 1995; **270**: 7219-7226.
- Schneider-Gadicke, A., Kaul, S., Schwarz, E., Gausepohl, H., Frank, R. and Bastert, G.** Identification of the human papillomavirus type 18 E6 and E6 proteins in nuclear protein fractions from human cervical carcinoma cells grown in the nude mouse or in vitro. *Cancer Res* 1988; **48**: 2969-2974.

BIBLIOGRAPHIE

- Scholl, F.A., McLoughlin, P., Ehler, E., de Giovanni, C. and Schafer, B.W. DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis. *J Cell Biol* 2000; **151**: 495-506.
- Schreck, R., Albermann, K. and Baeuerle, P.A. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 1992; **17**: 221-237.
- Schreck, R., Rieber, P. and Baeuerle, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 1991; **10**: 2247-2258.
- Schwartz, D., Almog, N., Peled, A., Goldfinger, N. and Rotter, V. Role of wild type p53 in the G2 phase: regulation of the gamma- irradiation-induced delay and DNA repair. *Oncogene* 1997; **15**: 2597-2607.
- Schwartz, D., Goldfinger, N. and Rotter, V. Expression of p53 protein in spermatogenesis is confined to the tetraploid pachytene primary spermatocytes. *Oncogene* 1993; **8**: 1487-1494.
- Sedman, J. and Stenlund, A. Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *Embo J* 1995; **14**: 6218-6228.
- Sedman, J. and Stenlund, A. The initiator protein E1 binds to the bovine papillomavirus origin of replication as a trimeric ring-like structure. *Embo J* 1996; **15**: 5085-5092.
- Seewaldt, V.L., Mrozek, K., Dietze, E.C., Parker, M. and Caldwell, L.E. Human papillomavirus type 16 E6 inactivation of p53 in normal human mammary epithelial cells promotes tamoxifen-mediated apoptosis. *Cancer Res* 2001; **61**: 616-624.
- Selvakumaran, M., Lin, H.K., Miyashita, T., Wang, H.G., Krajewski, S., Reed, J.C., Hoffman, B. and Liebermann, D. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 1994; **9**: 1791-1798.
- Sen, C.K., Roy, S. and Packer, L. Involvement of intracellular Ca²⁺ in oxidant-induced NF-kappa B activation. *FEBS Lett* 1996; **385**: 58-62.
- Sen, R. and Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; **46**: 705-716.
- Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G.P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A.J. and Shenk, T. Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 12028-12032.
- Shally, M., Alloul, N., Jackman, A., Muller, M., Gissmann, L. and Sherman, L. The E6 variant proteins E6I-E6IV of human papillomavirus 16: expression in cell free systems and bacteria and study of their interaction with p53. *Virus Res* 1996; **42**: 81-96.
- Shao, R., Tsai, E.M., Wei, K., von Lindern, R., Chen, Y.H., Makino, K. and Hung, M.C. E1A Inhibition of Radiation-induced NF-kappaB Activity through Suppression of IKK Activity and IkappaB Degradation, Independent of Akt Activation. *Cancer Res* 2001; **61**: 7413-7416.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Peled, A. and Rotter, V. Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 8982-8986.
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R. and Iggo, R. Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O- glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 1996; **12**: 921-930.
- Sheikh, M.S., Burns, T.F., Huang, Y., Wu, G.S., Amundson, S., Brooks, K.S., Fornace, A.J., Jr. and el-Deiry, W.S. p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* 1998; **58**: 1593-1598.

BIBLIOGRAPHIE

- Shen, D.W., Real, F.X., DeLeo, A.B., Old, L.J., Marks, P.A. and Rifkind, R.A. Protein p53 and inducer-mediated erythroleukemia cell commitment to terminal cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**: 5919-5922.
- Sheppard, K.A., Phelps, K.M., Williams, A.J., Thanos, D., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Gerritsen, M.E. and Collins, T. Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* 1998; **273**: 29291-29294.
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., Goddard, A.D., Godowski, P. and Ashkenazi, A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors [see comments]. *Science* 1997; **277**: 818-821.
- Sherman, L. and Schlegel, R. Serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes is inhibited by the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 1996; **70**: 3269-3279.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997; **91**: 325-334.
- Shivji, K.K., Kenny, M.K. and Wood, R.D. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 1992; **69**: 367-374.
- Siebenlist, U., Franzoso, G. and Brown, K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; **10**: 405-455.
- Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E. and Kastan, M.B. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* 1997; **11**: 3471-3481.
- Skladanowski, A. and Larsen, A.K. Expression of wild-type p53 increases etoposide cytotoxicity in M1 myeloid leukemia cells by facilitated G2 to M transition: implications for gene therapy. *Cancer Res* 1997; **57**: 818-823.
- Slichenmyer, W.J., Nelson, W.G., Slebos, R.J. and Kastan, M.B. Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res* 1993; **53**: 4164-4168.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M. and Fornace, A.J., Jr. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994a; **266**: 1376-1380.
- Smith, M.L., Zhan, Q., Bae, I. and Fornace, A.J., Jr. Role of retinoblastoma gene product in p53-mediated DNA damage response. *Exp Cell Res* 1994b; **215**: 386-389.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Lin, J.H., Poyet, J.L., Fernandes-Alnemri, T., Tsichlis, P.N. and Alnemri, E.S. CLAP, a novel caspase recruitment domain-containing protein in the tumor necrosis factor receptor pathway, regulates NF-kappaB activation and apoptosis. *J Biol Chem* 1999; **274**: 17946-17954.
- Stacey, S.N., Jordan, D., Williamson, A.J., Brown, M., Coote, J.H. and Arrand, J.R. Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J Virol* 2000; **74**: 7284-7297.
- Stavridi, E.S., Chehab, N.H., Malikzay, A. and Halazonetis, T.D. Substitutions that compromise the ionizing radiation-induced association of p53 with 14-3-3 proteins also compromise the ability of p53 to induce cell cycle arrest. *Cancer Res* 2001; **61**: 7030-7033.
- Stein, B., Baldwin, A.S., Jr., Ballard, D.W., Greene, W.C., Angel, P. and Herrlich, P. Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *Embo J* 1993; **12**: 3879-3891.

BIBLIOGRAPHIE

- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J. and Wahl, G.M.** A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J* 1999; **18**: 1660-1672.
- Straight, S.W., Herman, B. and McCance, D.J.** The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* 1995; **69**: 3185-3192.
- Sturzbecher, H.W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U. and Buchhop, S.** p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J* 1996; **15**: 1992-2002.
- Su, L.N. and Little, J.B.** Prolonged cell cycle delay in radioresistant human cell lines transfected with activated ras oncogene and/or simian virus 40 T- antigen. *Radiat Res* 1993; **133**: 73-79.
- Sun, X., Shimizu, H. and Yamamoto, K.** Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 4489-4496.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G.** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; **397**: 441-446.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C. and Kroemer, G.** The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide- induced apoptosis. *J Exp Med* 1997; **186**: 25-37.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. and Kroemer, G.** Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996; **184**: 1331-1341.
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T. and Miura, M.** Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 1998; **17**: 931-939.
- Suzuki, K., Kodama, S. and Watanabe, M.** Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 25571-25575.
- Tamamoto, T., Ohnishi, K., Takahashi, A., Wang, X., Yosimura, H., Ohishi, H., Uchida, H. and Ohnishi, T.** Correlation between gamma-ray-induced G2 arrest and radioresistance in two human cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; **44**: 905-909.
- Tan, T.M., Gloss, B., Bernard, H.U. and Ting, R.C.** Mechanism of translation of the bicistronic mRNA encoding human papillomavirus type 16 E6-E7 genes. *J Gen Virol* 1994; **75**: 2663-2670.
- Taniguchi, A., Kikuchi, K., Nagata, K. and Yasumoto, S.** A cell-type-specific transcription enhancer of type 16 human papillomavirus (HPV 16)-P97 promoter is defined with HPV-associated cellular events in human epithelial cell lines. *Virology* 1993; **195**: 500-510.
- Tao, W. and Levine, A.J.** P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 6937-6941.
- Thames, H.D., Jr., Rozell, M.E., Tucker, S.L., Ang, K.K., Fisher, D.R. and Travis, E.L.** Direct analysis of quantal radiation response data. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1986; **49**: 999-1009.

- Thomas, M. and Banks, L.** Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 1998; **17**: 2943-2954.
- Thompson, D.A., Belinsky, G., Chang, T.H., Jones, D.L., Schlegel, R. and Munger, K.** The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene* 1997; **15**: 3025-3035.
- Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R. and Tjian, R.** p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 1995; **267**: 100-104.
- Thut, C.J., Goodrich, J.A. and Tjian, R.** Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev* 1997; **11**: 1974-1986.
- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C. and Abraham, R.T.** A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 1999; **13**: 152-157.
- Toledano, M.B., Ghosh, D., Trinh, F. and Leonard, W.J.** N-terminal DNA-binding domains contribute to differential DNA-binding specificities of NF-kappa B p50 and p65. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 852-860.
- Tommasino, M., Adamczewski, J.P., Carlotti, F., Barth, C.F., Manetti, R., Contorni, M., Cavalieri, F., Hunt, T. and Crawford, L.** HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* 1993; **8**: 195-202.
- Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C. and Cromlish, J.A.** Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J Virol* 1995; **69**: 1851-1859.
- Tsang, N.M., Nagasawa, H., Li, C. and Little, J.B.** Abrogation of p53 function by transfection of HPV16 E6 gene enhances the resistance of human diploid fibroblasts to ionizing radiation. *Oncogene* 1995; **10**: 2403-2408.
- Tsao, Y.P., Li, L.Y., Tsai, T.C. and Chen, S.L.** Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J Virol* 1996; **70**: 7535-7539.
- Ustav, M. and Stenlund, A.** Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *Embo J* 1991; **10**: 449-457.
- Utrera, R., Collavin, L., Lazarevic, D., Delia, D. and Schneider, C.** A novel p53-inducible gene coding for a microtubule-localized protein with G2-phase-specific expression. *Embo J* 1998; **17**: 5015-5025.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R. and Verma, I.M.** Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB [see comments]. *Science* 1996; **274**: 787-789.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Verma, I.M. and Green, D.R.** Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol* 1998; **8**: 107-111.
- van Hogerlinden, M., Rozell, B.L., Ahrlund-Richter, L. and Toftgard, R.** Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res* 1999; **59**: 3299-3303.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. and Miyamoto, S.** Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995; **9**: 2723-2735.
- Vousden, K.** Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochimica Biophysica acta* 2002; in press.
- Wadgaonkar, R., Phelps, K.M., Haque, Z., Williams, A.J., Silverman, E.S. and Collins, T.** CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappaB and p53 signaling. *J Biol Chem* 1999; **274**: 1879-1882.

BIBLIOGRAPHIE

- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA [see comments]. *Nature* 1994; **369**: 574-578.
- Wagner, A.J., Kokontis, J.M. and Hay, N. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev* 1994; **8**: 2817-2830.
- Wahl, A.F., Donaldson, K.L., Fairchild, C., Lee, F.Y., Foster, S.A., Demers, G.W. and Galloway, D.A. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat Med* 1996; **2**: 72-79.
- Wang, C.Y., Cusack, J.C., Jr., Liu, R. and Baldwin, A.S., Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 1999a; **5**: 412-417.
- Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Mayo, M.W. and Baldwin, A.S., Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999b; **19**: 5923-5929.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W. and Baldwin, A.S., Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996a; **274**: 784-787.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. and Baldwin, A.S., Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; **281**: 1680-1683.
- Wang, X.W., Forrester, K., Yeh, H., Fingleton, M.A., Gu, J.R. and Harris, C.C. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 2230-2234.
- Wang, X.W., Vermeulen, W., Coursen, J.D., Gibson, M., Lupold, S.E., Forrester, K., Xu, G., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J.H. and Harris, C.C. The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev* 1996b; **10**: 1219-1232.
- Wang, X.W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J.M., Wang, Z., Freidberg, E.C., Evans, M.K., Taffe, B.G. and et al. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 1995; **10**: 188-195.
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr. and Harris, C.C. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999c; **96**: 3706-3711.
- Wang, Y. and Prives, C. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 1995; **376**: 88-91.
- Waterman, M.J., Stavridi, E.S., Waterman, J.L. and Halazonetis, T.D. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* 1998; **19**: 175-178.
- Webster, G.A. and Perkins, N.D. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 3485-3495.
- Webster, K., Parish, J., Pandya, M., Stern, P.L., Clarke, A.R. and Gaston, K. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000; **275**: 87-94.
- Werness, B.A., Levine, A.J. and Howley, P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; **248**: 76-79.
- Winters, Z.E., Ongkeko, W.M., Harris, A.L. and Norbury, C.J. p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells. *Oncogene* 1998; **17**: 673-684.

BIBLIOGRAPHIE

- Woo, R.A., McLure, K.G., Lees-Miller, S.P., Rancourt, D.E. and Lee, P.W. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* 1998; **394**: 700-704.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R.r., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G. and el-Deiry, W.S. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene [letter]. *Nat Genet* 1997; **17**: 141-143.
- Wu, L., Bayle, J.H., Elenbaas, B., Pavletich, N.P. and Levine, A.J. Alternatively spliced forms in the carboxy-terminal domain of the p53 protein regulate its ability to promote annealing of complementary single strands of nucleic acids. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 497-504.
- Wu, M.X., Ao, Z., Prasad, K.V., Wu, R. and Schlossman, S.F. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science* 1998; **281**: 998-1001.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. and Levine, A.J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993; **7**: 1126-1132.
- Xia, C., Hu, J., Ketterer, B. and Taylor, J.B. The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J* 1996; **313**: 155-161.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [see comments]. *Nature* 1993; **366**: 701-704.
- Xu, Y., Kiningham, K.K., Devalaraja, M.N., Yeh, C.C., Majima, H., Kasarskis, E.J. and St Clair, D.K. An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *DNA Cell Biol* 1999; **18**: 709-722.
- Yamagishi, N., Miyakoshi, J. and Takebe, H. Enhanced radiosensitivity by inhibition of nuclear factor kappa B activation in human malignant glioma cells. *Int J Radiat Biol* 1997; **72**: 157-162.
- Yang, B., Eshleman, J.R., Berger, N.A. and Markowitz, S.D. Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 1996; **2**: 1649-1657.
- Yang, L., Li, R., Mohr, I.J., Clark, R. and Botchan, M.R. Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature* 1991; **353**: 628-632.
- Yaron, A., Gonen, H., Alkalay, I., Hatzubai, A., Jung, S., Beyth, S., Mercurio, F., Manning, A.M., Ciechanover, A. and Ben-Neriah, Y. Inhibition of NF-kappa-B cellular function via specific targeting of the I-kappa-B-ubiquitin ligase. *Embo J* 1997; **16**: 6486-6494.
- Yeh, W.C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D.V. and Mak, T.W. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* 1997; **7**: 715-725.
- Yew, P.R. and Berk, A.J. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 1992; **357**: 82-85.
- Yew, P.R., Liu, X. and Berk, A.J. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* 1994; **8**: 190-202.
- Yin, M.J., Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998; **396**: 77-80.
- Yoneda, K., Yamamoto, T. and Osaki, T. p53- and p21-independent apoptosis of squamous cell carcinoma cells induced by 5-fluorouracil and radiation. *Oral Oncol* 1998; **34**: 529-537.

BIBLIOGRAPHIE

- Yoshioka, A., Tanaka, S., Hiraoka, O., Koyama, Y., Hirota, Y., Ayusawa, D., Seno, T., Garrett, C. and Wataya, Y. Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine- induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J Biol Chem* 1987; **262**: 8235-8241.
- Zandi, E. and Karin, M. Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 4547-4551.
- Zhan, Q., Carrier, F. and Fornace, A.J., Jr. Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 4242-4250.
- Zhong, H., Voll, R.E. and Ghosh, S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1998; **1**: 661-671.
- Zhu, J. and Chen, X. MCG10, a novel p53 target gene that encodes a KH domain RNA-binding protein, is capable of inducing apoptosis and cell cycle arrest in G(2)-M. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 5602-5618.
- Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H.U. and O'Connor, M.J. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* 1999; **73**: 6209-6219.
- Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J. and Gelinas, C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999; **13**: 382-387.
- Zoratti, M. and Szabo, I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1241**: 139-176.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 [see comments]. *Cell* 1997; **90**: 405-413.

ANNEXES

Liste des abréviations

5FU	5-fluorouracile
⁶⁰ Co	cobalt isotope 60
ADN	acide désoxyribonucléique, DNA
ADNc	ADN complémentaire
AIF	apoptosis inducing factor
Akt	sérine/thréonine kinase
AP-1	Jun-Fos
Apaf-1	apoptotic protease activating factor
APS	ammonium persulfate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related/FRAP related protein
BSA	bovin serum albumin
CAPE	caffeic acid phenethyl ester
CARD	caspases recruitment domain
CBF	CCAAT-binding factor
CBP	CREB-binding protein
Cdc	cycle dependent cyclin
Cdk	cyclin dependent kinase
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate
CK-II	caseïne kinase-II
CLAP	CARD like apoptotic protein
CTD	C-terminal domain
Cyt C	cytochrome C
dATP	désoxyadénosine triphosphate
dCTP	désoxycytosine triphosphate
dGTP	désoxyguanosine triphosphate
dTMP	désoxythymidine monophosphate
dTTP	désoxythymidine triphosphate
dUMP	désoxyuridine monophosphate
dUTP	désoxyuridine triphosphate
DED	death effector domain
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
DEX	dexaméthasone
DNA-PK	DNA activated protein kinase
DO	densité optique
DTT	dithiotréitol
E ₂ F	elongation 2 factor
E6-AP	E6 associated protein
ECL	enhanced chimiluminescence
EDTA	ethylene diamine tetracetic acid
EGF	epiderma growth factor
EORTC	european organization for research and treatment of cancer
ERO	espèces réactives de l'oxygène
FADD	fas-associated death domain
FdUMP	fluoro désoxyuridine monophosphate
FITC	isothiocyanate de fluorescéine

ANNEXES

FUTP	5-fluorouridine triphosphate
G ₁	gap 1
G ₂	gap 2
Gadd45	growth arrest and DNA damage type 45 gene
GR	glucocorticoïde
HAT	histone acetyl transferase
HPV	human papilloma virus
IAP	inhibitor apoptosis protein
IC ₅₀	concentration inhibitrice de 50 % de la croissance cellulaire
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IGF-1	insulin like growth factor 1
IGF-BP3	IGF binding protein 3
I κ B	inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B kinase
IL-1	interleukine-1
IP	iodure de propidium
JNK	c-jun N-terminal kinase
KILLER/DR5	death receptor 5
Klenow	DNA polymerase I large
LBM	leptomycin B
LPS	lipopolysaccharide
MAP	mitogen activated protein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MDR	multi drug resistance
Mdm2	mouse double minute-2
MnSOD	manganese superoxide dismutase
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NAC	N-acetyl-L-cysteine
NES	nuclear export signal
NF- κ B	nuclear factor kappaB
NIK	NF- κ B inducing kinase
NLS	nuclear localisation sequence
NTD	N-terminal domain
<i>Ori</i>	origine de réplication
P53AIP1	P53-regulated apoptosis inducing protein 1
PBS	phosphate buffer saline
PCAF	P300 and CBP associated factor
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PI3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PS	phosphatidylsérine
PTMG	preclinical therapeutic models group
PVDF	fluorure de polyvinylidène
Rb	retinoblastoma protein
rEGF	récepteur à l'EGF

ANNEXES

RER	ratio d'expression relative
RH	Rel Homology
RIP1	receptor interacting protein 1
RNase	ribonucléase
RPA	replication protein A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	dodécylsulfate de sodium
SF ₂	surviving fraction at 2 Gy
SRD	signal receptor domain
STAT 1	signal transducer and activator of transcription 1
STAT 6	signal transducer and activator of transcription 6
TBP	TATA-binding protein
TBE	tris borate EDTA
TD	temps de doublement
TEMED	N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthylènediamine
TFIIB	transcription factor II B
TFIID	transcription factor II D
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R1	TNF receptor 1
TNF-R2	TNF receptor 2
TRADD	TNF-R1 associated domain protien
TRAF	TNF-R associated factor 2
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TS	thymidylate synthase
UI	unité internationale
URR	upstream regulatory region
UTP	uridine triphosphate
UV	ultrat violet
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular epidermal growth factor
XPB	xeroderma pigmentosum TFIH DNA helicase B
XPD	xeroderma pigmentosum TFIH DNA helicase B

Liste des figures

Figure 1 : Boucle de régulation négative P53 / Mdm2. Mdm-2 : Mouse Double Minute-2	30
Figure 2 : Arrêt en G ₁ /S induit par P53. Cdk-2 : Cyclin Dependent Kinase-2 ; E ₂ F : Elongation 2 Factor ; Gadd45 : Growth Arrest and DNA Damage type 45 gene ; PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen ; RPA : Replication Protein A ; Rb : RetinoBlastoma protein.	36
Figure 3 : Mise en place ou sortie du blocage en G ₂ /M. par P53. Cdc-2 : Cell Division Cycle-2 ; Gadd45 : Growth Arrest and DNA Damage type 45 gene	38
Figure 4 : Induction de l'apoptose par P53 <i>via</i> la transactivation de gènes cibles (↓) ou <i>via</i> d'autres mécanismes (↓). P53IAP1 : P53-Regulated apoptosis inducing protein-1 ; IGF : Insulin like Growth Factor ; IGFR : IGF Receptor ; IGF-BP3 : IGF Binding Protein-3.	43
Figure 5 : Organisation du génome de HPV (McGlennen, 2000).	50
Figure 6 : Implication des protéines E2, E6, E6-AP et E7, codées par le virus HPV18, dans la mise en place de l'apoptose et du blocage en G ₁ /S. E ₂ F : Elongation 2 Factor ; E6-AP : E6 Associated protein ; Rb : RetinoBlastoma protein.	57
Figure 7 : Structure tridimensionnelle en papillon de la fixation de l'hétérodimère P50/P65 sur l'ADN (Chen et Ghosh, 1999).	65
Figure 8 : Fixation de l'hétérodimère P50/P65 sur la séquence consensus du site -κB.	65
Figure 9 : Les deux voies d'action de Bcl3. Voie A : libération des sites occupés par des complexes inhibiteurs. Voie B : transactivation des gènes par fixation de Bcl3 sur les complexes inhibiteurs.	67
Figure 10 : Voie classique d'activation de NF-κB <i>via</i> le complexe IKK et une boucle de rétrocontrôle négatif. IKK : IκB kinase.	69
Figure 11 : Activation de NF-κB par le pervanadate ou par le phénomène de réoxygénation <i>via</i> la PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase).	70
Figure 12 : Voies d'activation de NF-κB par le TNFα (Barkett et Gilmore, 1999). TNFα : tumor necrosis factor ; TNF-R1 : TNF receptor 1 ; TRADD : TNF-R1 Associated Death Domain protein ; FADD : Fas Associated Death Domain protein ; RIP : Receptor Interacting Protein ; TRAF : TNF Receptor Associated Factor ; CLAP : CARD-Like Apoptotic Protein ; NIK : NF-κB Inducing Kinase ; IKK : IκB kinase ; NF-κB : nuclear factor kappaB ; IP3-K : phosphatidylinositol 3-kinase ; Akt : sérine/thréonine kinase.	72
Figure 13 : Activation de NF-κB par les radiations ionisantes. ERO : espèces réactives de l'oxygène ; H ₂ O ₂ : peroxyde d'hydrogène ; IKK : inhibiteur IκB ; Akt : sérine/thréonine kinase ; NF-κB : nuclear factor kappaB ; MnSOD : manganese super oxyde dismutase.	73
Figure 14 : Principe du marquage des cellules apoptotiques par l'annexine-V	93
Figure 15 : Analyse de la détection de l'apoptose par la technique de l'annexine-V. A : cellules en nécrose ; B : cellules en apoptose tardive ou en nécrose ; C : cellules vivantes ; D : cellules en apoptose précoce.	95
Figure 16 : Schéma du système de transfert semi-liquide des protéines du gel sur la membrane.	102
Figure 17 : Courbes de croissance des différentes lignées (n=3). Les résultats représentent la moyenne et les écarts types obtenus à partir de trois expérimentations indépendantes.	116
Figure 18 : Courbes de radiosensibilité (n=8). Les écarts types sont inférieurs à 15 %.	117
Figure 19 : Corrélation inverse entre l'IC ₅₀ au 5FU et le paramètre SF ₂ (Test non paramétrique de Wilcoxon, r = 0,987, p = 0,006).	118
Figure 20 : Accumulation des cellules KB (■) et KB3 (◆) en G ₁ /S durant une exposition à une IC ₅₀ de 5FU. Les résultats sont normalisés par leur contrôle (n=3) (Mirjolet, 2000).	121

Figure 21 : Variations d'expression du transcrit p53 lors d'une exposition à une IC ₅₀ de 5FU pour KB (□) et KB3 (■). Les résultats représentent les moyennes des ratios d'expression p53/β ₂ m normalisés par rapport à un témoin non traité (n=3). * Induction statistiquement significative par rapport au témoin (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).	123
Figure 22 : Niveau constitutif d'expression de la protéine P53 dans KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.....	123
Figure 23 : Variation d'expression de la protéine P53 après une exposition des cellules KB et KB3 à une IC ₅₀ de 5FU. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.	124
Figure 24 : Variations d'expression du transcrit E6/E7 après une exposition des cellules KB (□) et KB3 (■) à une IC ₅₀ de 5FU. Les résultats représentent les moyennes des ratios d'expression E6/E7 /β ₂ m normalisés par rapport à un témoin non traité (n=3). * Variation statistiquement significative par rapport au témoin (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).	125
Figure 25 : Niveau constitutif d'expression des protéines E6 et E7 dans KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.	126
Figure 26 : Variations d'expression de la protéine E6 après une exposition des cellules KB et KB3 à une IC ₅₀ de 5FU. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.	126
Figure 27 : Variations d'expression de la protéine E7 après une exposition des cellules KB et KB3, à une IC ₅₀ de 5FU. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.	127
Figure 28 : Variations d'expression du transcrit p21 après exposition des cellules KB (□) et KB3 (■) à une IC ₅₀ de 5FU. Les résultats représentent les moyennes des ratios d'expression p21/β ₂ m normalisés par rapport à un témoin non traité (n=3). * Variation statistiquement significative par rapport au témoin (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).	128
Figure 29 : Variations du pourcentage des cellules en apoptose pour KB (□) et KB3 (■) durant une exposition à une dose d'IC ₅₀ de 5FU. Les résultats sont normalisés par rapport à un témoin non traité (n=3). * Variation statistiquement significative par rapport au témoin (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).	130
Figure 30 : Répartition des cellules dans les phases G ₁ (■), S (◆) et G ₂ (◐) du cycle cellulaire après une irradiation de 2 Gy. Les résultats représentent les moyennes et écarts types des pourcentages de cellules dans chaque phase, normalisés par rapport à un témoin non irradié. (n=3).	133
Figure 31 : Niveau constitutif d'expression de la protéine P53 dans KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.....	135
Figure 32 : Variations d'expression de la protéine P53 après une irradiation de 2Gy des cellules KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.	136
Figure 33 : Variations d'expression du transcrit E6/E7 après une irradiation à 2 Gy des cellules KB (□) et KB3 (■). Les résultats représentent les moyennes des ratios d'expression E6/E7 /β ₂ m normalisés par rapport à un témoin non irradié (n=3). * Variation statistiquement significative par rapport au témoin (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).	137
Figure 34 : Niveau constitutif d'expression des protéines E6 et E7 dans KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes.	137
Figure 35 : Variation d'expression de la protéine E6 après une irradiation de 2Gy des cellules KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes. ...	138

Figure 36 : Variations d'expression de la protéine E7 après une irradiation de 2Gy des cellules KB et KB3. Cette image est représentative de trois expérimentations indépendantes...	138
Figure 37 : Variations d'expression du transcrit p21 après une irradiation à 2 Gy des cellules KB (□) et KB3 (■). Les résultats représentent les moyennes des ratios d'expression p21/β ₂ m normalisés par leur contrôle (n=3). * Variation statistiquement significative par rapport à un témoin non irradié (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).	140
Figure 38 : Variation du pourcentage de cellules KB et KB3 en apoptose après 2 Gy d'irradiation. Les résultats sont normalisés par rapport au témoin non irradié. Ces cytogrammes sont représentatifs de trois expérimentations indépendantes.....	141
Figure 39 : Activité constitutive de NF-κB pour KB et KB3. Cette image est représentative de 5 expérimentations indépendantes.	146
Figure 40 : Super shift pour KB et KB3 avec les anticorps anti-P50 (piste 2) et anti-P65 (piste 3), comparés aux échantillons sans anticorps (-). Ces images sont représentatives de 3 expérimentations indépendantes.	146
Figure 41 : Modulation de l'activité constitutive de NF-κB par une exposition à du TNFα (piste 2) ou de la dexaméthasone (piste 3). La vérification de la spécificité de la bande retardée a été réalisée avec un compétiteur (C) non radio-marqué (piste 4). Ces images sont représentatives de 3 expérimentations indépendantes.	147
Figure 42 : Cinétique d'expression de la protéine IκBα pour les cellules KB et KB3, après exposition au TNFα durant 10 minutes. Ces images sont représentatives de 3 expérimentations indépendantes.....	148
Figure 43 : Cytogramme de l'apoptose basale pour KB et KB3. Analyse par cytométrie en flux après un double marquage Annexine-V et IP. Ces images sont représentatives de 5 expérimentations indépendantes.....	148
Figure 44 : Variation du pourcentage de cellules en apoptose par rapport au témoin, après exposition à la dexaméthasone (DEX) ou au TNFα pour KB (□) et KB3 (■) (n=3) * Variation statistiquement significative par rapport au contrôle (Test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).	150
Figure 45 : Courbes de radiosensibilité de KB après un pré-traitement à la DEX (⊗) ou sans pré-traitement (□). Les résultats représentent les moyennes et les écarts types de 3 expérimentations indépendantes, * Variations statistiquement significatives entre les points des deux courbes, test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).	151
Figure 46 : Activité de NF-κB après une exposition à la dexaméthasone (piste 2) seule, une irradiation à 2 Gy (piste 3) ou une irradiation à 2 Gy réalisées après un prétraitement à la DEX (piste 4), comparé au contrôle (piste 1).....	152
Figure 47 : Courbes de radiosensibilité de KB3 avec un pré-traitement par du TNFα (⊗) ou sans prétraitement (□). Les résultats représentent les moyennes et les écarts types de 3 expérimentations indépendantes. * Variations statistiquement significatives entre les deux courbes, test non paramétrique U de Mann-Whitney, p<0,05).....	153

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition de la solution d'IP	92
Tableau 2 : Composition du tampon de "binding"	94
Tableau 3 : Descriptif des amorces spécifiques utilisées pour les différentes PCR.....	97
Tableau 4 : Composition du mélange pour les différentes amplification de gènes.....	98
Tableau 5 : Cycles d'amplification des différents gènes cibles.....	98
Tableau 6 : Composition du tampon de dépôt	99
Tableau 7 : Taille des fragments d'amplification et conditions de migration pour les différents gènes étudiés.....	99
Tableau 8 : Composition des gels de polyacrylamide	101
Tableau 9 : Composition du tampon de Laemmli (Bio Rad).....	101
Tableau 10 : Composition du tampon de transfert	102
Tableau 11 : Composition du tampon TBST	103
Tableau 12 : Conditions d'immunomarquage pour chaque protéine étudiée.....	103
Tableau 13 : Composition du tampon A.....	105
Tableau 14 : Composition du tampon C.....	105
Tableau 15 : Composition du tampon de liaison de NF- κ B sur les amorces.....	107
Tableau 16 : Temps de doublement des lignées cellulaires.....	116
Tableau 17 : Sensibilité au 5FU des différents clones ($n \geq 8$) et indice de résistance	117
Tableau 18 : Paramètre de radiosensibilité SF ₂ (fraction de survie à 2 Gy) obtenu à partir du modèle linéaire et quadratique pour les quatre lignées cellulaires (n=8).....	118
Tableau 19 : Paramètres de radiosensibilité de KB et KB3 avec ou sans prétraitement. Ces paramètres sont calculés à partir des courbes de survie obtenue à partir de la moyenne de trois expérimentations indépendantes et ajustées avec le modèle linéaire et quadratique.	152

Publications

Didelot C., Mirjolet J-F, Barberi-Heyob M, Ramacci C, Teiten M-H, Merlin J-L
E6 and E7 oncoproteins expression do not prevent 5-Fluorouracil (5FU) mediated G₁/S arrest and apoptosis in 5FU resistant carcinoma cell lines
European Journal of Cancer, soumis.

Didelot C., Mirjolet J-F, Barberi-Heyob M, Ramacci C, Merlin J-L
Radiation induced P53-independent apoptosis is not related to G₂/M arrest exit in head and neck carcinoma cells radio-sensitized by 5-fluorouracil
Canadian Journal of Pharmacology and Physiology, 2002, sous presse.

Mirjolet J-F, Didelot C., Barberi-Heyob M, Merlin J-L
G1/S but not G0/G1 cell fraction is related to 5-Fluorouracil cytotoxicity
Cytometry, 2002, 48 (1), 6-13.

Didelot C., Barberi-Heyob M, Bianchi A, Becuwe P, Mirjolet J-F, Dauça M, Merlin J-L
Constitutive NF- κ B activity influences basal apoptosis and radiosensitivity of head and neck carcinoma cell lines
International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2001, 51 (5), 1354-1360.

Mirjolet J-F, Barberi-Heyob M, Didelot C., Peyrat J-P, Millon R, Abecassis J, Merlin J-L
Bcl-2/Bax ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status
Br. J. Cancer, 2000, 10, (10), 1380-1386.

Résumés publiés

Didelot C, Barberi-Heyob M, Bianchi A, Mirjolet J-F, Becuwe P, Dauça M, Merlin J-L
Constitutive nuclear factor- κ B DNA-binding activity influences basal
apoptosis and radiosensitivity of head and neck carcinoma cell lines
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 2001, **42**, abstract 3836

Didelot C, Mirjolet J-F, Barberi-heyob M, Milano G, Merlin J-L
Influence of S-phase duration on G2 arrest-mediated apoptosis induction by radiations in cell
lines expressing different level of sensitivity to 5-fluorouracil (5FU)
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 2000, **41**, 785, abstract 4989

Mirjolet J-F, Barberi-Heyob M, Didelot C, Peyrat J-P, Merlin J-L
5-fluorouracil cellular sensitivity is closely correlated with BCL2/BAX protein ratio, and
under P53 status influence
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 2000, **41**, 854, abstract 5424

Didelot C, Mirjolet JF, Barberi-Heyob M, Merlin JL
Impact de la durée de phase S sur la radiosensibilité de lignées exprimant différents niveaux
de résistance au 5-fluorouracile
Bull. Cancer, mai 2000, 87 (5).

Didelot C, Mirjolet J-F, Barberi-Heyob M, Marchal S, Milano G, Formento J-L, Merlin J-L
Cycle cellulaire et radiothérapie pour des lignées de carcinomes épidermoïdes oraux
exprimant différents niveaux de sensibilité au 5-fluorouracile (5FU)
Bull. Cancer, 1999, **86**, 5, 475, abstract 79

Didelot C, Mirjolet J-F, Barberi-Heyob M, Marchal S, Dubessy C, Merlin J-L
Evaluation de la radiosensibilité sur des clones de chimiosensibilité variable aux
fluoropyrimidines
Bull. Cancer, 1998, **85**, 5, 475, abstract 181

Communications orales

Didelot C, Barberi-Heyob M, Bianchi A, Becuwe P, Dauça M, Merlin J-L
Perspectives de radiosensibilisation par modulation de l'activité constitutive de NF- κ B
8^{ème} Atelier du Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique, 5 octobre 2001, Nancy, France

Didelot C, Barberi-Heyob M, Bianchi A, Mirjolet J-F, Becuwe P, Dauça M, Merlin J-L
Influence de l'activité constitutive du facteur de transcription NF- κ B sur le taux d'apoptose basal et le niveau de radiosensibilité intrinsèque de lignées de carcinomes ORL humains
5^{ème} Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Clinique, 18-22 juin 2001, Autrans, France

Didelot C, Barberi-Heyob M, Bianchi A, Mirjolet J-F, Becuwe P, Dauça M, Merlin J-L
Constitutive nuclear factor- κ B DNA-binding activity influences basal apoptosis and radiosensitivity of head and neck carcinoma cell lines
Session de poster discussion du 92^{ème} congré annuel de l'AACR, 24-28 mars 2001, Nouvelles Orléans, Louisiane, USA

Didelot C, Mirjolet JF, Barberi-Heyob M, Merlin JL
Impact de la durée de phase S sur la radiosensibilité de lignées exprimant différents niveaux de résistance au 5-fluorouracile
XX^{ème} Forum de cancérologie, 6 au 8 juin 2000, Paris, France

Didelot C, Mirjolet JF, Barberi-Heyob M, Marchal S, Milano G, Formento JL, Merlin JL
Cycle cellulaire et radiothérapie pour des lignées de carcinomes épidermoïdes oraux exprimant différents niveaux de sensibilité au 5-fluorouracile (5FU)
XIX^{ème} Forum de cancérologie, 30 mai au 1er juin 1999, Paris, France

Didelot C, Mirjolet JF, Barberi-Heyob M, Marchal S, Merlin JL
Radiosensibilité et répartition dans le cycle cellulaire de lignées de carcinomes des voies aéro-digestives supérieures exprimant différents niveaux de sensibilité au 5-fluorouracile
7^{èmes} journées du groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique, 22 au 23 octobre 1998, Arcachon, France

Didelot C, Mirjolet JF, Barberi-Heyob M, Marchal S, Dubessy C, Merlin JL
Evaluation de la radiosensibilité sur des clones de chimiosensibilité variable aux fluoropyrimidines
XVIII^{ème} Forum de Cancérologie, 2 au 3 juin 1998, Paris, France

Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status

J-F Mirjolet, M Barberi-Heyob¹, C Didelot¹, J-P Peyrat², J Abecassis³, R Millon³ and J-L Merlin¹

¹Centre Alexis Vautrin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-les-Nancy cedex; ²Centre Oscar Lambret, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, 59020 Lille cedex; ³Centre Paul Strauss, Laboratoire de Biologie Tumorale, 3, rue de la Porte de l'Hôpital, 67085 Strasbourg cedex, France

Summary p53 tumour-suppressor gene is involved in cell growth control, arrest and apoptosis. Nevertheless cell cycle arrest and apoptosis induction can be observed in p53-defective cells after exposure to DNA-damaging agents such as 5-fluorouracil (5-FU) suggesting the importance of alternative pathways via p53-independent mechanisms. In order to establish relationship between p53 status, cell cycle arrest, Bcl-2/Bax regulation and 5-FU sensitivity, we examined p53 mRNA and protein expression and p53 protein functionality in wild-type (wt) and mutant (mt) p53 cell lines. p53 mRNA and p53 protein expression were determined before and after exposure to equitoxic 5-FU concentration in six human carcinoma cell lines differing in p53 status and displaying marked differences in 5-FU sensitivity, with IC₅₀ values ranging from 0.2–22.6 mM. 5-FU induced a rise in p53 mRNA expression in mt p53 cell lines and in human papilloma virus positive wt p53 cell line, whereas significant decrease in p53 mRNA expression was found in wt p53 cell line. Whatever p53 status, 5-FU altered p53 transcriptional and translational regulation leading to up-regulation of p53 protein. In relation with p53 functionality, but independently of p53 mutational status, after exposure to 5-FU equitoxic concentration, all cell lines were able to arrest in G1. No relationship was evidenced between G1 accumulation ability and 5-FU sensitivity. Moreover, after 5-FU exposure, Bax and Bcl-2 proteins regulation was under p53 protein control and a statistically significant relationship ($r = 0.880$, $P = 0.0097$) was observed between Bcl-2/Bax ratio and 5-FU sensitivity. In conclusion, whatever p53 status, Bcl-2 or Bax induction and Bcl-2/Bax protein ratio were correlated to 5-FU sensitivity. © 2000 Cancer Research Campaign

Keywords: 5-FU sensitivity; p53 status; mdm2; G1/S arrest; Bcl-2/Bax ratio

p53 tumour-suppressor gene is involved in the control of cell growth, arrest and apoptosis (Kastan et al, 1991; Oren, 1994; Stewart et al, 1995). Cells exposed to DNA-damaging agents such as 5-fluorouracil (5-FU) activate wild-type p53, then either undergo G1/S arrest and are repaired or undergo apoptosis (Kastan et al, 1991; Kuerbitz et al, 1992; Guillouf et al, 1995). The option which prevails may be reflected by the relative levels of p21^{WAF1} and/or Bcl-2 gene family expression. However, apoptosis induction has also been reported in p53-defective cells after exposure to DNA-damaging agents, suggesting the importance of alternative pathways (Dou et al, 1995). As currently accepted, biosynthesis of wild-type p53 can be controlled by both transcriptional (Deffie et al, 1993; Hudson et al, 1995) and translational regulation processes (Mosner et al, 1995; Ewen and Miller, 1996; Fu et al, 1996). Inhibition of p53 biosynthesis by translational process requires wild-type p53 and arises through a negative autoregulatory feedback loop (Mosner et al, 1995; Ewen and Miller, 1996; Fu et al, 1996). Although the precise mechanism through which transcriptional autoregulation is mediated still remains to be elucidated, this effect appears to be cell-type specific and to involve binding of p53 to other transcription factors. It has now been reported that mutation as well as other factors can stabilize

p53 protein and render it non-functional (Vogelstein and Kinzler, 1992). Interactions with viral or cellular proteins such as HPV-E6 protein or mdm2 gene product (Scheffner et al, 1990; Kubbutat et al, 1997) were shown to inactivate p53 protein. p53 and mdm2 proteins constitute an autoregulatory feedback loop in which p53 limits its own activity through the production of mdm2 (Momand et al, 1992; Barak et al, 1993). These observations have now led to the theory that the whole cellular environment may determine p53 stability and function. These data suggest that stabilized detectable p53 protein, whether created as a result of mutation or by some other protein interaction, may have inactivated or impaired function in the cell, such as apoptosis induction.

Chemotherapeutic agents including 5-FU are known to induce apoptosis (Lowe et al, 1993). Differences in p53 functionality between cell lines displaying different 5-FU sensitivity could result from p53 functional status inducing various cellular responses to drug-induced damage. Bcl-2 belongs to a growing family of apoptosis regulators and experiments suggested the involvement of p53 and Bcl-2 family proteins in chemotherapy-induced apoptosis (Harris, 1996; Nita et al, 1998a). Bcl-2 and Bcl-xl can block cell death in various cell systems under a variety of conditions. Conversely, overexpression of Bax, Bak and Bad, among the other Bcl-2 family proteins, was shown to induce apoptosis (Strobel et al, 1996).

Nita et al (1998a) have recently demonstrated that, in cells expressing wild-type p53, 5-FU-induced apoptosis was accompanied by increased expression of Bax and Bak without consistent modulation of other Bcl-2 family proteins as opposed to cells

Received 3 May 2000

Revised 18 July 2000

Accepted 18 July 2000

Correspondence to: M Barberi-Heyob

strongly reduce HAMA (human anti-mouse antibody) responses in patients. However, the prolonged biological half-life of the humanized MoAbs could cause problems with increased radiation dose to normal tissues, and hence a decreased therapeutic index, when isotopes with longer half-life (days) are utilized (Bruland, 1995; Multani and Grossbard, 1999). The use of a relatively short-lived isotope like ^{211}At will make those differences in biological half-life less relevant.

As pointed out, ^{211}At also has several advantages from a radiation-protection point of view. More than 99% of its radiation energy is from α -particles. The short half-life (7.2 h) could reduce the hospitalization time, and the short tissue-range of the α -particles (maximum 80 μm) would simplify the protection of the staff and environment (Larsen et al, 1999).

A BM progenitor cell survival of 5% should be sufficient for recovery without stem-cell support. This survival level of $\text{BM}_{\text{CFU-c}}$ was observed at an initial activity concentration of 70.3 kBq ml^{-1} following 1 h incubation. The corresponding log cell kill of RAEL was as high as 4.8. Consequently there may be a significant therapeutic window if non-myeloablative doses of ^{211}At -rituximab are explored clinically.

In conclusion, our study shows that rituximab labelled with ^{211}At exerts selective cytotoxicity to NHL tumour cells in vitro. The effect of the radioimmunoconjugate will now be investigated in patients with relapsed B-cell lymphomas.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was financially supported by The Norwegian Cancer Society, grant no. 97014 and 96070. Rituximab (MabTheraTM) was a gift from Roche Norway A/S. Thanks are due to Dr LS Rusten, Clinical Stem Cell Laboratories, the Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway, for instruction in the LTC-IC method, and to Mr E Olsen, Department of Physics, University of Oslo for performing cyclotron irradiations to produce ^{211}At . We are indebted to Professor A Pihl for constructive criticism of the manuscript.

REFERENCES

- Armitage JO (1993) Treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **328**: 1023–1030
- Barendsen GW, Koot CJ, Van Kersen GR, Bewley DK, Field SB and Parnell CJ (1965) The effect of oxygen on impairment of the proliferative capacity of human cells in culture by ionizing radiations of different LET. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **10**: 317–327
- Behr TM, Behe M, Stabin MG, Wehrmann E, Apostolidis C, Molinet R, Strutz F, Fayyazi A, Wieland E, Gratz S, Koch L, Goldenberg DM and Becker W (1999) High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of ^{213}Bi -versus ^{90}Y -labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Res* **59**: 2635–2643
- Brown I (1986) Astatine-211: its possible applications in cancer therapy. *Int J Radiat Appl Instrum A* **37**: 789–798
- Bruland OS (1995) Cancer therapy with radiolabelled antibodies. An overview. *Acta Oncol* **34**: 1085–1094
- Courtenay VD and Mills J (1978) An *in vitro* colony assay for human tumours grown in immune-suppressed mice and treated *in vivo* with cytotoxic agents. *Br J Cancer* **37**: 261–268
- Dyer MJ, Fischer P, Nacheva E, Labastide W and Karpas A (1990) A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t(14;18) and t(4;11) chromosomal translocations. *Blood* **75**: 709–714
- Eaves CJ, Cashman, JD and Eaves AC (1991) Methodology of long-term culture of human hemopoietic cells. *J Tiss Cult Meth* **13**: 55–62
- Hall EJ (1994) Linear energy transfer and relative biological effectiveness. In: *Radiobiology for the Radiologist*, 4th edn, pp 153–164. Philadelphia: JB Lippincott Company
- Harrison A and Royle L (1987) Efficacy of astatine-211-labeled monoclonal antibody in treatment of murine T-cell lymphoma. *National Cancer Institute Monogr*: 157–158
- Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, Fenner MC, Ross CW, Milik AW, Estes J, Tuck M, Regan D, Fisher S, Glenn SD and Wahl RL (1996) Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* **14**: 1974–1981
- Knox SJ, Goris ML, Trisler K, Negrin R, Davis T, Liles TM, Grillo LA, Chinn P, Varns C, Ning SC, Fowler S, Deb N, Becker M, Marquez C and Levy R (1996) Yttrium-90-labeled anti-CD20 monoclonal antibody therapy of recurrent B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* **2**: 457–470
- Kvalheim GS, Fodstad O, Pihl A, Nustad K, Pharo A, Ugelstad J and Funderud S (1987) Elimination of B-lymphoma cells from human bone marrow: model experiments using monodisperse magnetic particles coated with primary monoclonal antibodies. *Cancer Res* **47**: 846–851
- Larsen RH, Bruland OS, Hoff P, Alstad J, Lindmo T and Rofstad EK (1994a) Inactivation of human osteosarcoma cells in vitro by ^{211}At -TP-3 monoclonal antibody: comparison with astatine-211-labeled bovine serum albumin, free astatine-211 and external-beam X rays. *Radiat Res* **139**: 178–184
- Larsen RH, Hoff P, Alstad J and Bruland OS (1994b) Preparation and quality control of ^{211}At -labelled and ^{125}I -labelled monoclonal antibodies. Biodistribution in mice carrying human osteosarcoma xenografts. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **XXXIV**: 774–785
- Larsen RH, Slade S and Zalutsky MR (1998) Blocking ^{211}At [astatide accumulation in normal tissues: preliminary evaluation of seven potential compounds. *Nucl Med Biol* **25**: 351–357
- Larsen RH, Murud KM, Akabani G, Hoff P, Bruland OS and Zalutsky MR (1999) ^{211}At - and ^{131}I -labelled bisphosphonates with high in vivo stability and bone accumulation. *J Nucl Med* **40**: 1197–1203
- Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J and Bunn PA Jr. (1984) Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* **72**: 77–89
- Liu SY, Eary JF, Petersdorf SH, Martin PJ, Maloney DG, Appelbaum FR, Matthews DC, Bush SA, Durack LD, Fisher DR, Gooley TA, Bernstein ID and Press OW (1998) Follow-up of relapsed B-cell lymphoma patients treated with iodine-131-labeled anti-CD20 antibody and autologous stem-cell rescue. *J Clin Oncol* **16**: 3270–3278
- McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Brukler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D and Dallaire BK (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* **16**: 2825–2833
- Multani PS and Grossbard ML (1998) Monoclonal antibody-based therapies for hematologic malignancies. *J Clin Oncol* **16**: 3691–3710
- Multani PS and Grossbard ML (1999) Antibody-based therapy for lymphoma. *Adv Oncol* **15**: 23–29
- Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, Martin PJ, Nelp WB, Glenn S, Fisher DR, Porter B, Matthews DC and Gooley T (1995) Phase II trial of ^{131}I -B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas. *Lancet* **346**: 336–340
- Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N and Anderson DR (1994) Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83**: 435–445
- Sgouros G, Ballangrud AM, Jurcic JG, McDevitt MR, Humm JL, Erdi YE, Mehta BM, Finn RD, Larson SM and Scheinberg DA (1999) Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: ^{213}Bi -HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia. *J Nucl Med* **40**: 1935–1946

containing mutant-type p53. In the present study, we investigated the difference in 5-FU sensitivity observed in six human cancer cell lines with different p53 status and tried to evidence the basis of this difference by following Bcl-2/Bax ratio and its correlation with p53 status and mRNA or protein expression induction after exposure to 5-FU equitoxic concentration. Whether the 5-FU sensitivity differences are a result of different p53 functionality causing differences in Bcl-2 and Bax regulation, the implication of p53 protein expression induction in G1 arrest ability will be discussed and reconsidered.

MATERIALS AND METHODS

Materials and chemicals

Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France), culture media and additives from Life Technologies (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France), except for fetal calf serum, which was obtained from Costar. Taq-polymerase, RNase H, random primers, SuperScript II® DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate were purchased from Life Technologies. Anti-bromodeoxyuridin monoclonal antibodies, p53 monoclonal antibodies (DO-7) and peroxidase-conjugated antibodies were provided by Dako (Trappes, France). Bax (N-20) polyclonal antibodies were purchased from Tebu (Le Perray-en-Yvelines, France). All other chemicals were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France) and were of molecular biology grade.

Cell culture

CAL51 human breast adenocarcinoma, PANC3 pancreas carcinoma, CAL27 and CAL33 human head and neck carcinoma cell lines were kindly provided by Dr JL Fischel (Centre Antoine Lacassagne, Nice, France). FaDu and KB, head and neck carcinoma cell lines, were obtained from Professor A Hanauske (Munich University, Germany) as part of the EORTC Preclinical Therapeutic Models Group exchange program. All cell lines were grown in 75 cm² plastic tissue culture flasks in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum, penicillin (100 iu ml⁻¹), streptomycin (100 µg ml⁻¹) in a 37°C, 5% CO₂ atmosphere. The cells were exposed at day 4 after seeding to equitoxic 5-FU concentrations (IC₅₀) for 24 h, then analysed immediately.

Cytotoxicity assay

MTT assays were carried out according to a procedure previously reported (Barberi-Heyob et al, 1993). Briefly, cells were seeded at the initial density of 2.10⁴ cells ml⁻¹ in 96-well micro titration plates. 72 h after plating, cells were exposed for 72 h to 5-FU concentrations ranging from 0.08–4.10⁴ µM, each concentration being tested in sextuplicate. 50 µl of 0.5% MTT solution were then added in each well and incubated for 3 h at 37°C to allow MTT metabolism. The formazan crystals were dissolved by adding 50 µl per well of 25% sodium dodecylsulfate solution and vigorous pipetting. Absorbance was measured at 540 nm using a Multiskan MCC/340 plate reader (Labsystem, Cergy-Pontoise, France). Results were expressed as relative absorbance to untreated controls. 5-FU concentrations yielding 50% growth inhibition (IC₅₀) were calculated using medium effect algorithm

(Chou and Talalay, 1987) and expressed as mean values of five independent experiments.

Analysis of p53 mutations

To identify p53 genomic mutation, direct DNA automated fluorescent sequencing analyses were conducted. Both DNA strands were sequenced. Briefly, PCR was performed using four pairs of primers covering exons 2–9 and including flanking intronic splicing sites (one pair for exons 2–4, one for exons 5 and 6, one for exon 7 and finally one pair for exons 8 and 9), in a 20 µl volume containing 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl, 50 mmol l⁻¹ KCl, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol l⁻¹ deoxynucleotide triphosphates, 0.5 µmol l⁻¹ of each primer, and 1 µg of genomic DNA. The reactions were carried out using a Perkin Elmer/Cetus thermal cycler model 9600. The PCR products were then purified using Sephadryl S400HR (Amersham-Pharmacia Biotech, Les Ulis, France). 5 µl of purified fragments were used for sequencing with a Thermo Sequenase™ Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham-Pharmacia Biotech), using the same PCR primers. After purification with Biogel P10 (Bio Rad), the products were sequenced using ABI 373 automated DNA sequencing system (Applied Biosystem).

RNA isolation and RT-PCR analysis

Isolation of total RNA was performed using TRIzol® according to the manufacturer's specifications (Life Technologies). cDNA synthesis was performed with 1 µg total RNA in a reaction volume of 20 µl containing 100 ng of random primers, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate, 10 mM dithiothreitol and 200 units SuperScript II® reverse transcriptase and incubated for 10 min at room temperature, 50 min at 42°C, followed by 15 min at 70°C. RNase-H (2.5 units) was added into each sample, then incubated for 20 min at 37°C. cDNA samples were stored at –20°C until analysed.

p53 and p21

p53 and p21 semi-quantitative PCR analyses were then performed using β₂-microglobulin (β₂m) as reference gene. 0.5 µl or 1 µl of cDNA samples were mixed, respectively for p53 or p21 amplification, in a volume of 20 µl containing 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.01% Tween 20, 2 or 1.5 mM MgCl₂ respectively for p53 or p21 amplification, 0.2 mM dNTP, 5 µM of each 5'- and 3'-primers, and 0.5 unit of Taq polymerase. The primers sequences were 5'-TCTGTGACTTGCACGTACTC-3' (sense) and 5'-CACGGATCTGAAGGGTGAAA-3' (antisense) for p53 (Aguilar Santelises et al, 1996), 5'-CCCAGTGGACAGC-GAGCAGC-3' (sense) and 5'-ACTGCAGGCTTCCTGTGGGC-3' (antisense) for p21, 5'-ACCCCACTGAAAAAGATGA-3' (sense) and 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3' (antisense) for β₂-microglobulin (β₂m) (Gussow et al, 1987).

The PCR tubes were incubated for p53 and β₂m amplification, as follows: the first cycle was 5 min at 95°C, 1 min at 57°C and 1 min at 72°C. The 33 or 36 following cycles, respectively for p53 and p21 amplification, were 1 min at 94°C, 1 min at 57°C and 1 min at 72°C. In each case, after completion of PCR cycles, the mixture was finally incubated for 7 min at 72°C. p53 and β₂ PCR products were electrophoretized on 1% agarose gel containing 0.1 µg ml⁻¹ of ethidium bromide. Quantification was performed by UV transillumination using a Gel Doc 1000 system (Bio Rad,

Table 1 Characteristics of the cell lines used. Identification of p53 genomic mutations covering exons 2–9 and 5-FU sensitivity (IC₅₀)

Cell lines	Exon	Codon	Nucleoside substitution	Amino-acid substitution ^a	p53 status ^b	5-FU IC ₅₀ ^c (mM)
CAL51	4	72	CGC → CCC	R → P	wt	0.16 ± 0.01
KB	—	—	—	—	wt	0.94 ± 0.17
FaDu	7	248	CGG → CTG	R → L	mt	1.05 ± 0.48
	7	splicing site	TAG → TAA	—	—	—
CAL33	4	72	CGC → CCC	R → P	mt	0.97 ± 0.63
	5	175	CGC → CAC	R → H	—	—
CAL27	4	72	CGC → CCC	R → P	mt	3.12 ± 0.84
	6	193	ATC → TTC	H → L	—	—
PANC3	2–4	—	deletion	—	del	22.62 ± 3.09

^a R = arginine; P = proline; L = leucine; H = histidine; ^bmt = mutant-type; wt = wild-type; del = deletion; ^cmean ± standard deviation of five independent experiments

Ivry-sur-Seine, France). Finally, for each cDNA sample, p53: β_2m relative expression ratio (RER) was calculated as the ratio of the fluorescence intensities of p53 and β_2m PCR products bands.

Mdm2

Mdm2 gene contains two different promoter regions. The upstream promoter region (P1) is known to be active in absence of p53 and the second promoter region (P2) is located within the first intron and contains a p53-responsive element (mdm2-p53RE).

The multiPCR of these different transcripts was performed using the forward mdm2 exon1-specific and mdm2 exon2-specific primers (5'-GAAAAGATGGAGCAAGAAGCC-3' and 5'-CAGTGGC-GATTGGAGGGTAG-3'), respectively with a unique reverse primer (5'-GTAGGTACAGACATGTTGGTA-3') located in exon3 of the mdm2 gene. Amplification of β_2m was performed concomitantly using the forward (5'-AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA-3') and reverse (5'-TGTTGATGTTGGATAAGA-GAAT-3') primers. The reaction volume was 50 μ l and comprised 1X reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ M of each mdm2 forward primers, 0.4 μ M of mdm2 reverse primer and 0.05 μ M of β_2m primers, 0.25 mM of deoxynucleotides and 1 unit of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Courtaboeuf, France). Amplification was carried out for 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s using a thermal cycler (Perkin Elmer 480). The cycles were followed by incubation of the mixtures for 15 min at 95°C to ensure full denaturation of the target DNA and activation of HotStarTaq DNA polymerase. The PCR products, P1 (405 pb), P2 (210 pb) and β_2m (620 pb) were separated on an agarose gel in presence of ethidium bromide and quantified by image analysis.

Cell cycle distribution analysis

Cell cycle distribution was measured before and after 5-FU exposure. Cell samples for flow cytometry were washed with PBS, resuspended in 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X100 and 50 μ g ml⁻¹ propidium iodide (PI), and then stored for 24 h at 4°C. After centrifugation at 1500 rpm for 5 min, the samples were resuspended in PBS containing 250 μ g ml⁻¹ RNase. Bivariate distributions of cells number vs DNA content (PI) were analysed, using an Orthocyte flow cytometer (Ortho Diagnostic Systems, Roissy, France) equipped with xenon lamp and filter set for excitation at 488 nm. PI fluorescence intensity was recorded through 575 nm high pass filters. At least 20 000 events were collected in each final gated histogram. The data were analysed using Multicycle software (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA).

Western blot analysis and ELISA

Cells were collected in PBS, washed twice, and lysed in ice-cold lysis buffer (20 mmol l⁻¹ Tris-HCl pH 8.0, 100 mmol l⁻¹ NaCl, 1% Triton X100, 0.5% sodium-deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mmol l⁻¹ sodium-EDTA). Samples were incubated for 30 min on ice then stored at -80°C until analysed. Defrosted samples received 20 μ g of protein in Laemmli buffer (Bio Rad) then boiled for 5 min, subjected to SDS-PAGE (10% and 15% respectively for p53 and Bax protein) and were transferred onto Immobilon-P transfer membranes (Millipore, St Quentin Yvelines, France) for p53 or to yuelines Immun-Blot® PVDF membranes (Bio Rad) for Bax, using semi-dry blotting techniques. Membranes were probed for 1 h with DO-7 mouse p53 primary monoclonal antibody or overnight at 4°C with Bax primary polyclonal antibody, and then probed with horseradish peroxidase-labelled secondary antibody for 1 h at room temperature. Immunological complexes were visualized by chemiluminescence detection according to the manufacturer's recommendations (Amersham-Pharmacia Biotech).

Bcl-2 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed using Amersham-Pharmacia Biotech kit and according to the manufacturer's specifications.

Statistical analysis

Unless indicated, all data are mean values ± standard deviation (SD) calculated from at least four independent experiments. Spearman's rank correlation was used to test the correlation between the different parameters and Mann and Whitney U test was used to test for the significance level between independent variables.

RESULTS

p53 status of cell lines displaying different 5-FU sensitivity

The six carcinoma cell lines displayed a marked difference in 5-FU sensitivity with IC₅₀ values ranging from 0.16 ± 0.01 to 22.62 ± 3.09 mM for CAL51 and PANC3 lines, respectively (Table 1). The cell lines were first checked for p53 mutations by direct DNA sequencing. These data are summarized in Table 1. Germline polymorphism at codon 72 in exon 4 (G to C transversion) was detected in CAL51, CAL27 and CAL33 cell lines inducing arginine to proline amino-acid substitution (Matlashewski et al, 1987; Ara et al, 1990). Mutated sequence was

Table 2 p53 mRNA expression induction, p53 protein induction after 24 h 5-FU equitoxic exposure

Cell lines	p53/ β 2 m RER ^a (%)	p53 protein induction ^c
CAL51 (wt)	73 $\pm$ 6	+++
KB (wt)	238 $\pm$ 22	no
FaDu (mt)	109 $\pm$ 9	++
CAL33 (mt)	150 $\pm$ 13	+
CAL27 (mt)	121 $\pm$ 23	+
PANC3 (del)	no ^b	no

^a mean $\pm$ standard deviation of five independent experiments; ^b no RT-PCR mRNA expression; ^c + = weakly; ++ = moderately; +++ = highly overexpressed; no = no protein expression

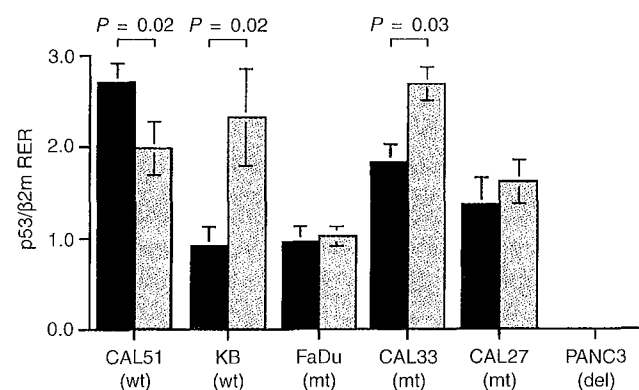


Figure 1 p53 mRNA relative expression ratio vs β 2m before ■ and after ■ 5-FU equitoxic exposure. Results are mean values of five independent experiments

observed in three cell lines. A to T transversion at codon 193 in exon 6 was found in CAL27, resulting in histidine to leucine substitution. Point mutation was detected in CAL33 line (G to A transition) at codon 175 in exon 5, inducing arginine to histidine amino-acid substitution. Point mutation (G to T transversion) at codon 248 in exon 7, resulting in arginine to leucine substitution, was detected in FaDu cells. Internal sequence deletion corresponding to exons 2–4 was evidenced in PANC3 cells. Wild-type p53 status was found in CAL51 and KB cells.

p53 mRNA and protein expression after 5-FU treatment

p53 mRNA and protein expression were determined after cellular stress induced by equitoxic concentrations of 5-FU (Table 2). Figures 1 and 2 show that p53 mRNA RER as well as protein expression were significantly altered after 24-h 5-FU exposure. Mutant p53 cell lines displayed either no modification or an increase of p53 mRNA RER (Figure 1) and p53 protein was slightly up-regulated (Figure 2). p53 mRNA RER was significantly decreased in wild-type p53 CAL51 cell line (Figure 1) and p53 protein was found to be highly overexpressed (Figure 2). Despite p53 wild-type status in KB line, p53 mRNA expression was also found to be up-regulated (Figure 1) and p53 protein was not detected (Figure 2).

p53 protein functionality as transcription factor: mdm2 and p21 mRNA expression

mdm2 mRNA expression before and after 5-FU exposure was reported in Table 3. In the wild-type-p53 CAL51 and KB a

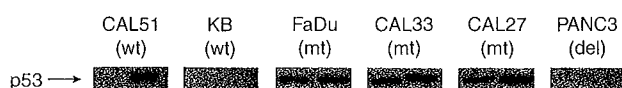


Figure 2 p53 protein expression before (left) and after (right) 5-FU equitoxic exposure

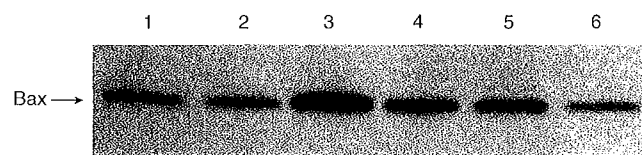


Figure 3 Bax protein basal expression levels evaluated by western blot analysis. Lanes: 1 = CAL27; 2 = CAL33; 3 = CAL51; 4 = KB; 5 = FaDu; 6 = PANC3

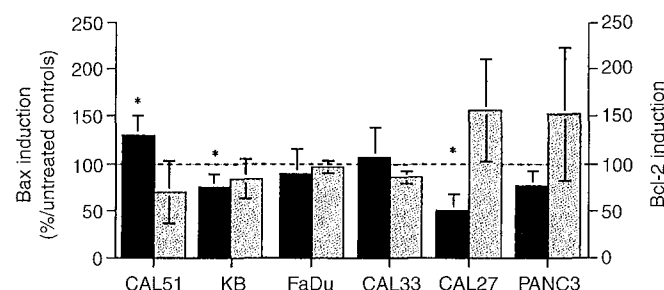


Figure 4 Bax ■ and Bcl-2 ■ protein expression after 5-FU treatment. Results are mean values of three independent experiments

Table 3 p53 functionality as transcription factor

Cell lines	mdm2-p53RE RER		p21 RER	
	Control	After 5-FU	Control	after 5-FU
CAL51 (wt)	3.3 $\pm$ 1.0	6.0 $\pm$ 1.8	4.0 $\pm$ 0.7	7.8 $\pm$ 1.5
KB (wt)	0.1 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.4
FaDu (mt)	0.2 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.1
CAL33 (mt)	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.3
CAL27 (mt)	0.3 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.3
PANC3 (del)	1.6 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.2

significant increase in mdm2 transcription at p53 responsive element (mdm2-p53RE) was observed. No overexpression was detected when p53 was mutated or deleted, except in FaDu cell line which displayed a 1.5-fold increase in mdm2-p53RE (Table 3).

p21 mRNA basal expression was higher in CAL51 and KB wt cells. Up-regulation of p21 mRNA was detected in all cell lines, except in PANC3 cell line. Overexpression, however, was higher in CAL51 wt cell lines.

Cell cycle distribution after 5-FU exposure: p53 status consequences

After 5-FU exposure, all cell lines were able to arrest in G1 phase (Table 4). Nevertheless, only CAL51, KB and FaDu cell lines displayed statistically significant accumulation in G1 phase. S phase was unchanged or slightly decreased and G2/M phase was more markedly reduced (Table 4).

Table 4 Cell cycle distribution after 5-FU exposure (percentage vs untreated controls)

Cell lines	G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
CAL51 (wt)	130 ± 15	89 ± 14	27 ± 20
KB (wt)	120 ± 16	102 ± 19	25 ± 38
FaDu (mt)	126 ± 10	77 ± 8	50 ± 47
CAL33 (mt)	135 ± 20	76 ± 1	39 ± 46
CAL27 (mt)	111 ± 32	104 ± 35	65 ± 49
PANC3 (del)	108 ± 8	100 ± 12	66 ± 33

Bax and Bcl-2 proteins expression after 5-FU exposure: relationship with 5-FU sensitivity and p53 status

As Bax and Bcl-2 proteins are under p53 protein control, changes associated with equitoxic concentration of 5-FU were investigated. After 5-FU exposure, Bcl-2 protein expression decreased in the wild-type p53 cell lines (even in HPV-positive KB cells) whereas in the mutant p53 cell lines no variation (CAL33 and FaDu) or a significant increase (CAL27 and PANC3, Figure 4) was detected. Bcl-2 induction was significantly correlated with 5-FU sensitivity ($r = 0.47$, $P = 0.0323$, Figure 5A). Bax was found to be relatively overexpressed in the wild-type p53 CAL51 cell line, but neither in the mutant p53, nor in the HPV-positive cell lines (Figure 3). Moreover, Bax basal levels were related to 5-FU sensitivity, since the most sensitive cell line (CAL51) displayed the highest Bax level as opposed to data achieved in the most resistant cell line (PANC3, Figure 3). Bax induction was significantly correlated with 5-FU sensitivity ($r = 0.65$, $P = 0.0054$, Figure 5B). Bcl-2/Bax proteins ratio was also correlated with 5-FU sensitivity ($r = 0.88$, $P = 0.0097$, Figure 5C).

DISCUSSION

Among the six human cancer cell lines selected and exhibiting a wide range of sensitivity to 5-FU, CAL51 and KB cell lines displayed wild-type p53 profile: wild-type gene and undetectable basal protein expression, three out of six cell lines showed point mutations of p53 gene and constitutive p53 protein expression. PANC3 cell line displayed internal gene deletion resulting in complete lack of p53 mRNA and protein expression. Wt p53 cell lines were more sensitive to 5-FU than mutated lines. Our results

support the concept that cells carrying wt gene tend to be sensitive to 5-FU and that deletion of p53 function results in resistance. In the present experiments, 5-FU induced an increase in p53 mRNA expression in mutant-type cell lines and in HPV-positive wild-type cell lines, whereas in CAL51 wild-type p53 cell line, a significant decrease in p53 gene expression was observed (0.7-fold, $P = 0.02$). These results are in agreement with those reported by Palmer et al (1997). Cellular mechanisms able to regulate wt p53 function include post-translational stabilization (Kastan et al, 1991), nuclear exclusion or cytoplasmic sequestration (Moll et al, 1996), negative feedback inhibition of p53 mRNA translation by p53 protein itself (Mosner et al, 1995), binding of p53 by proteins such as mdm2 (Momand et al, 1992) or HPV E6 (Crook et al, 1991). Moreover, regulation of p53 protein could also implicate the changes in the p53 gene transcription such as p53 mRNA half-life modification or CpG nucleotides methylation (Kren et al, 1996). Conversely, regulation of mutated p53 levels after drug treatment consisted in an increase in translation process (Nabeya et al, 1995). In the present study, 5-FU exposure was found to induce an increase in p53 mRNA and protein expression in mutated cell lines. As currently accepted, biosynthesis of wild-type p53 can be controlled by both transcriptional (Deffie et al, 1993; Hudson et al, 1995) and translational (Mosner et al, 1995; Ewen and Miller, 1996; Fu et al, 1996) regulation processes. Our results are consistent with Nabeya et al (1995), demonstrating that an increase in wild-type p53 protein levels was mainly due to post-translational stabilization. Nevertheless, despite p53 wild-type status in KB line, p53 protein was not up-regulated and remained undetectable after exposure to 5-FU. In fact, KB cell line was described as containing HPV-18 sequences (Boshart et al, 1984). HPV E6 protein was shown to actively stimulate the degradation of bound p53 through ubiquitin-dependent proteolysis (Scheffner et al, 1990; Crook et al, 1991; Huibregtse et al, 1993) and HPV E7 protein could also inhibit p53 transcriptional activity by binding p53 in presence of TATA box-binding protein (Massimi and Banks, 1997). Consequently, cell lines containing HPV-16 and HPV-18 oncogenic human papilloma virus should not display any up-regulation of p53 protein despite a wild-type status.

Whether p53 protein up-regulation observed could correspond to p53 transcriptional ability was tested through the induction of mdm2 and p21 transactivation. Mdm2 gene possesses a p53-responsive element (mdm2-p53RE) (Barak et al, 1994; Zauberman

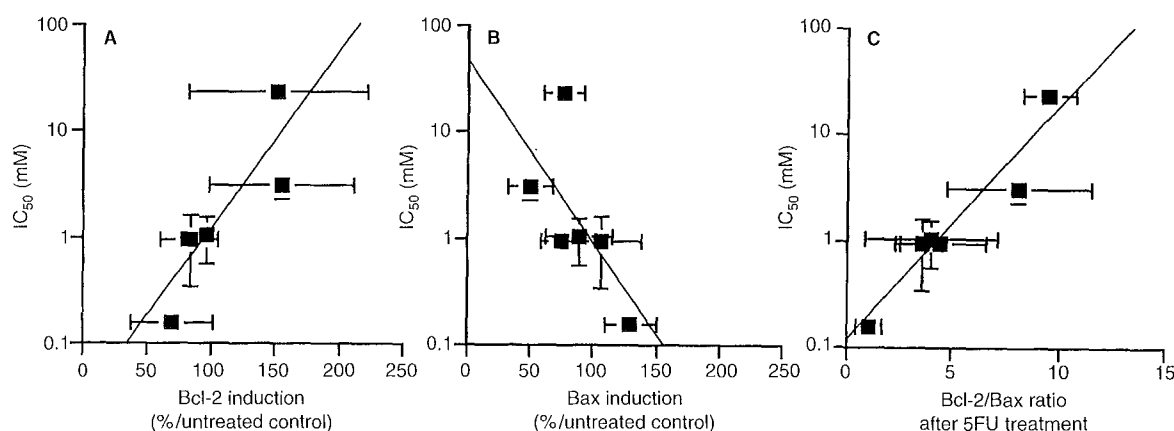


Figure 5 Relationship between 5-FU sensitivity and (A) Bcl-2 protein induction ($r = 0.47$, $P = 0.0323$), (B) bax protein induction ($r = 0.65$, $P = 0.0054$) and (C) between Bcl-2/Bax protein ratio ($r = 0.88$, $P = 0.0097$), after exposure to 5-FU

et al, 1995), moreover p53 and mdm2 proteins constitute an autoregulatory feedback loop in which p53 activity is self-limited through mdm2 production (Kubbutat et al, 1997). Wild-type cell lines (CAL51 and KB) showed a marked increase in mdm2 transcript corresponding to mdm2-p53RE and no up-regulation was detected when p53 gene was mutated or deleted, except for FaDu. Mutant p53 was previously demonstrated to be able to bind mdm2-p53RE, according to the nature and position of the amino-acid substitution (Gorgoulis et al, 1998). O'Connor et al (1993) also demonstrated induction of mdm2 mRNA for three mutant p53 lines, which exhibited alteration of codon 248 as observed in FaDu cell line. This mutation was classified as 'contact mutant', since residue 248 is directly involved in p53 DNA-binding, and then reduced the affinity of p53 for its consensus sites by removing critical contact with DNA (Cho et al, 1994; Arrowsmith and Morin, 1996) without changing p53 conformation (Ory et al, 1994). p21 mRNA basal expression was reduced in p53 mutated cell lines in agreement with Elbendary et al (1996). Relationship could be evidenced between p21 basal expression and p53 status. p21 mRNA overexpression was still detected in all cell lines independently of p53 status, suggesting that p21 could be up-regulated by other pathways (Macleod et al, 1995; Loignon et al, 1997; Wouters et al, 1999). In all cell lines after 5-FU exposure p21 induction, mediated or not by p53, results in G1 arrest (el-Deiry et al, 1993; 1994). However, G1 accumulation was statistically significant only for CAL51, KB, and FaDu lines, which exhibited p53 transcriptional functionality leading to G1 arrest, which should be more related to p53 functionality than p53 status.

Since Bax was identified as a p53 early-response gene (Selvakumaran et al, 1994), and a unique p53-regulated gene which induced apoptosis (Zhan et al, 1994), and Bcl-2 as an apoptosis antagonist (Oltvai et al, 1993; Reed, 1994), levels of Bax and Bcl-2 were analysed in cell lines after exposure to 5-FU equitoxic concentrations. Bcl-2 family proteins were demonstrated to be important apoptosis regulators after 5-FU treatment (Koshiji et al, 1997; Nita et al, 1998a). Likewise, CAL51 cell line displayed a significant increase in Bax, as well as a significant decrease in Bcl-2 protein expression. All p53 mutant cell lines displayed either no modification of Bax and Bcl-2 protein expression (CAL33 and FaDu), or a significant decrease in Bax as well as an increase in Bcl-2 protein expression (CAL27 and PANC3) after 5-FU exposure. Our results also showed that HPV-18 positive KB cell line, in which p53 was not up-regulated, displayed no Bax protein up-regulation, but Bcl-2 down regulation. 5-FU-resistant cell lines (CAL27 et PANC3) showed an increase in Bcl-2 protein expression reported to protect the cells against thymidylate synthase inhibitor (Fisher et al, 1993), as well as other anticancer drugs (Reed, 1994). Bcl-2 and Bax induction significantly correlates with 5-FU sensitivity and whatever p53 status, Bcl-2 to Bax relative expression ratio was also correlated with 5-FU sensitivity.

In vitro, 5-FU sensitivity was related to different mechanisms (Pinedo and Peters, 1988; Spears et al, 1988; Zhang et al, 1992; Peters et al, 1995). Although each of the mechanisms have been well documented, their relative contribution to the development of clinical drug resistance remains uncertain. However, there is a growing body of evidence to suggest that sensitivity to the cytotoxic effects of fluoropyrimidines may be mediated via TS and DPD process (Peters et al, 1995). Although TS and DPD have demonstrated potential prognostic significance, their prognostic values are still controversial (Beck et al, 1994; Nita et al, 1998b; Etienne et al, 1999; Kirihaara et al, 1999). More recently, Bcl-2

family proteins were implicated in chemotherapy-induced cell death (Simonian et al, 1997) and previous results suggest that some members of the Bcl-2 family of proteins, in human colon cancer cell lines, are modulated by 5-FU, and that the ratio of Bcl-X(L) to Bax may be related to chemosensitivity to 5-FU (Nita et al, 1998a).

In conclusion, for cell cycle control, p53 functionality appeared to be more essential than mutational status. Moreover, whatever p53 status or functionality, 5-FU sensitivity was related to Bcl-2 family proteins expression and Bcl-2/Bax ratio could be a relevant marker to predict 5-FU treatment response.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was performed within the framework of the 'Pôle Européen de Santé Région Lorraine Communauté Urbaine du Grand Nancy' and was supported by the French 'Ligue contre le Cancer'.

REFERENCES

- Aguilar Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H and Jondal M (1996) Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *Int J Cancer* **69**: 114–119
- Ara S, Lee PS, Hansen MF and Saya H (1990) Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res* **18**: 4961
- Arrowsmith CH and Morin P (1996) New insights into p53 function from structural studies. *Oncogene* **12**: 1379–1385
- Barak Y, Juven T, Haffner R and Oren M (1993) mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* **12**: 461–468
- Barak Y, Gottlieb E, Juven Gershon T and Oren M (1994) Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* **8**: 1739–1749
- Barberi-Heyob M, Griffon G, Merlin JL and Weber B (1993) Sequence-dependent growth-inhibitory effects of the in vitro combination of fluorouracil, cisplatin and dipyrindamole. *Cancer Chemother Pharmacol* **33**: 163–170
- Beck A, Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Renee N and Milano G (1994) A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* **30a**: 1517–1522
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W and zur Hausen H (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* **3**: 1151–1157
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD and Pavletich NP (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor – DNA complex: understanding tumorigenic mutations [see comments]. *Science* **265**: 346–355
- Chou TC and Talalay P (1987) Application of the median-effect principle for the assessment of low dose risk of carcinogens and for the quantitation of synergism and antagonism of chemotherapeutic agents. In *New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy*, Harrap KR and Connors TA (eds) pp. 37–64. Academic Press: New York
- Crook T, Tidy JA and Vousden KH (1991) Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and transactivation. *Cell* **67**: 547–556
- Deffie A, Wu H, Reinke V and Lozano G (1993) The tumor suppressor p53 regulates its own transcription. *Mol Cell Biol* **13**: 3415–3423
- Dou QP, An B and Will PL (1995) Induction of a retinoblastoma phosphatase activity by anticancer drugs accompanies p53-independent G1 arrest and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9019–9023
- Elbendary AA, Cirisano FD, Evans AC, Jr., Davis PL, Iglehart JD, Marks JR and Berchuck A (1996) Relationship between p21 expression and mutation of the p53 tumor suppressor gene in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Clin Cancer Res* **2**: 1571–1575
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817–825
- el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE and Wang Y (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**: 1169–1174

- Etienne MC, Pivot X, Formento JL, Bensadoun RJ, Formento P, Dassonville O, Francoual M, Poissonnet G, Fontana X, Schneider M, Demard F and Milano G (1999) A multifactorial approach including tumoural epidermal growth factor receptor, p53, thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase to predict treatment outcome in head and neck cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Br J Cancer* **79**: 1864–1869
- Ewen ME and Miller SJ (1996) p53 and translational control. *Biochim Biophys Acta* **1242**: 181–184
- Fisher TC, Milner AE, Gregory CD, Jackman AL, Aherne GW, Hartley JA, Dive C and Hickman JA (1993) bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res* **53**: 3321–3326
- Fu L, Minden MD and Benchimol S (1996) Translational regulation of human p53 gene expression. *EMBO J* **15**: 4392–4401
- Gorgoulis VG, Zacharatos PV, Manolis E, Ikonopoulos JA, Damalas A, Lamprinosopoulos C, Rassidakis GZ, Zoumpourlis V, Kotsinas A, Rassidakis AN, Halazonetis TD and Kitis C (1998) Effects of p53 mutants derived from lung carcinomas on the p53-responsive element (p53RE) of the MDM2 gene. *Br J Cancer* **77**: 374–384
- Guillouf C, Grana X, Selvakumaran M, De Luca A, Giordano A, Hoffman B and Liebermann DA (1995) Dissection of the genetic programs of p53-mediated G1 growth arrest and apoptosis: blocking p53-induced apoptosis unmasks G1 arrest. *Blood* **85**: 2691–2698
- Gussow D, Rein R, Ginjaar I, Hochstenbach F, Seemann G, Kottman A and Ploegh HL (1987) The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol* **139**: 3132–3138
- Harris CC (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* **88**: 1442–1455
- Hudson JM, Frade R and Bar Eli M (1995) Wild-type p53 regulates its own transcription in a cell-type specific manner. *DNA Cell Biol* **14**: 759–766
- Huibregtse JM, Scheffner M and Howley PM (1993) Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* **13**: 775–784
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **51**: 6304–6311
- Kiriha Y, Yamamoto W, Toge T and Nishiyama M (1999) Dihydropyrimidine dehydrogenase, multidrug resistance-associated protein, and thymidylate synthase gene expression levels can predict 5-fluorouracil resistance in human gastrointestinal cancer cells. *Int J Oncol* **14**: 551–556
- Koshiji M, Adachi Y, Taketani S, Takeuchi K, Hioki K and Ikehara S (1997) Mechanisms underlying apoptosis induced by combination of 5-fluorouracil and interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 376–381
- Kren BT, Trembley JH and Steer CJ (1996) Alterations in mRNA stability during rat liver regeneration. *Am J Physiol* **270**: G763–777
- Kubutat MH, Jones SN and Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**: 299–303
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV and Kastan MB (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7491–7495
- Loignon M, Fetsi R, Gordon AJ and Drobetsky EA (1997) A p53-independent pathway for induction of p21 waf1/cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res* **57**: 3390–3394
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T and Housman DE (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**: 957–967
- Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B and Jacks T (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* **9**: 935–944
- Massimi P and Banks L (1997) Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 proteins. *Virology* **227**: 255–259
- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J and Crawford LV (1987) Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* **7**: 961–963
- Moll UM, Ostermeyer AG, Haladay R, Winkfield B, Frazier M and Zambetti G (1996) Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol Cell Biol* **16**: 1126–1137
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D and Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**: 1237–1245
- Mosner J, Mummembrauer T, Bauer C, Sczakiel G, Grosse F and Deppert W (1995) Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J* **14**: 4442–4449
- Nabeya Y, Loganzo F, Jr., Maslak P, Lai L, de Oliveira AR, Schwartz GK, Blundell ML, Altorki NK, Kelsen DP and Albino AP (1995) The mutational status of p53 protein in gastric and esophageal adenocarcinoma cell lines predicts sensitivity to chemotherapeutic agents. *Int J Cancer* **64**: 37–46
- Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, Fu CG, Takenoue T, Tsuruo T and Muto T (1998a) 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* **78**: 986–992
- Nita ME, Tominaga O, Nagawa H, Tsuruo T and Muto T (1998b) Dihydropyrimidine dehydrogenase but not thymidylate synthase expression is associated with resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* **45**: 2117–2122
- O'Connor PM, Jackman J, Jondle D, Bhatia K, Magrath I and Kohn KW (1993) Role of the p53 tumor suppressor gene in cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Res* **53**: 4776–4780
- Oltvai ZN, Millman CL and Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609–619
- Oren M (1994) Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* **5**: 221–227
- Ory K, Legros Y, Auguin C and Soussi T (1994) Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J* **13**: 3496–3504
- Palmer DG, Paraskeva C and Williams AC (1997) Modulation of p53 expression in cultured colonic adenoma cell lines by the naturally occurring luminal factors butyrate and deoxycholate. *Int J Cancer* **73**: 702–706
- Peters GJ, van der Wilt CL, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, Johnston PG, van Groeningen CJ and Pinedo HM (1995) Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* **31A**: 1299–1305
- Pinedo HM and Peters GF (1988) Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* **6**: 1653–1664
- Reed JC (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* **124**: 1–6
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ and Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129–1136
- Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B and Liebermann D (1994) Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* **9**: 1791–1798
- Simonian PL, Grillot DA and Nunez G (1997) Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* **90**: 1208–1216
- Spears CP, Gustavsson BG, Berne M, Frösing R, Bernstein L and Hayes AA (1988) Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. *Cancer Res* **48**: 5894–5900
- Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F and Mowat M (1995) Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* **10**: 109–115
- Strobel T, Swanson L, Korsmeyer S and Cannistra SA (1996) BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14094–14099
- Vogelstein B and Kinzler KW (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* **70**: 523–526
- Wouters BG, Denko NC, Giaccia AJ and Brown JM (1999) A p53 and apoptotic-independent role for p21 waf1 in tumour response to radiation therapy. *Oncogene* **18**: 6540–6545
- Zauberman A, Flusberg D, Haupt Y, Barak Y and Oren M (1995) A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Res* **23**: 2584–2592
- Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Liebermann DA, O'Connor PM and Fornace AJ, Jr. (1994) Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis (published erratum appears in *Oncogene* 1995; **10**(6): 1259) *Oncogene* **9**: 3743–3751
- Zhang ZG, Harstrick A and Rustum YM (1992) Mechanisms of resistance to fluoropyrimidines. *Semin Oncol* **19**: 4–9

BIOLOGY CONTRIBUTION**CONSTITUTIVE NF- κ B ACTIVITY INFLUENCES BASAL APOPTOSIS AND RADIOSENSITIVITY OF HEAD-AND-NECK CARCINOMA CELL LINES**

C. DIDELOT, M.Sc.,* M. BARBERI-HEYOB, Ph.D.,* A. BIANCHI, M.Sc.,† P. BECUWE, Ph.D.,†
J.-F. MIRJOLET, Ph.D.,*‡ M. DAUÇA, Ph.D.,† AND J.-L. MERLIN, PHARM.D., Ph.D.*

*Laboratoire de Recherche en Oncologie, Centre Alexis Vautrin, Nancy, France; †Laboratoire de Biologie Cellulaire sur le Développement, Nancy, France; ‡IRIBHN, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

Purpose: Nuclear factor- κ B (NF- κ B) has been implicated in anti-apoptotic gene transactivation, according to its transcriptional activity. The present study was designed to investigate whether constitutive NF- κ B activity could modulate basal apoptosis and intrinsic radiosensitivity of KB head-and-neck carcinoma cell line and KB3 subline. The KB3 subline was more radiosensitive ($SF_2 = 0.48$, $\alpha = 0.064$) than the radioresistant KB parental cell line ($SF_2 = 0.80$, $\alpha = 0.114$).

Methods and Materials: Constitutive NF- κ B DNA-binding activity was determined using electrophoretic mobility shift assay. Modulation of NF- κ B activity was performed by exposing both cell lines to tumor necrosis factor α or dexamethasone. Apoptotic cell population was analyzed using flow cytometry (annexin V/propidium iodide). Radiosensitivity was assessed from determination of the surviving fraction at 2 Gy (SF_2), and α and β parameters were determined using the linear-quadratic model.

Results: Constitutive NF- κ B activity was found to be significantly lower in KB3 than in KB. KB cell line exposure to dexamethasone significantly decreased NF- κ B DNA-binding activity and, consequently, enhanced baseline apoptosis and radiosensitivity (α values: 0.114 vs. 0.052). Conversely, exposure of KB3 cells to tumor necrosis factor α increased NF- κ B DNA-binding activity and resulted in a significant decrease (50%) in rate of apoptosis and in radiosensitivity (SF_2 values: 0.48 vs. 0.63).

Conclusions: Modulation of NF- κ B DNA-binding activity influences baseline apoptosis and intrinsic radiosensitivity. © 2001 Elsevier Science Inc.

NF- κ B, Radiosensitivity, Basal apoptosis, Head-and-neck carcinoma cell lines.

INTRODUCTION

Cells submitted to ionizing radiation respond by activation of transcription factors such as AP1 or nuclear factor κ B (NF- κ B) (1–3); this leads to induction of specific genes and to protein synthesis (3), which could confer radiation resistance. Then, a high constitutive level of NF- κ B (4) might confer relatively high resistance to radiation therapy. To our knowledge, no study has explained whether NF- κ B activity could predict intrinsic radiosensitivity. However, Lezoualc'h *et al.* (5) have reported that the constitutive NF- κ B DNA-binding activity of neuronal cell cultures is related to cell sensitivity to oxidative stress, which is known to be implicated in response to radiotherapy.

NF- κ B is also known to be involved in molecular pathway of apoptosis (6, 7). In general, activation of NF- κ B has been reported to protect cells from apoptosis by inducing anti-apoptotic genes, such as TRAF, c-IAP, or P21 (6,

8–10). However, this was not always the case, and cells from patients with ataxia telangiectasia in which NF- κ B activation was observed were reported to undergo apoptosis after being exposed to radiation (11). Moreover, Levine *et al.* described that pretherapy apoptotic level of patients with cervical carcinoma was related to survival rate after radiotherapy (12).

Activation and regulation of NF- κ B are tightly controlled by I κ B, a NF- κ B cellular inhibitory protein. Normally, I κ B binds to NF- κ B, thereby preventing translocation of NF- κ B into nucleus. Some stimuli, including tumor necrosis factor alpha (TNF α) and ionizing radiation, result in degradation and disappearance of I κ B (13, 14). This process frees NF- κ B for translocation to the nucleus and activation of its target genetic programs (15). Thus, NF- κ B activation induces I κ B expression. New synthesis of I κ B causes retention of NF- κ B in the cytoplasm and attenuation of NF- κ B—

Reprint requests to: Muriel Barberi-Heyob, Ph.D., Laboratoire de Recherche en Oncologie, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, F-54511 Vandoeuvre-Lés-Nancy Cedex, France. Tel: 33 3 83 59 83 06; Fax: 33 3 83 44 76 35; E-mail: m.barberi@nancy.fnclcc.fr

Presented in New Orleans, LA, March 24–28, 2001 at the 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research

in a poster discussion session (targets for modulation of radiation response).

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer des Comités Lorrains.

Received Apr 30, 2001, and in revised form Aug 7, 2001.
Accepted for publication Aug 10, 2001.

mediated transcriptional activation and provides a feedback mechanism.

Because NF- κ B was activated in numerous cancers, it might confer intrinsic radioresistance. In this study, we investigated the effect of modulation of the NF- κ B DNA-binding activity on the intrinsic radiosensitivity of head-and-neck cell lines. We recently reported that the cellular radiosensitivity of head-and-neck carcinoma cell lines was related to baseline apoptosis (16). In the present study, we investigated whether modulation of constitutive NF- κ B activity by dexamethasone (DEX) and TNF α could modify the intrinsic radiosensitivity and the basal apoptosis of head-and-neck carcinoma cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France), and culture media and additives were obtained from Life Technologies (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France), except fetal calf serum, which was obtained from Costar (Dutscher, Brumath, France). Recombinant human TNF α was provided by RD Systems (Abingdon, UK). Antibodies against P50 and P65 were purchased from Santa Cruz (Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France). All other chemicals were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France).

Cell culture and treatment

KB head-and-neck carcinoma cell line was kindly provided by A. Hanauske (Munich University, Germany) as part of the EORTC Preclinical Therapeutic Models Group exchange program. The KB3 subline was derived from KB cells, as previously described (16). Both cell lines were grown in a 37°C, 5% CO₂ atmosphere in 75-cm² plastic issue culture flasks in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 i.u./mL), and streptomycin (100 μ g/mL).

Modulation of NF- κ B DNA-binding activity

KB and KB3 cell lines were seeded at 2.10⁴ cells/cm². Four days later, the cells were exposed to 1 μ M DEX for 14 h or 2.5 ng/mL TNF α for 10 min. After this treatment, the cells were cultured in drug-free medium for 14 h.

Electrophoretic mobility shift and supershift assays

Nuclear extracts from KB and KB3 cells exposed to TNF α or DEX were prepared as described previously (17), with the following modifications. The nuclei were resuspended in 20 mM HEPES, pH 7.9, containing 450 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.15 mM MgCl₂, 25% (v/v) glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl sulfonide, then homogenized in Dounce Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) and incubated for 30 min at 4°C after addition of 0.25% (v/v) Nonidet P-40. Nuclear extracts were cleared by centrifugation for 30 min at 4°C at 17,000 g, and the resulting supernatants were supplemented with KCl (0.1 M) and

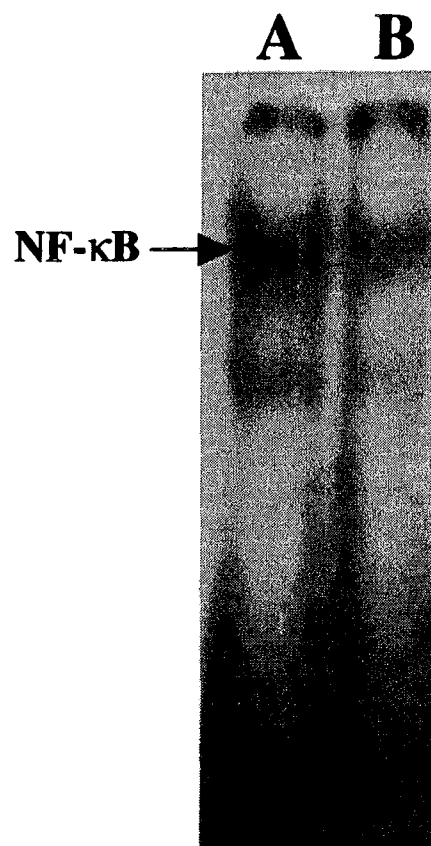


Fig. 1. Constitutive DNA-binding activity of NF- κ B in KB and KB3 cells. Nuclear extracts (5 μ g) from (A) KB and (B) KB3 were incubated with radiolabeled NF- κ B binding site. The DNA/NF- κ B complex was analyzed in native polyacrylamide gels. This picture was representative of three independent experiments.

immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C until used for electrophoretic mobility shift assay and supershift assay.

Nuclear protein concentration was determined according to Lowry *et al.* (18) using bovine serum albumin as standard, with two dilutions for each sample (1/10^e and 1/20^e) and two determinations for each dilution. The mean of these four concentrations was determined, and extracts were used only if the standard deviation (SD) was less than 10%.

Distinct oligonucleotides containing complementary sequences at their 3' termini and binding motifs for NF- κ B were annealed and the protruding single-stranded regions filled in with (α -³²P) dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) using Klenow fragment of DNA polymerase I (Promega, Charbonnières, France). The sequences of the oligonucleotides used were as follows: 5'-AGTTGAGGG-GACTTT-3'; 3'-CCCTGAAAGGGTCCG-5'.

The binding reaction mixture (10 μ L) for gel retardation assays contained 1 ng of DNA probe, 2 μ g poly'dI-dC, and 5 μ g of the different nuclear protein extracts. The mixture was incubated for 30 min at 4°C. The DNA protein complexes were resolved in native 5% polyacrylamide gels in 0.5 X Tris-borate ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at 100 V for 45 min. The dried gels were exposed to Trimax

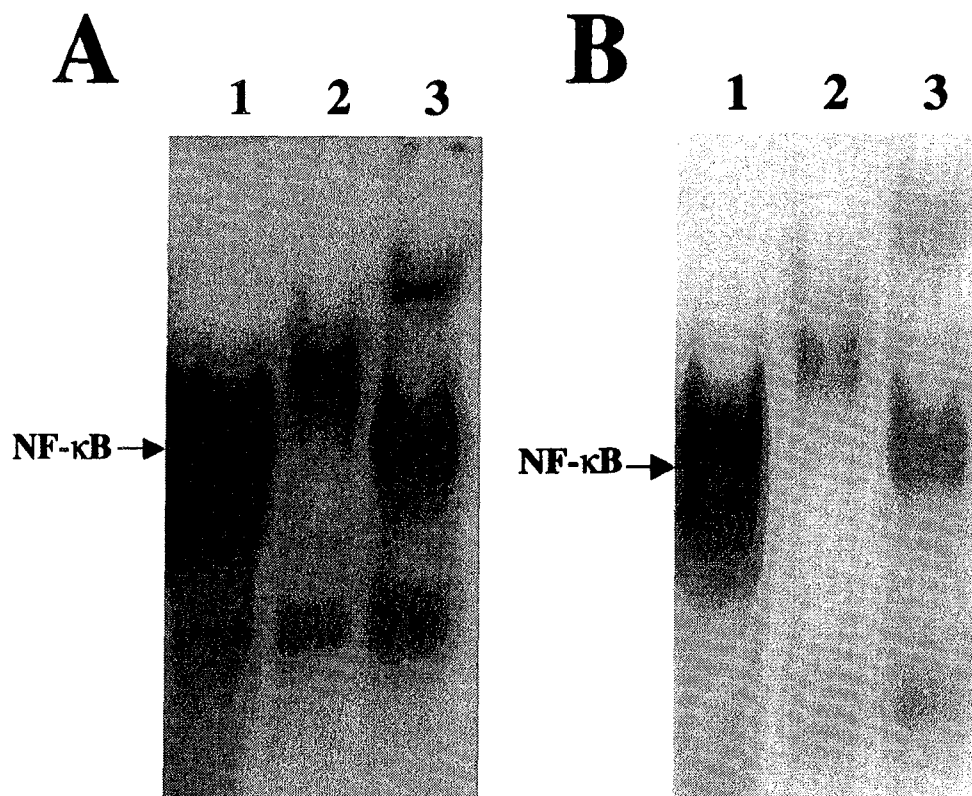


Fig. 2. Analysis of components in the NF- κ B complex by supershift experiments. Nuclear extracts (5 μ g) prepared from (A) KB or (B) KB3 untreated cells were incubated with antibodies raised against (2) P50 or (3) P65 or (1) without antibody, before the addition of the radiolabeled NF- κ B binding site. Reaction mixture was resolved in native polyacrylamide gels. These pictures were representative of three independent experiments.

XM (Kodak) film overnight at -80°C . To test the specificity of the binding, competition studies were performed in the presence of a 100-fold molar excess of the specific unlabeled probe before the addition of 1 ng of the radiolabeled probe. Supershift assays were carried out with 1 μ g of antibodies raised against either P50 or P65 (Santa Cruz, Tebu, France) incubated for 15 min at room temperature with nuclear proteins before the addition of the labeled probe.

Detection of apoptosis

Cells were seeded at 2.10^4 cells/mL in 75-cm² plastic tissue culture flasks. Four days later, cells were incubated in 5 mM EDTA for 5 min and washed with phosphate-buffered saline. 10^5 cells were incubated with 100 μ L of 1X binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂), 5 μ L annexin V-FITC (PharMingen, Becton Dickinson), and 2 μ L propidium iodide (50 μ g/mL). After 15 min at 4°C in the dark, cells were suspended in 400 μ L of binding buffer and analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson) using Cell Quest software (Becton Dickinson).

Radiosensitivity

The radiosensitivity of each cell line was determined by using soft agar clonogenic assays according to the method described by Griffon Etienne *et al.* (19). Briefly, cells were

trypsinized, harvested, and seeded in 0.3% soft agar (Bacto Agar, Difco, Detroit, MI) at 2.10^3 and 3.10^3 cells/well for the KB and KB3 cell line, respectively. After 1 h incubation, cells were irradiated (0.5–10 Gy) using Theratron 780c ⁶⁰Co unit (Theratronics, Ottawa, Canada). After 14 days of incubation, the colonies were semi-automatically counted using image analysis (Inspector, Matrox, Canada). Only colonies with a mean diameter above 50 μ m were counted. The results were normalized to unirradiated controls. The experimental dose-response curves were fitted using the linear-quadratic model, ($S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$) and the radiosensitivity parameters α , β , and SF_2 (surviving fraction at 2 Gy) were calculated according to Thames *et al.* (20). Data shown resulted from a minimum of three independent experiments.

Statistical analysis

Data are mean values $\pm$ (SD), calculated from at least three independent experiments. Comparisons were made using the Mann-Whitney U test. Statistical significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Constitutive NF- κ B DNA-binding activity and modulation by dexamethasone or TNF α

Nuclear NF- κ B DNA-binding activity was investigated in untreated KB and KB3 cells. Figure 1 shows that NF- κ B

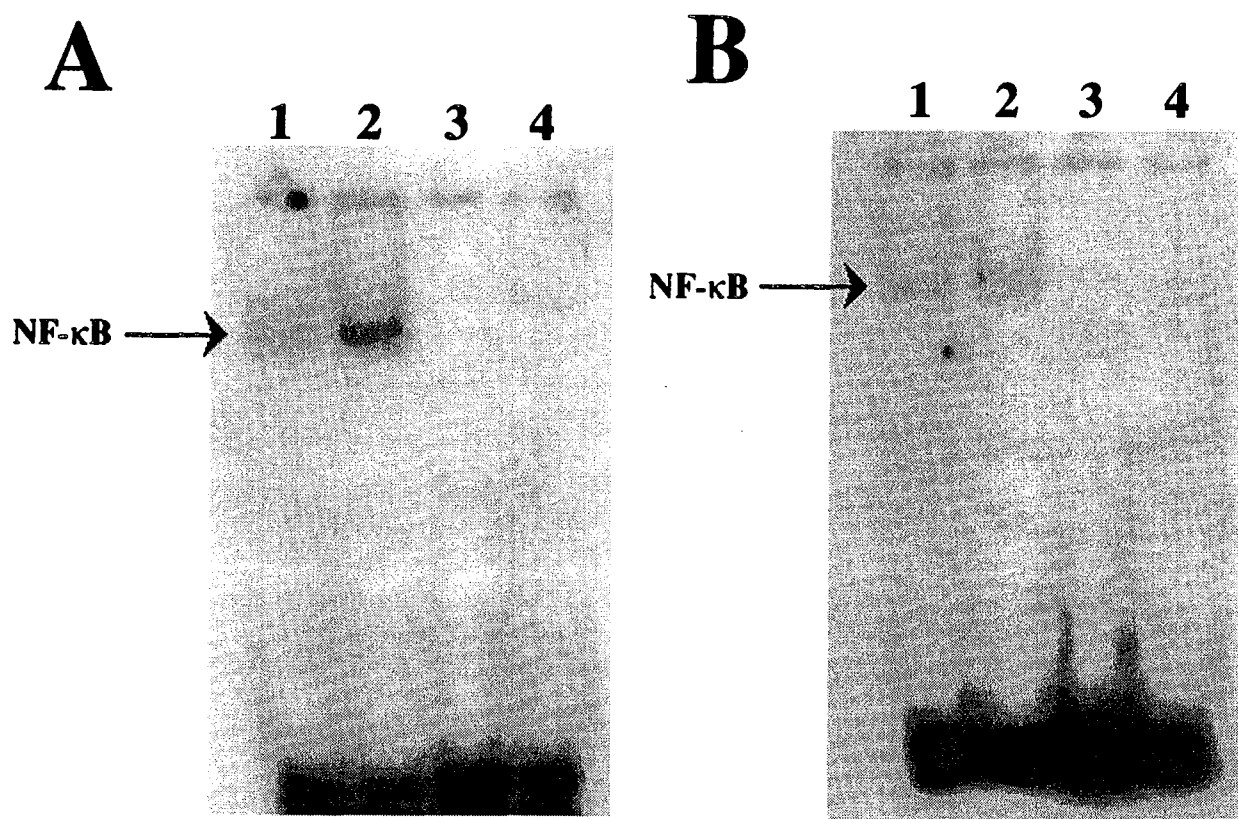


Fig. 3. Modulation of the DNA-binding activity of NF- κ B in (A) KB and (B) KB3 cells by exposure to (2) TNF α or (4) DEX and compared with (1) untreated cells. Nuclear extracts (5 μ g) from KB and KB3 cells exposed to 10 μ M DEX or 2.5 ng/mL TNF α were incubated with the radiolabeled NF- κ B binding site. The DNA/NF- κ B complex was analyzed in native polyacrylamide gels. A competition was carried out with 100-fold molar excess of unlabeled NF- κ B binding site, which was also shown (3) using sample with TNF α treatment. These pictures were representative of three independent experiments.

nuclear activity was higher in the KB cell line than in the KB3 line. For both cell lines, NF- κ B protein complex was characterized as P50/P65 heterodimer by supershift assay (Fig. 2).

KB and KB3 cells were exposed to DEX or TNF α at different concentrations (respectively, 1–10 μ M for 12–24 h and 2.5–10 ng/mL for 10 min to 1 h). Nuclear extracts were then prepared and assayed for NF- κ B DNA-binding activity. Only the most effective conditions using the lowest drug concentrations in each cell line were selected and subsequently used. Exposure of KB and KB3 cells to 10^{−6} M DEX for 24 h resulted in an almost complete inhibition of NF- κ B binding activity. Exposure to 2.5 ng/mL TNF α for 10 min led to significant increase in NF- κ B DNA-binding activity in KB and KB3 cell lines (Fig. 3).

Consequences of NF- κ B DNA-binding activity modulation on apoptosis level

In untreated cell lines, KB displayed a significantly lower apoptosis rate than KB3, with, respectively, 5% and 16% ($p < 0.05$). In the KB cell line (Fig. 4A), DEX exposure led to 1.6-fold apoptosis induction, and TNF α exposure did not lead to a significant effect on apoptosis

rate. In the KB3 cell line (Fig. 4B), DEX exposure led to a weak apoptosis induction, and TNF α exposure resulted in a significant decrease in apoptosis, reaching 50% for the KB3 cell line as compared to the untreated control.

Consequences of NF- κ B DNA-binding activity modulation on radiosensitivity parameters

To decrease the high constitutive NF- κ B DNA-binding activity, KB cells were exposed for 24 h to 10^{−6} M DEX. Conversely, KB3 cells were exposed to 2.5 ng/mL TNF α for 10 min, to increase the low constitutive NF- κ B binding activity. After modulation of constitutive NF- κ B DNA binding activity in each cell line, radiosensitivity parameters were calculated and compared to untreated controls. In the KB cell line (Fig. 5A), DEX exposure significantly decreased radioresistance at low doses from 0.5 to 2 Gy, with the α parameter decreasing from 0.114 to 0.052 (Table 1). At higher doses (greater than 3 Gy), DEX exposure induced an increase in radioresistance, with the β parameter increasing from 0.012 to 0.030 (Table 1). In the KB3 cell line (Fig. 5B), whatever the irradiation dose, TNF α exposure led to an increase in radioresistance. The SF_2 value increased 1.32-fold with TNF α pretreatment (Table 1).

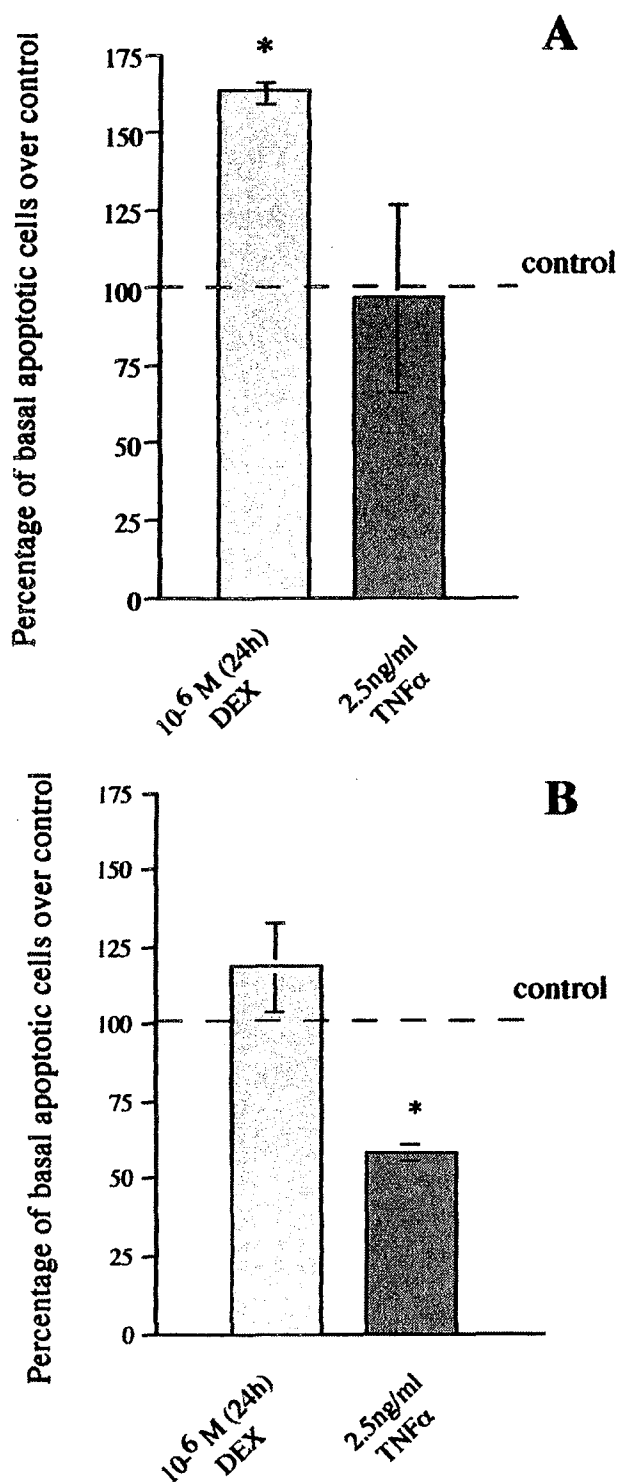


Fig. 4. Effect of pretreatment with DEX and TNF α on (A) KB and (B) KB3 cells on the basal apoptosis. Apoptotic cells were detected by annexin V assay. The results are expressed as relative variation in apoptotic cell fraction as compared to untreated controls (mean $\pm$ SD of three independent experiments). Statistically significant difference from the control was indicated, as * $p < 0.05$.

DISCUSSION

Several studies have recently demonstrated that NF- κ B is involved in cellular response to ionizing radiation (1–3) and in the molecular pathway of apoptosis (6, 7).

Some reports showed that inhibition of NF- κ B activity in surviving cells failed to alter the intrinsic radiosensitivity (4), showing that the radioactivation of NF- κ B does not determine the intrinsic radiosensitivity. To our knowledge, no study has investigated the impact of constitutive NF- κ B DNA-binding activity on basal apoptosis rate and on intrinsic radiosensitivity of tumor cells, as reported in neuronal cell cultures (5) submitted to oxidative stress.

In this study, implication of constitutive NF- κ B activity was investigated on basal apoptosis and intrinsic radiosensitivity of KB and KB3, which were, respectively, a radio-resistant head-and-neck human cancer cell line ($SF_2 = 0.799$, $\alpha = 0.114$) and a subline found to be more radiosensitive ($SF_2 = 0.48$, $\alpha = 0.064$).

Constitutive NF- κ B DNA-binding activity was found to be significantly lower in KB3 than in KB. In two cell lines, the NF- κ B complex has been characterized as a P50/P65 heterodimer, which was known to induce transcription of target genes (15).

In regard to the anti-apoptotic function of NF- κ B (6), the difference in constitutive DNA-binding activity observed between KB and KB3 could directly influence basal apoptosis rate, which was 5% in the KB cell line and 16% in the KB3 cell line. To modulate the constitutive NF- κ B DNA-binding activity, we used DEX exposure to decrease this activity (21) and TNF α exposure to increase this activity (22). We demonstrated that KB cell line exposure to DEX enhanced baseline apoptosis by more than 60%. TNF α exposure did not lead to significant decrease in apoptotic rate. In fact, it is obviously difficult to decrease the low apoptosis rate of the KB cell line (5%). Exposure of the KB3 cell line to TNF α demonstrated the lowest constitutive NF- κ B DNA-binding activity and the highest basal apoptosis, triggering a significant apoptotic fraction decrease (50%). These results highlight a relation between NF- κ B activation and the anti-apoptotic effect observed, as reported already in several studies demonstrating the NF- κ B suppresses TNF α -induced apoptosis (8, 23). Anti-apoptotic activities of NF- κ B were observed after some pro-apoptotic stimuli, such as exposure to cytokine TNF α , ionizing radiation, and the chemotherapeutic cancer agent daunorubicin. This protective effect of NF- κ B on TNF α -induced apoptosis was also reported in tumor-bearing mice (24). Moreover, several reports indicated that NF- κ B constitutive activity in cancer cells, as well as NF- κ B activation by TNF α , could protect cells against apoptosis and would therefore favor cancer cell survival, probably by controlling the expression of apoptosis inhibitors (8, 23, 25). In fact, NF- κ B inhibition prevents its activation after TNF α or cytotoxic drug treatment without affecting cell survival (26). The signals elicited by the respective death inducers seem to determine whether NF- κ B induction leads to apoptosis or cell survival. In our case, TNF α exposure did not induce cell death, but significantly decreased the apoptotic cell fraction for KB3, suggesting

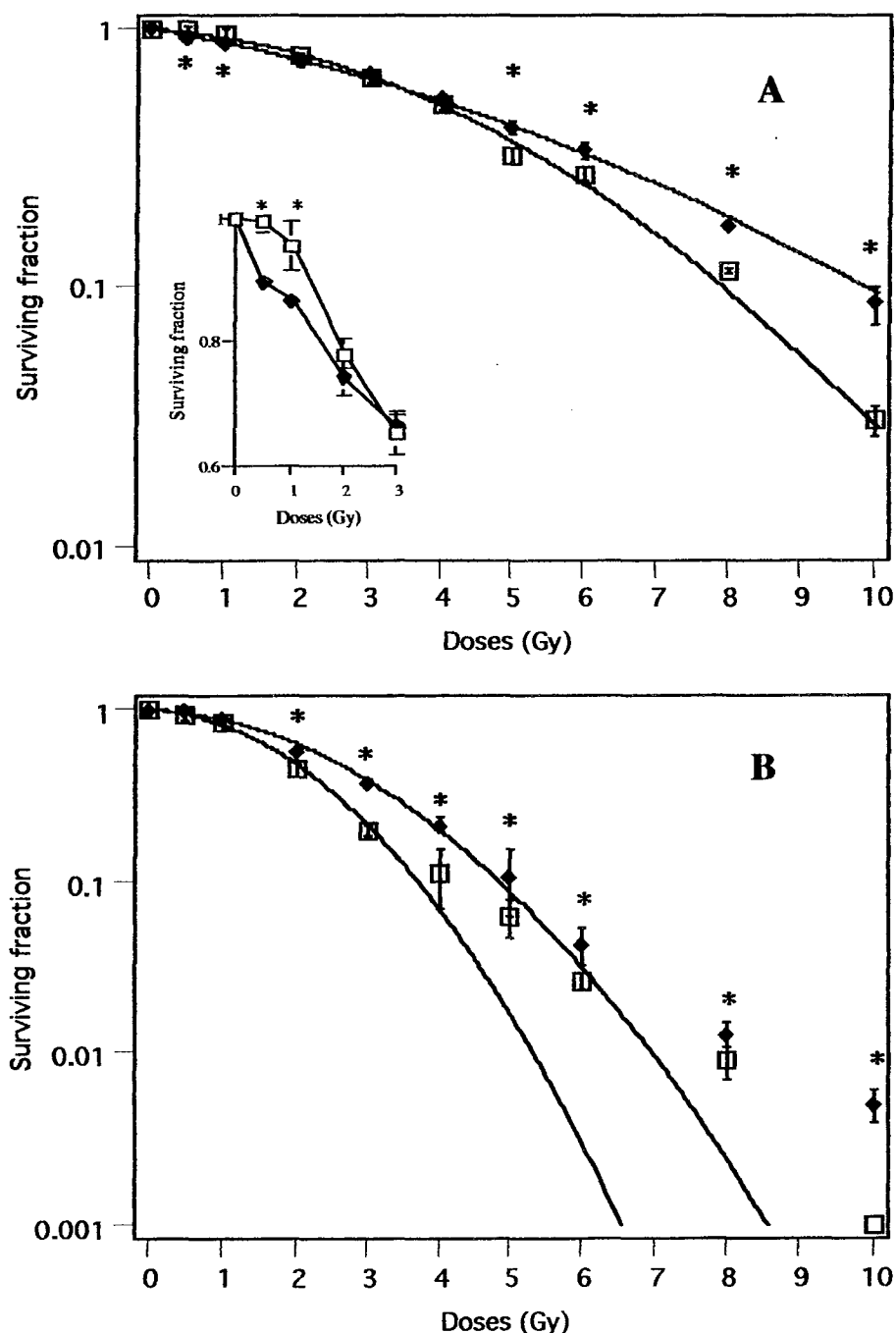


Fig. 5. Radiosensitivity curve of (A) KB and (B) KB3 head-and-neck cancer cell lines with (◆) or without pretreatment (□) with DEX or TNF α . In the KB cell line, DEX significantly decreased the radioresistance (α values: 0.114 vs. 0.052) at low doses (<3 Gy). In the KB3 cell line, TNF α exposure led to an increase in radioresistance (SF_2 : 0.480 vs. 0.632).

that the role of NF- κ B in apoptosis could be related to its effects on anti-apoptotic gene expression (27).

To determine whether constitutive NF- κ B activity could predict KB and KB3 intrinsic radiosensitivity, we investigated radiosensitivity level in the presence of NF- κ B modulators. In the KB cell line, inhibition of NF- κ B activity by DEX led to a significant increase in the α radiosensitivity parameter ($p < 0.05$) that was related to an increase in radiosensitivity to low irradiation doses. Pajonk *et al.* (4) have not observed a decrease in radiosensitivity after inhi-

bition by transfection of altered I κ B, which cannot be phosphorylated. In contrast to this study, DEX exposure inhibited only the constitutive NF- κ B activity when mutated I κ B inhibits both constitutive activity and radioactivation of NF- κ B (3, 4).

However, with higher radiation doses (greater than 3 Gy), KB cell line with DEX pretreatment underwent an inverse effect, with a significant decrease in the β parameter ($p < 0.05$). This opposite effect could be explained by a DEX action via an independent NF- κ B

Table 1. Radiosensitivity parameters (SF_2 , α , and β) calculated using the linear-quadratic model in KB and KB3 cell lines exposed to dexamethasone (DEX, 10^{-6} M, 24 h) or TNF α (2.5 ng/mL, 10 min)

	Cell lines			
	KB		KB3	
	Control	DEX	Control	TNF α
SF_2^*	0.799 [†]	0.758	0.480	0.632
α	0.052	0.114	0.064	0.054
β	0.030	0.012	0.151	0.087

* Surviving fraction at 2 Gy.

[†] Mean values of three independent experiments.

Note: Standard deviations were less than 15%.

pathway. A similar observation has been described already in Hodgkin's lymphoma cells, which were protected from irradiation without a decrease in NF- κ B activity in the presence of DEX (28).

This study demonstrates that the constitutive NF- κ B level influences the intrinsic radiosensitivity of the KB and KB3 cell lines. Moreover, if our work does not formally involve anti-apoptotic activities of NF- κ B in resistance to radiotherapy, it certainly indicates that this transcription factor plays a central role in basal intrinsic radiosensitivity and could protect cells against apoptosis, probably by controlling the expression of apoptosis inhibitors. Modulation of this basal level could be recommended before ionizing radiation exposure to increase radiotherapy response.

REFERENCES

- Wilson RE, Taylor SL, Atherton GT, *et al*. Early response gene signalling cascades activated by ionising radiation in primary human B cells. *Oncogene* 1993;8:3229–3237.
- Mohan N, Meltz ML. Induction of nuclear factor kappa B after low-dose ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway. *Radiat Res* 1994;140:97–104.
- Yamagishi N, Miyakoshi J, Takebe H. Enhanced radiosensitivity by inhibition of nuclear factor kappa B activation in human malignant glioma cells. *Int J Radiat Biol* 1997;72:157–162.
- Pajonk F, Pajonk K, McBride WH. Inhibition of NF-kappaB, clonogenicity, and radiosensitivity of human cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1956–1960.
- Lezoualc'h F, Sagara Y, Holsboer F, *et al*. High constitutive NF-kappaB activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells. *J Neurosci* 1998;18:3224–3232.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, *et al*. NF-kappaB anti-apoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680–1693.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, *et al*. The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* 2000;267:3828–3835.
- Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996;274:782–784.
- Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K *et al*. Resistance to Fas-mediated apoptosis: Activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 1998;17:931–939.
- Javelaud D, Wietzerbin J, Delattre O, *et al*. Induction of p21Waf1/Cip1 by TNFalpha requires NF-kappaB activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene* 2000;19:61–68.
- Jung M, Zhang Y, Lee S, *et al*. Correction of radiation sensitivity in ataxia telangiectasia cells by a truncated I kappa B-alpha. *Science* 1995;268:1619–1621.
- Levine EL, Davidson SE, Roberts SA *et al*. Apoptosis as predictor of response to radiotherapy in cervical carcinoma [letter]. *Lancet* 1994;344:472.
- Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, *et al*. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10599–10603.
- Scherer DC, Brockman JA, Chen Z, *et al*. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11259–11263.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: Ten years after. *Cell* 1996;87:13–20.
- Didelot C, Mirjolet JF, Barberi-Heyob M *et al*. Influence of S-phase duration on G2 arrest-mediated apoptosis induction by radiations in cell lines expressing different level of sensitivity to 5-fluorouracil (5FU). *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2000;41:785.
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983;11:1475–1489.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AR, *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
- Griffon Etienne G, Merlin JL, Marchal C. In vitro evaluation of Taxol combined with radiations in human squamous cell carcinoma spheroids. *Cancer Lett* 1996;109:23–32.
- Thames HD, Jr., Rozell ME, Tucker SL, *et al*. Direct analysis of quantal radiation response data. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1986;49:999–1009.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, *et al*. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995;270:286–290.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, *et al*. IKK-1 and IKK-2: Cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 1997;278:860–866.
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, *et al*. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996;274:787–789.
- Wang CY, Cusack JC, Jr., Liu R *et al*. Control of inducible chemoresistance: Enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 1999;5:412–417.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, *et al*. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 1996;87:565–576.
- Bentires-Alj M, Hellin AC, Ameyar M, *et al*. Stable inhibition of nuclear factor kappaB in cancer cells does not increase sensitivity to cytotoxic drugs. *Cancer Res* 1999;59:811–815.
- Zong WX, Edelstein LC, Chen C *et al*. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:382–387.
- Pajonk F, Pajonk K, McBride WH. Apoptosis and radiosensitization of hodgkin cells by proteasome inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:1025–1032.

G₁/S but not G₀/G₁ Cell Fraction Is Related to 5-Fluorouracil Cytotoxicity

J.-F. Mirjolet, C. Didelot, M. Barberi-Heyob,* and J.-L. Merlin

Centre Alexis Vautrin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, Vandœuvre-les-Nancy, France

Received 21 September 2000; Revision Received 4 September 2001; Accepted 20 September 2001

Background: Bromodeoxyuridine (BrdU) cell cycle analysis using flow cytometry is of clinical interest for making treatment decisions or for predicting response and survival, through proliferation rate (labeling index or S-phase fraction) assessment or T_{pot} calculation. Thymidylate synthase expression was tested in vitro, in vivo, and clinically as a prognostic factor for 5-fluorouracil (5FU) sensitivity. However, results were still controversial. Moreover, we had reported that 5FU sensitivity was related to the labeling index of untreated cell cultures.

Methods: We used six human cancer cell lines that exhibited a wide range of 5FU sensitivity. Cell cycle analysis was performed using flow cytometry monovariate propidium iodide (PI) analysis and bivariate distributions of BrdU incorporation versus DNA content. 5FU sensitivity was assayed using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay.

Results: In all cell lines, 5FU exposure resulted in a statistically significant G₁/S accumulation. No statistically significant relationship was seen between G₀/G₁ delay determined by monovariate analysis and 5FU sensitivity. However, 5FU sensitivity was statistically correlated to the labeling index and G₁/S subpopulation assessed with bivariate analysis using BrdU incorporation versus DNA content.

Conclusions: Cellular proliferation parameters using BrdU incorporation are more informative than PI for in vitro 5FU sensitivity. Because BrdU incorporation could be assessed clinically, it could also be informative for 5FU clinical response prediction. Cytometry 48:6–13, 2002. © 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key terms: 5FU sensitivity; cell cycle; G₁/S delay; labeling index; bromodeoxyuridine; flow cytometry

5-fluorouracil (5FU) resistance has been studied extensively. Many mechanisms have been implicated, such as pharmacokinetic resistance, decreased accumulation of activated metabolites, and altered effects on thymidylate synthase (TS; 1,2). Cell cycle disturbance and apoptosis induction also result in 5FU resistance (3–7). TS protein or mRNA expression predictive value was tested clinically in many tumoral pathologies (8–11). However, although the prognostic value of TS was accepted in colorectal tumors, its significance remains debated (9,12–14). In head and neck pathologies, TS expression was unrelated to 5FU treatment outcome (15,16). Other parameters were tested to predict 5FU response, but none were universally used or accepted (15,17). More recently, cell cycle parameters (18) and apoptosis-related factors were implicated in the 5FU response (19,20).

The study of human tumor proliferation has been facilitated by the development of monoclonal antibodies (mAbs) that recognize halogenated pyrimidines, such as iododeoxyuridine (IdU) or bromodeoxyuridine (BrdU), followed by cytometric analysis. Pyrimidine analogs are incorporated into DNA during S-phase. The cell kinetic information generated by this approach is more informative than that obtained from in vitro incubation with DNA

precursors such as tritiated thymidine or by single-parameter DNA analysis (21). The most widely used proliferation parameters are labeling index (LI) and potential doubling time (T_{pot}). T_{pot} is defined as the time that would be required by a tumor to double in cell number in the absence of cell loss (22). It can be calculated in vivo by flow cytometric analysis of a tissue biopsy obtained after a single infusion of a thymidine analog, such as IdU or BrdU, which can be detected using a specific mAb, avoiding the use of radioactive isotopes (22,23). Proliferation index (S-phase fraction or LI) and DNA ploidy cytometric analysis are of clinical interest for making treatment decisions or for predicting response and survival (24–28). As we previously described in vitro, basal LI values are related to 5FU cytotoxicity (18). The present study was designed to

Grant sponsor: Ligue contre le Cancer; Pôle Européen de Santé; Région Lorraine; Communauté Urbaine du Grand Nancy; Alexis Vautrin Cancer Center private research funds.

*Correspondence to: Muriel Barberi-Heyob, PhD, Laboratoire de Recherche en Oncologie, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, F-54511 Vandœuvre-les-Nancy Cedex, France.

E-mail: m.barberi@nancy.fnclcc.fr

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/cyto.10087

compare cell cycle cytometric analysis using monovariate propidium iodide (PI) or bivariate BrdU versus PI labeling, either before or after 5FU exposure. In vitro LI and G₁/S subpopulation evaluated using BrdU incorporation are related to 5FU sensitivity, both before and after 5FU treatment.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Chemicals

Cell culture materials were purchased from Costar (Dutcher, Brumath, France). Culture media and additives were obtained from Life Technologies (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France), except for fetal calf serum (FCS), which was obtained from Costar. Anti-BrdU mAb was provided by Dako (Trappes, France). All other chemicals were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France) and were of molecular biology grade.

Cell Culture

CAL51 human breast adenocarcinoma, PANC3 pancreas carcinoma, and CAL27 and CAL33 human head and neck carcinoma cell lines were kindly provided by Dr. J.L. Fischel (Centre Antoine Lacassagne, Nice, France). FaDu and KB, head and neck carcinoma cell lines, were obtained from Pr. A. Hanauske (Munich University, Germany) as part of the EORTC Preclinical Therapeutic Models Group exchange program. All cell lines were grown in 75-cm² plastic tissue culture flasks in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (100 µg/ml) in a 37°C, 5% CO₂ atmosphere. Exponentially growing cells were exposed to equitoxic 5FU concentrations (IC₅₀) for 24 h and analyzed immediately.

Cytotoxicity Assays

5FU-induced cytotoxicity was assessed using MTT assays according to a procedure previously reported (18). Briefly, cells were seeded at the initial density of 2×10^4 cells per milliliter in 96-well microtitration plates. Seventy-two hours after plating, cells were exposed to 5FU concentrations ranging from 0.08 to 4×10^4 µM, for 24 h. After 5FU exposure, 50 µl of 0.5% 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) solution was added to each well and incubated for 3 h at 37°C to allow MTT metabolism. The formazan crystals were dissolved by adding 50 µl per well of 25% sodium dodecyl sulfate solution and vigorous pipetting. Absorbance was measured at 540 nm using a Multiskan MCC/340 plate reader (Labsystem, Cergy-Pontoise, France). Results were expressed as relative absorbance to untreated controls. 5FU concentrations yielding 50% growth inhibition (IC₅₀) were calculated using a median-effect algorithm (29) and were expressed as the mean values of five independent experiments.

PI Cell Cycle Distribution Analysis

Cell cycle distribution was measured before and after 5FU exposure at an IC₅₀ value. Cell suspensions were

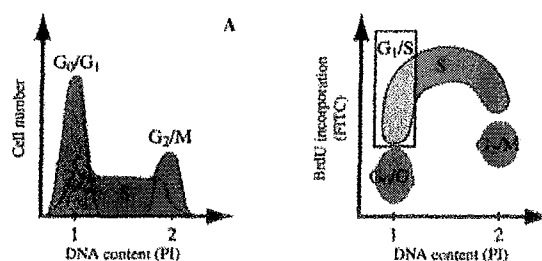


Fig. 1. Schematic representation of cell cycle analysis using PI monovariate analysis (A) or bivariate BrdU vs PI labeling (B).

washed with phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X100, and 50 µg/ml PI, and stored for 24 h at 4°C. After centrifugation at 1,500 rpm for 5 min, the cells were resuspended in PBS containing 250 µg/ml RNase. Monovariate distributions of cell number versus DNA content (PI) were analyzed using an Orthocyte flow cytometer (Ortho Diagnostic Systems, Roissy, France) equipped with a xenon lamp and a filter set for excitation at 488 nm. PI fluorescence intensity was recorded through 575-nm high pass filters. At least 20,000 events were collected in each final gated histogram. Cell cycle analysis was performed using Dean and Jett's algorithm (Multicycle, Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

BrdU Cell Cycle Analysis

Samples were processed using flow cytometry according to the method reported by Marchal et al. (30). First, 200 µM BrdU was added directly to the culture medium for 20 min followed by two washes with PBS. Cell suspensions were prepared by trypsinization and resuspended in cold PBS. While being vortexed, the samples were fixed by the addition of 2 ml cold 70% ethanol for storage at -20°C. Single nuclei suspensions were prepared by resuspending fixed cells in 0.1 N HCl and by incubating for 15 min in 2 N HCl. After three washes with PBS, nuclei were labeled with 40 µg/ml anti-BrdU mouse mAb in PBS containing 0.5% normal rabbit serum, 0.5% Tween 20. After 1 h of incubation at room temperature, samples were washed with PBS, resuspended in the PBS/serum/Tween 20 solution, and stained with 20 µg/ml fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin serum. After 1 h of incubation at room temperature, nuclei were washed twice with PBS and 25 µg/ml PI solution in PBS was added. At least 50,000 events were collected in each final gated histogram.

Bivariate distributions of BrdU content (FITC) versus DNA content (PI) were analyzed. FITC and PI fluorescence intensities were, respectively, recorded through a 520/530-nm band pass and 575-nm high pass filters. The data were analyzed using Multi2D software (Phoenix Flow Systems). LI corresponded to percentage of BrdU-positive cells. The G₁/S subpopulation, corresponding to BrdU-positive cells containing G₁ DNA, was determined (Fig. 1).

Table 1
Cell Cycle Fractions in Untreated Control and After 5FU Exposure (IC_{50}) Assessed by Cell Number Analysis Versus DNA Content (PI)[†]

Cell lines	IC_{50} (mM)	G_0/G_1 (%)		S (%)		G_2/M (%)	
		Control	5FU	Control	5FU	Control	5FU
CAL51	0.16 ± 0.01	42 ± 4	$55 \pm 5^*$	48 ± 2	$42 \pm 5^*$	10 ± 3	$3 \pm 2^*$
KB	0.94 ± 0.17	57 ± 5	$68 \pm 3^*$	33 ± 4	33 ± 7	9 ± 5	$1 \pm 1^*$
FaDu	0.97 ± 0.63	51 ± 3	$64 \pm 3^*$	44 ± 2	$34 \pm 3^*$	5 ± 2	$2 \pm 2^*$
CAL33	1.05 ± 0.48	49 ± 8	65 ± 1	41 ± 8	31 ± 6	11 ± 1	4 ± 5
CAL27	3.12 ± 0.84	56 ± 10	60 ± 13	35 ± 6	36 ± 14	10 ± 5	5 ± 2
PANC3	22.62 ± 3.09	51 ± 3	56 ± 3	39 ± 5	38 ± 3	10 ± 2	6 ± 2

*Significant variations versus untreated control ($P < 0.05$).

[†]Results were mean values of four experiments $\pm$ SD.

Statistical Analysis

Unless indicated, all data are mean values $\pm$ SD calculated from at least four independent experiments. Spearman's rank correlation was used to test for the relationship between the different parameters. The Mann-Whitney U test was used to test for the significance level between independent variables. All experimental values (and not the mean value) were used for statistical analysis.

RESULTS

5FU Sensitivity

A wide range of 5FU sensitivity was found within the cell lines, with IC_{50} values ranging from 0.16 to 22.62 mM, respectively, for the CAL51 and PANC3 cell lines (Table 1).

Cell Cycle Distribution After 5FU Exposure

As demonstrated by PI analysis, after 5FU exposure, all cell lines were able to delay the G_1 phase (Fig. 2). G_0/G_1 accumulation ranged from 1.1 to 1.3-fold, respectively, for the PANC3 and CAL51 cell lines. Nevertheless, only CAL51, KB, and FaDu cell lines, the most 5FU-sensitive lines, displayed a statistically significant higher accumulation in G_1 phase (Table 1, Fig. 2). The S-phase fraction ranged from 33% to 48% in control cells and was unchanged (KB, CAL33, CAL27, and PANC3 cell lines) or slightly decreased after 5FU exposure (S-phase fraction decreased by a factor of 0.77 for the FaDu cell line). The G_2/M phase was reduced more markedly, almost completely disappearing for the KB cell line (Table 1, Fig. 2). Using PI analysis, no statistically significant correlation was seen between 5FU cytotoxicity and cell cycle subpopulation, neither before nor after 5FU treatment.

BrdU Cell Cycle Analysis After 5FU Exposure

BrdU analysis showed that all cell lines were delayed at the G_1/S boundary (Fig. 3) instead of at the G_1 phase as displayed by PI analysis. Compared with the LI in untreated controls, LI increases for all cell lines by a factor of 1.4–2.9 after 5FU exposure (Table 2). The G_1/S fraction increased significantly after 5FU treatment in all cell lines, with values ranging from 2.8 to 8.0-fold, respectively, for the CAL51 and KB cell lines. The LI increase was the

consequence of G_1/S cell accumulation, with the G_1/S fraction ranging from 53% to 69% of the BrdU-labeled cells. The G_1/S fraction was the most prevalent subpopulation in BrdU-labeled cells (Table 2, Fig. 3). LI data were correlated to the G_1/S cell fraction for untreated controls ($r = 0.706$, $P = 0.0121$) and 5FU-treated cells ($r = 0.923$, $P = 0.0001$; Fig. 4). The G_2/M phase was abolished almost completely, as demonstrated by PI analysis (Fig. 3).

5FU sensitivity was statistically correlated to LI ($r = 0.61$, $P = 0.0004$ and $r = 0.67$, $P = 0.0016$, respectively, for controls and 5FU-treated cells; Fig. 5). 5FU sensitivity was also correlated to the G_1/S subpopulation before ($r = 0.68$, $P = 0.0033$) and after 5FU treatment ($r = 0.50$, $P = 0.0294$; Fig. 5).

Comparison of S-Phase Subpopulation as Determined by BrdU or PI Cell Cycle Analysis

These two analytical methods for S-phase evaluation were closely correlated ($r = 0.92$, $P = 0.010$; Fig. 6) and no statistically difference was noted between LI values and S-phase fraction by PI analysis (data not shown). This correlation was, however, demonstrated exclusively for untreated cells and not after 5FU exposure (Fig. 6A,B, respectively). LI was actually overestimated widely in BrdU analysis, leading to values of up to 90% for the FaDu or KB cell lines (Table 2).

Could 5FU-Induced Cell Cycle Arrest be Rescued by BrdU?

In order to test if BrdU pulse (20-min exposure) could lead to cell progression from late G_1 to early S-phase, some control experiments were performed using the KB and CAL51 cell lines, respectively, displaying the lowest and the highest increase in LI and in the G_1/S subpopulation after 5FU exposure. Using BrdU analysis, no difference was seen when BrdU was added during the last 20 min of 5FU exposure or after the 5FU exposure with the washing phase between 5FU and BrdU incubation (Table 3). PI experiments with BrdU incubation did not show any influence of BrdU on cell cycle distribution (Table 3). In conclusion, BrdU incubation was neither responsible for the cell progression from G_1 to early S-phase nor for the increase of LI or the G_1/S phase fraction.

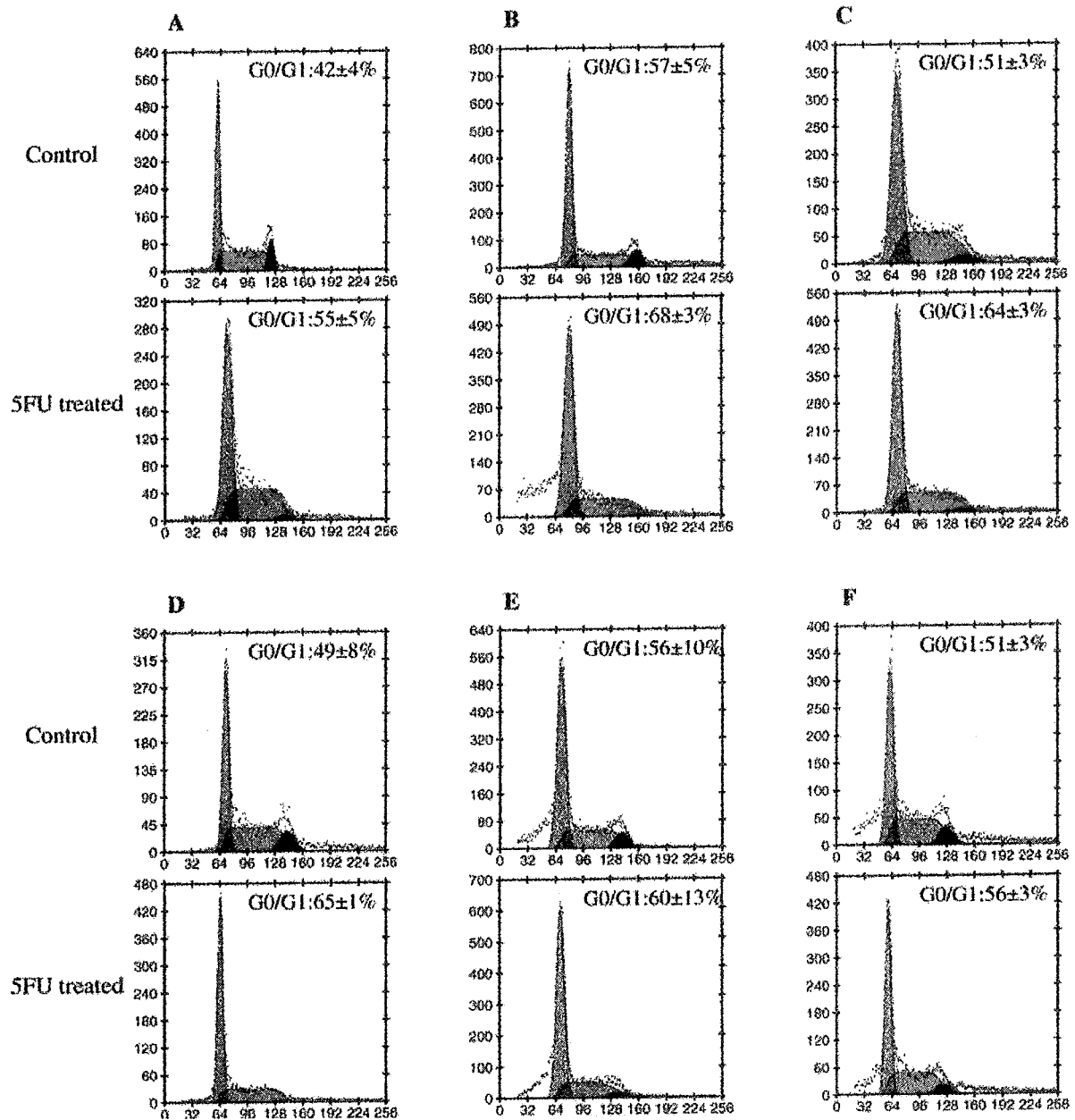


FIG. 2. DNA distribution histogram using PI labeling (x-axis) and total number of cells in each channel (y-axis) in untreated (upper panels) and 5FU-treated (lower panels) cells. Analysis was performed on at least 10,000 events for each sample. Cell cycle analysis was performed using Dean and Jett's algorithm. A: CAL51. B: KB. C: FaDu. D: CAL33. E: CAL27. F: PANC3.

DISCUSSION

With regards to clinical response to 5FU-based therapy, only TS expression was evaluated as a prognostic factor (8-11). Although TS expression analysis has demonstrated potential prognostic significance in patients with advanced colorectal cancer (12,31), its clinical

usefulness remains in question. Prospective studies are still required to confirm its importance in adjuvant chemotherapy. TS enzymatic activity can be altered by genomic polymorphism or mutation, phosphorylation level, and subcellular localization. These do not necessarily modify TS protein level but can affect TS prog-

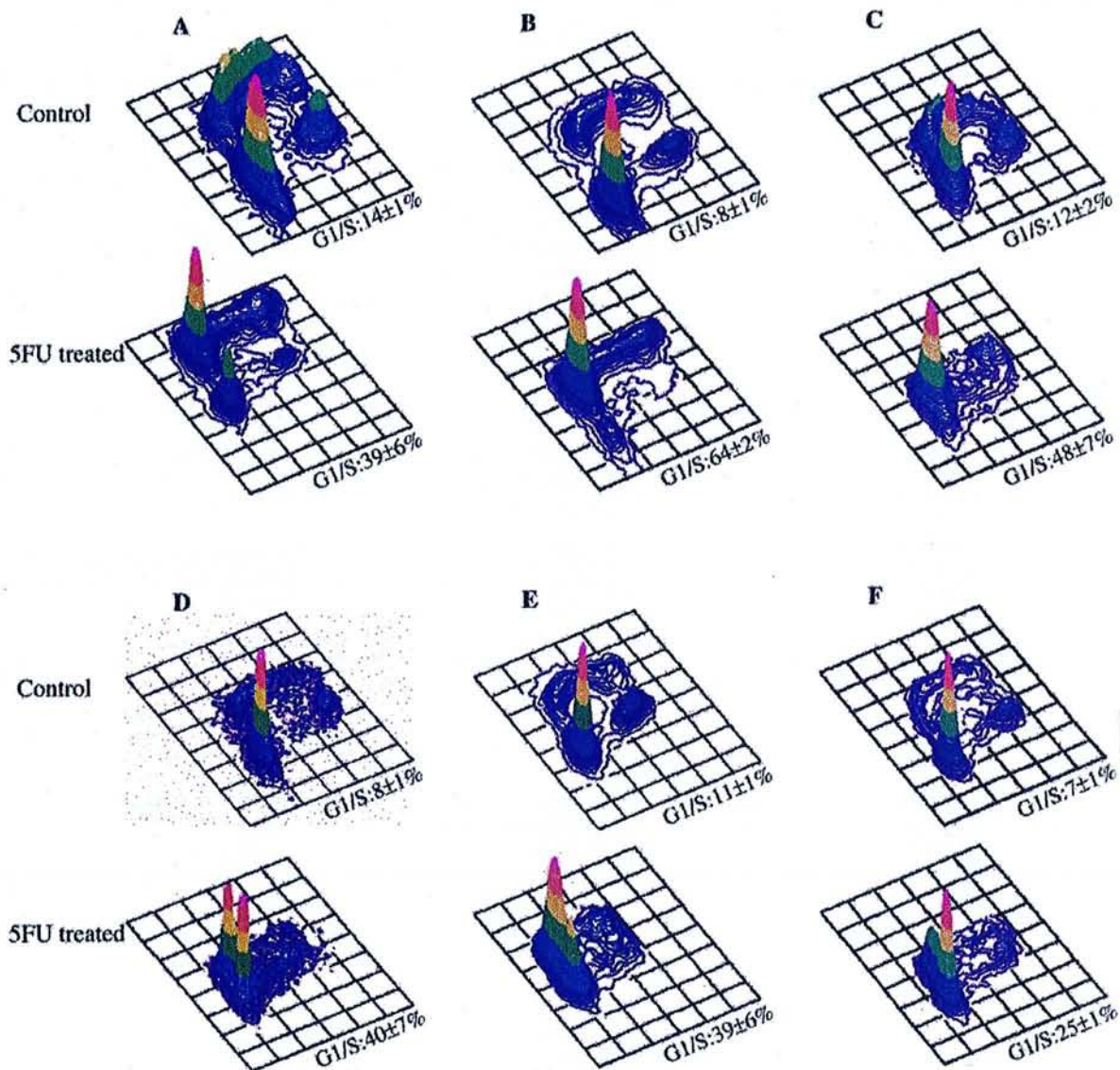


FIG. 3. Three-dimensional representation of bivariate distribution of BrdU incorporation (y-axis) vs DNA content (PI, x-axis) and relative number of cells (z-axis) measured by flow cytometry in untreated controls (upper panels) and 5FU-treated cells (lower panels). A: CAL51. B: KB. C: FaDu. D: CAL33. E: CAL27. F: PANC3.

nostic value (32-35). TS is regulated throughout the cell cycle phase (36,37).

Recent studies demonstrate that cell cycle kinetic studies have clinical value in predicting 5FU sensitivity. S-phase fraction has clinical utility for patients with breast cancer (28) and T_{pot} can predict patients with a low probability of achieving long-term local control with conventional fractionation of radiotherapy in head and neck carcinoma (26,28,38-40). However, standardization and quality control of these parameters have to be improved

before T_{pot} can be implemented for routine use in community settings (28,41,42).

Cell cycle distribution or kinetics parameters can also be used to predict 5FU sensitivity because fluoropyrimidine treatment leads to cell cycle arrest (3,43). In our panel of cell lines, 5FU equitoxic treatment results in G_0/G_1 accumulation as demonstrated by PI analysis (Table 1, Fig. 2). Cell cycle phase subpopulation was not statistically correlated to 5FU sensitivity. Conversely, significant G_0/G_1 accumulation induced after 5FU treatment was only

Table 2
LI and G₁/S Population in Untreated Control and After
5FU Exposure*

Cell lines	Control		5FU	
	LI (%)	G ₁ /S (%)	LI (%)	G ₁ /S (%)
CAL51	52 ± 4	14 ± 1	74 ± 4	39 ± 6
KB	33 ± 3	8 ± 1	95 ± 1	64 ± 2
FaDu	41 ± 4	12 ± 2	87 ± 7	48 ± 7
CAL33	41 ± 4	8 ± 1	59 ± 11	40 ± 7
CAL27	32 ± 2	11 ± 1	63 ± 4	39 ± 6
PANC3	33 ± 1	7 ± 1	47 ± 3	25 ± 1

*Analysis was assessed by bivariate analysis of BrdU content versus DNA content. G₁/S population was determined as described in Figure 1. Results were mean values of four experiments ± SD.

observed for the most 5FU-sensitive cell lines (Table 1). However, BrdU analysis showed that a cell cycle delay took place specifically at the G₁/S interface as previously reported (44,45; Table 2, Fig. 3).

As BrdU is a thymidine analog that can be used by cells for DNA synthesis, it can lead to progression from late G₁ to early S-phase. Therefore, the influence of BrdU incubation during or after 5FU exposure was assessed both by PI and BrdU analysis (Table 3). Using either PI or bivariate BrdU analysis, no BrdU influence on cell cycle distribution was seen. Therefore, the G₁/S subpopulation cannot be considered to be derived from late G₁ during BrdU incubation. In fact, inhibition of TS by 5FU was almost irreversible and BrdU could only rescue new synthesized TS molecules. A 20-min BrdU incubation was not enough long to initiate new DNA synthesis.

The LI was statistically correlated to 5FU sensitivity as we have previously described (18), both before and after 5FU exposure (Fig. 5A1,A2). The G₁/S subpopulation was also strikingly correlated to 5FU sensitivity (Fig. 5B1,B2). In addition, considering the G₁/S interface (Fig. 1), cytometric analysis with bivariate staining analysis (BrdU versus PI) compared with the single-parameter analysis of DNA content (PI) did not provide the same information. Consequently, these two methods will not have the same usefulness for the determination of prognostic indicators. In fact, BrdU analysis showed that G₁ cells, as determined by PI analysis, was composed of BrdU-positive and BrdU-

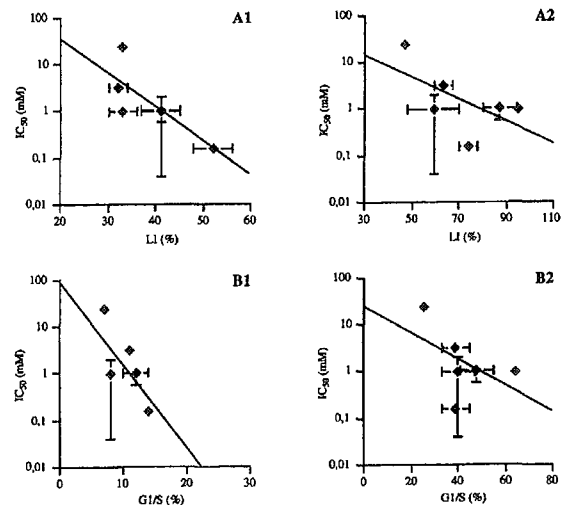


Fig. 5. Correlation between LI or G₁/S population and 5FU sensitivity (IC₅₀) before (A1 or B1, respectively) and after (A2 and B2, respectively) 5FU exposure.

negative cell subpopulations (Figs. 1, 3). These subpopulations cannot be distinguished using PI analysis alone. This was the consequence of the cell fraction that was able to incorporate BrdU and maintain its G₁ DNA content. This fraction was considered to be in G₁ by PI analysis, whereas it was included in the labeled subpopulation by BrdU analysis. Thus, cells performing repair synthesis of DNA, with no net DNA increase, would be included in the LI score, but could still have a DNA content that was indistinguishable from G₁ cells. The number of BrdU-positive cells within this peak increased with duration of 5FU exposure and was related to p21 mRNA expression induction (data not shown). On the other hand, differences in molecular mechanisms gave rise to the existence of these two subpopulations. For example, cyclin D is required for progression through early to mid-G₁. Following this, expression and activity of cyclin E increase at the G₁/S phase border and result in S-phase progression. Cyclin D and E cooperate temporally by successive pRb phosphorylation (46). Synchronization

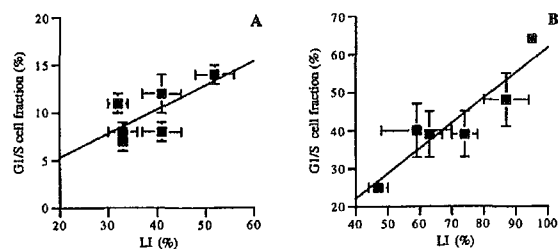


Fig. 4. Correlation between LI and G₁/S population before (A) and after (B) 5FU exposure.

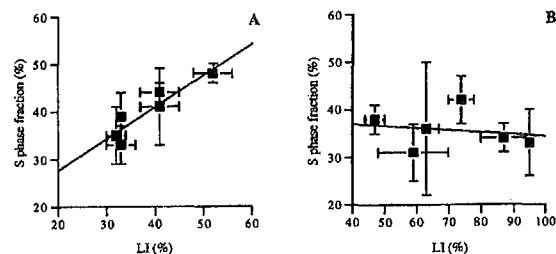


Fig. 6. Correlation between S-phase fraction determined by BrdU and PI cell cycle analysis before (A) and after (B) 5FU exposure.

Table 3
Control Experiments*

Treatment	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
CAL51 ^a			
Control	41	47	12
BrdU	42	46	12
5FU + BrdU	52	46	2
5FU + wash + BrdU	52	46	2
KB ^a			
Control	55	36	9
BrdU	57	36	7
5FU + BrdU	72	24	4
5FU + wash + BrdU	72	27	3
		LI (%)	G ₁ /S (%)
CAL51 ^b			
Control (BrdU)	56		11
5FU + BrdU	76		45
5FU + wash + BrdU	73		45
KB ^b			
Control (BrdU)	34		9
5FU + BrdU	89		70
5FU + wash + BrdU	87		65

*BrdU was added during the last 20 min of 5FU exposure, 20 min after 5FU exposure, and after the washing phase.

^aPI analysis.

^bBrdU analysis.

of cells, caused by a delay in G₁/S, may be related to programmed cell death initiation. Induced delay in G₁/S was representative of apoptosis involvement and of 5FU treatment sensibility. Actually, chromatin condensation and endonuclease-mediated DNA fragmentation were detected using fluorescent microscopy in the most 5FU-sensitive cells (data not shown). The amount of cells displaying DNA fragmentation was also related to 5FU sensitivity (data not shown). 5FU exposure leads to an LI increase. However, LI modifications were only related to G₁/S phase accumulation, and not to a real enhanced S-phase fraction. In conclusion, cell cycle parameters using BrdU analysis could be used as predictive markers for 5FU response to complement the predictive value of TS.

LITERATURE CITED

- Peters GJ, van der Wilt CL, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, Johnston PG, van Groenigen CJ, Pinedo HM. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* 1995;31A:1299-1305.
- Pinedo HM, Peters GF. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988;6:1653-1664.
- Pickard M, Dive C, Kinsella AR. Differences in resistance to 5-fluorouracil as a function of cell cycle delay and not apoptosis. *Br J Cancer* 1995;72:1389-1396.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74:957-967.
- Sharma R, Adam E, Schumacher U. The action of 5-fluorouracil on human HT29 colon cancer cells grown in SCID mice: mitosis, apoptosis and cell differentiation. *Br J Cancer* 1997;76:1011-1016.
- Huschtscha LI, Bartier WA, Ross CE, Tattersall MH. Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs in vitro. *Br J Cancer* 1996;73:54-60.
- Yang B, Eshleman JR, Berger NA, Markowitz SD. Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 1996;2:1649-1657.
- Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 1995;55:1407-1412.
- Lenz HJ, Danenberg KD, Leichman CG, Florentine B, Johnston PG, Groshen S, Zhou L, Xiong YP, Danenberg PV, Leichman LP. p53 and thymidylate synthase expression in untreated stage II colon cancer: associations with recurrence, survival, and site. *Clin Cancer Res* 1998;4:1227-1234.
- Kuniyasu T, Nakamura T, Tabuchi Y, Kuroda Y. Immunohistochemical evaluation of thymidylate synthase in gastric carcinoma using a new polyclonal antibody: the clinical role of thymidylate synthase as a prognostic indicator and its therapeutic usefulness. *Cancer* 1998;83:1300-1306.
- Romain S, Martin PM, Klijn JG, van Putten WL, Look MP, Guirou O, Foekens JA. DNA-synthesis enzyme activity: a biological tool useful for predicting anti-metabolic drug sensitivity in breast cancer? *Int J Cancer* 1997;74:156-161.
- Findlay MPN, Cunningham D, Morgan G, Clinton S, Hardcastle A, Aherne GW. Lack of correlation between thymidylate synthase levels in primary colorectal tumours and subsequent response to chemotherapy. *Br J Cancer* 1997;75:903-909.
- Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, Chabner BA, Allegra CJ. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:2640-2647.
- Aschele C, Debernardi D, Casazza S, Antonelli G, Tunesi G, Baldo C, Lionetto R, Maley F, Sobrero A. Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999;17:1760-1770.
- Etienne MC, Pivot X, Formento JL, Bensadoun RJ, Formento P, Dassonville O, Francoual M, Poissonnet G, Fontana X, Schneider M, Demard F, Milano G. A multifactorial approach including tumoral epidermal growth factor receptor, p53, thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase to predict treatment outcome in head and neck cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 1999;79:1864-1869.
- Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Dassonville O, Renee N, Schneider M, Thyss A, Demard F, Milano G. Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Clin Oncol* 1995;13:1663-1670.
- van Triest B, Pinedo HM, van Hensbergen Y, Smid K, Tellemann F, Schoenmakers PS, van der Wilt CL, van Laar JA, Noordhuis P, Jansen G, Peters GJ. Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but not for folate-based thymidylate synthase inhibitors, in 13 nonselected colon cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 1999;5:643-654.
- Mirjolet JF, Barberi Heyob M, Merlin JL, Marchal S, Etienne MC, Milano G, Bey P. Thymidylate synthase expression and activity: relation to S-phase parameters and 5-fluorouracil sensitivity. *Br J Cancer* 1998;78:62-68.
- Mirjolet JF, Barberi Heyob M, Didelot C, Peyrat JP, Abecassis J, Millon R, Merlin JL. Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *Br J Cancer* 2000;83:1380-1386.
- Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, Fu CG, Takenoue T, Tsuruo T, Muto T. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* 1998;78:986-992.
- Wilson GD. Assessment of human tumour proliferation using bromodeoxyuridine—current status. *Acta Oncol* 1991;30:903-910.
- Begg AC, McNally NJ, Shrieve DC, Karcher H. A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry* 1985;6:620-626.
- Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982;218:474-475.
- Holdaway KM, Finlay GJ, Baguley BC. Relationship of cell cycle parameters to in vitro and in vivo chemosensitivity for a series of Lewis lung carcinoma lines. *Eur J Cancer* 1992;28A:1427-1431.
- Bolger BS, Symonds RP, Stanton PD, MacLean AB, Burnett R, Kelly P, Cooke TG. Prediction of radiotherapy response of cervical carcinoma through measurement of proliferation rate. *Br J Cancer* 1996;74:1223-1226.
- Corvo R, Giaretti W, Sanguineti G, Geido E, Orecchia R, Guenzi M, Margarino G, Bacigalupo A, Garaventa G, Barbieri M, et al. In vivo cell kinetics in head and neck squamous cell carcinomas predicts local control and helps guide radiotherapy regimen. *J Clin Oncol* 1995;13:1843-1850.
- Vuckovic J, Forenpoher G, Marusic M, Uzarevic B, Zemunik T. Prog-

- nostic relevance of non-Hodgkin's lymphomas cell cycle data. *Neoplasia* 1998;45:332-335.
28. Wenger CR, Clark GM. S-phase fraction and breast cancer—a decade of experience. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:255-265.
 29. Chou TC, Talalay P. Application of the median-effect principle for the assessment of low dose risk of carcinogens and for the quantitation of synergism and antagonism of chemotherapeutic agents. In: Harrap KR, Connors TA, editors. *New avenues in developmental cancer chemotherapy*. New York: Academic Press; 1987. p 37-64.
 30. Marchal S, Marchal C, Parache RM, Benjaafar N, Odda M, Leclerc A, Merlin JL, el Gueddari B, Bey P. Combined flow cytometry and immunohistochemistry analyses for the assessment of nasopharyngeal carcinoma cell kinetics by in vivo bromodeoxyuridine infusion. *Cytometry* 1997;29:165-172.
 31. Pestalozzi BC, Peterson HF, Gelber RD, Goldhirsch A, Gusterson BA, Trihía H, Lindtner J, Cortes-Funes H, Simmoncini E, Byrne MJ, Golouh R, Rudenstam CM, Castiglione-Gertsch M, Allegra CJ, Johnston PG. Prognostic importance of thymidylate synthase expression in early breast cancer. *J Clin Oncol* 1997;15:1923-1931.
 32. Samsonoff WA, Reston J, McKee M, O'Connor B, Galivan J, Maley G, Maley F. Intracellular location of thymidylate synthase and its state of phosphorylation. *J Biol Chem* 1997;272:13281-13285.
 33. Poon PP, Storms RK. Thymidylate synthase is localized to the nuclear periphery in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1994;269:8341-8347.
 34. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995;20:191-197.
 35. Berger SH, Barbour KW, Berger FG. A naturally occurring variation in thymidylate synthase structure is associated with a reduced response to 5-fluoro-2'-deoxyuridine in a human colon tumor cell line. *Mol Pharmacol* 1988;34:480-484.
 36. Johnson LF. Posttranscriptional regulation of thymidylate synthase gene expression. *J Cell Biochem* 1994;54:387-392.
 37. Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, Kaneda S, Takeishi K, Seno T. Cell-cycle-directed regulation of thymidylate synthase messenger RNA in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate. *J Mol Biol* 1986;190:559-567.
 38. Begg AC. The clinical status of Tpot as a predictor? Or why no tempest in the Tpot! [editorial; comment]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1539-1541.
 39. Haustermans K, Fowler J, Geboes K, Christiaens MR, Lerut A, van der Schueren E. Relationship between potential doubling time (Tpot), labeling index and duration of DNA synthesis in 60 esophageal and 35 breast tumors: is it worthwhile to measure Tpot? *Radiother Oncol* 1998;46:157-167.
 40. Zackrisson B, Gustafsson H, Stenling R, Flygare P, Wilson GD. Predictive value of potential doubling time in head and neck cancer patients treated by conventional radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;38:677-683.
 41. Gilliland R, Williamson KE, Hamilton PW, Crockard A, Spence RA. DNA denaturation sensitivity may invalidate bromodeoxyuridine—DNA flow cytometric analysis of potential doubling times in colorectal tumours. *Br J Surg* 1997;84:242-247.
 42. Haustermans K, Hofland I, Pottier G, Ramackers M, Begg AC. Can measurements of potential doubling time (Tpot) be compared between laboratories? A quality control study [see comments]. *Cytometry* 1995;19:154-163.
 43. Piazza GA, Rahm AK, Finn TS, Fryer BH, Li H, Stoumen AL, Pamukcu R, Ahnen DJ. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res* 1997;57:2452-2459.
 44. Tsurusawa M, Niwa M, Katano N, Fujimoto T. Flow cytometric analysis by bromodeoxyuridine/DNA assay of cell cycle perturbation of methotrexate-treated mouse L1210 leukemia cells. *Cancer Res* 1988;48:4288-4293.
 45. Tonkinson JL, Marder P, Andis SL, Schultz RM, Gossett LS, Shih C, Mendelsohn LG. Cell cycle effects of antifolate antimetabolites: implications for cytotoxicity and cytostasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;39:521-531.
 46. Sheaff RJ, Roberts JM. Regulation of G1 phase. *Results Probl Cell Differ* 1998;22:1-34.

Radiation could induced P53-independent and cell cycle-unrelated apoptosis in 5-fluorouracil radio-sensitized head and neck carcinoma cells

C. Didelot¹, J.F. Mirjolet^{1,2}, M. Barberi-Heyob¹, C. Ramacci¹, J.L. Merlin¹

1 Centre Alexis Vautrin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

2 present address : IRIBHN, Université Libre de Bruxelles, Campus Erasme, 808 route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgique

Address for reprints and correspondence :

Muriel Barberi-Heyob, Ph. D.

Laboratoire de Recherche en Oncologie

Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne,

F-54511 Vandœuvre-les-Nancy Cedex, France

Tel. 33+ (3) 83 59 83 06

Fax. 33+ (3) 83 44 76 35

e-mail : m.barberi@nancy.fnclcc.fr

Abstract

The effect of chemoresistance induction in radiosensitivity and cellular behavior after irradiation remains misunderstood. This study was designed to understand the relationship between radiation-induced cell cycle arrest, apoptosis and radiosensitivity in KB cell line and KB3 subline selected after 5FU exposure. Exposure of KB cells to 5FU led to an increase in radiosensitivity. G₂/M cell cycle arrest was observed in the two cell lines after irradiation. The radioresistant KB cell line reached the maximum arrest, two hours before KB3. The cellular exit from this arrest was found to be related to the wild type P53 protein expression induction. After irradiation, only KB3 cell line underwent apoptosis. This apoptosis induction seemed to be independent of G₂/M arrest exit which was carried out later. The difference of radiosensitivity between KB and KB3 subline may result therefore from both a difference in apoptosis induction and difference in G₂/M arrest maximum duration.

Moreover, 5FU exposure has led to an increase in constitutive P53 protein expression which may be associated to an increase in basal apoptosis cell fraction. Given the existing correlation between radiosensitivity and the percentage of basal apoptosis, the constitutive P53 protein expression may be related to intrinsic radiosensitivity in our cellular model.

Keywords : Cellular radiosensitivity, G₂/M arrest, P53, Apoptosis

Résumé

L'effet de l'induction de la chimiorésistance sur la radiosensibilité et sur le comportement cellulaire après irradiation reste peu connu. Le but de cette étude était de comprendre les relations entre les arrêts dans le cycle cellulaire et l'apoptose radio-induits, et la radiosensibilité de la lignée KB et de son clone KB3, plus radiosensible, obtenu après une exposition au 5FU.

Un arrêt en G₂/M est observé après irradiation pour les deux lignées. La lignée KB, atteint le maximum de ce blocage 2 heures avant KB3. La levée de ce blocage est en relation avec l'induction d'expression de la protéine P53 sauvage. Seul le clone KB3, induit l'apoptose. Ce processus semble indépendant de la levée du blocage en G₂/M qui a lieu plus tardivement.

La différence de radiosensibilité entre KB et KB3 pourrait provenir de la différence à la fois d'apoptose radio-induite et du temps de blocage maximum en G₂/M.

De plus, l'exposition au 5FU, a provoqué une augmentation de l'expression constitutive de P53, pouvant être associée à l'augmentation du pourcentage basal de cellules apoptotiques. Comme une corrélation entre ce pourcentage de cellules en apoptose et la radiosensibilité a pu être observée, l'expression constitutive de P53 pourrait être en relation avec la radiosensibilité.

Mots clés : radiosensibilité cellulaire, arrêt en G₂/M, P53, apoptose

Introduction

5-fluorouracil (5FU) is known to be a radio-sensitizer, but clinically, in spite of good initial response rates, long-term survival was not improved (Olver et al. 1996), which could be related to difficulties to understand radiobiological behavior of chemoresistant cell populations.

Moreover, clinically, it has been empirically admitted that chemoresistant tumors are also radioresistant. This theory is consistent with experimental *in vitro* data obtained in cervix carcinoma cell lines where radiosensitivity level was compared to sensitivity to bleomycin, cisplatin, etoposide and methotrexate (Kelland and Tonkin 1989). On the other hand, experimental *in vitro* data in ovarian (Griffon-Etienne et al. 1996a) and head and neck carcinoma cell lines (Griffon-Etienne et al. 1996b) conversely suggested that chemosensitivity was associated with relative radioresistance. Lastly, other studies supported an absence of correlation between chemo- and radioresistance (Heenan et al. 1996). In all cases, molecular mechanisms related to presence or absence of this correlation have not been elucidated.

Molecular mechanisms of cell cycle response to ionising radiation can be similar to that caused by other DNA damaging agents, such as genotoxic drugs. Frequently, cells expressing a functional P53 protein, arrested in both G₁/S and G₂/M cell cycle phases after irradiation. G₁/S arrest was mediated through activation of P53, while G₂-arrest was also observed in cells having lost P53 function (Bernhard et al. 1999). Thus, in cells in which P53 function was lost, G₁/S delay was not observed but prolongation of G₂/M was maintained after irradiation. However, in other cells, P53 could be implicated to sustain G₂/M arrest after irradiation (Bunz et al. 1998) or to lead cells to exit from G₂/M arrest (Guillouf et al. 1995). G₂/M delay may contribute to survival of cells after irradiation. Thus, compounds which inhibit the G₂/M checkpoint (methylxanthine, staurosporine...), lead to radiosensitization of tumor cells (Bernhard et al. 1994; Busse et al. 1978; Roberge et al. 1998). Conversely, some cells with a prolonged G₂/M delay, have enhanced radioresistance (McKenna et al. 1991; McKenna et al. 1990). Differences in the length of radio-induced G₂/M delay and magnitude (Su and Little 1993) may be critical determinants of cellular radiosensitivity. So, radiation sensitivity should be influenced by cells ability to undergo cell cycle arrests, and by duration of these arrests. P53 implication in G₂/M arrest, G₂/M transition and apoptosis induction after irradiation, seems to depend on the type of tumor cells and the radiation doses (Arita et al. 1997; Merritt et al. 1997).

Thus, on the one hand, it was described that P53 induced G₂/M arrest after irradiation without apoptosis (Agarwal et al. 1995; Stewart et al. 1995). On the other hand, P53 can also facilitate the exit of G₂/M arrest and induce apoptosis (Guillouf et al. 1995; Schwartz et al. 1997; Skladanowski and Larsen 1997). Using defective P53 cells, other studies suggested that mechanisms between G₂/M arrest and apoptosis induction may be independent of P53 protein.

In view of such differences in the results obtained, the present study was designed to investigate the involvement of P53 protein in cell cycle redistribution and in apoptosis induction, after irradiation of radiosensitive 5FU resistant KB3 subline, to compare with KB parental cell line.

Materials and methods

Materials and chemicals

Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France), and culture media were obtained from Life Technologies (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France), except fetal calf serum, which was obtained from Costar. All other chemicals were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France) except 5FU which was obtained from Roche.

Cell culture

KB, head and neck carcinoma cell line, was kindly provided by Pr. A. Hanauske (Munich University, Germany) as part of the EORTC Preclinical Therapeutic Models Group exchange program. KB3 subline was derived from KB cell line, continuously exposed to 5-fluorouracil (650 µg/ml) (Produits Roche, Neuilly, France) during 3 weeks. The IC_{50} to 5FU were 164 ± 31 and 485 ± 77 µg/ml respectively for KB and KB3. The resistance indices of KB3 to compare to parental cell line KB was 2.95. The resistant subline was then maintained in 5-fluorouracil-free medium.

Previous study of exons 2 to 9 of p53 gene revealed a wild type status for KB cell line (Mirjolet et al. 2000). No mutation was found in p53 sequence analysis in KB3 subline.

All cell lines were grown in a 37°C, 5% CO₂ atmosphere, in 75 cm² plastic tissue culture flasks in RPMI 1640 medium supplemented with 9 % fetal calf serum, penicillin (100 i.u./ml) and streptomycin (100 µg/ml).

Radiosensitivity

The radiosensitivity of each cell line was determined using soft agar clonogenic assays according to the method described by Griffon-Etienne et al. (1996). Briefly, the cells were seeded in 0.3% soft agar (Bacto Agar, Difco, Detroit, MI) at $2 \cdot 10^3$ and $3 \cdot 10^3$ cells/wells, respectively for KB and KB3 cell lines. Cells were irradiated at doses ranging from 0.5 to 10 Gy.

Ten days after irradiation, the colonies were semi-automatically counted using image analysis (Inspector, Matrox, Canada). Only colonies with a mean diameter above 50 µm were counted. Every experiment was performed in triplicate and repeated at least three times. The results were normalized

to unirradiated controls. The experimental dose-response curves were fitted using the Linear-Quadratic model ($S=e^{-\alpha D-\beta D^2}$) then, the SF_2 (surviving fraction at 2 Gy) radiosensitivity parameter was calculated according to Thames et al. (Thames et al. 1986).

Cell cycle distribution

The cells were seeded at 10^4 cells/ml in 75 cm² plastic tissue culture flasks. Four days later, the cells were γ -irradiated at 2 Gy using a Theratron 780 ⁶⁰Co apparatus (Theratronics, Ottawa, Canada). At different times after irradiation, cell suspensions were prepared by trypsination, washed by PBS and incubated for 24 h in 50 μ g/ml propidium iodide solution, containing 0.1% sodium citrate and 0.1% Triton X100.

Before being analyzed using flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson, Rungis, France), the cells were washed with PBS solution supplemented with RNase (50 μ g/ml) was added. At least 50,000 events were collected, and the data were analyzed using ModFit LT software (Beckton Dickinson).

Detection of apoptosis using Annexin V-FITC, propidium iodide double labeling

The cells were seeded at 10^4 cells/ml in 75 cm² plastic tissue culture flasks. Four days later, the cells were incubated in 5 mM EDTA for 5 minutes, and washed by RPMI. 10^5 cells were incubated with 100 μ l of 1X binding buffer (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂), 5 μ l Annexin V-FITC (PharMingen, Becton Dickinson) and 2 μ l PI (propidium iodide, 50 μ g/ml). After 15 minutes at 4°C in dark, the cells were suspended in 400 μ l of binding buffer and analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson) using Cell Quest software (Becton Dickinson).

P53 protein expression analysis

Cells were collected in PBS, washed twice, and lysed in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 % CHAPS). Samples were incubated for 1 h on ice then stored at -80°C until analysis. Defrosted samples received 100 μ g of protein in Laemmli buffer (Bio Rad), and were boiled for 5 min. Samples were separated by a migration into SDS-PAGE with 10 % of

acrylamide. After migration at 100 V during 2 hours, proteins were transferred onto Immobilon-P transfer membranes (Millipore, St Quentin Yvelines, France) using semi-dry blotting techniques. Membranes were probed overnight at 4°C with DO-7 mouse P53 primary monoclonal antibody (Dako). Then membranes were probed with horseradish peroxidase labeled secondary antibody for 1 h at room temperature (Dako). Immunological complexes were visualized by chemiluminescence detection according to the manufacturer's recommendations (Amersham-Pharmacia Biotech).

Statistical analysis

Unless otherwise indicated, all data are mean values $\pm$ standard deviation (S.D.) calculated from at least three independent experiments. Wilcoxon test was used to test for the significant level between independent variables. Significativity limit was set to $p < 0.05$.

Results

Radiosensitivity

Radiosensitivity parameters i.e. surviving fraction of clonogenic cells after 2 Gy irradiation (SF_2) and α (Table 1) were calculated from radiation-dose response curves fitted using linear-quadratic model (Fig. 1). KB3 subline was found to be more radiosensitive than KB parental cell line with significant decrease in SF_2 (0.91 vs 0.52) and increase in α (0.002 vs 0.312).

Cell cycle arrest

After irradiation, time-course experiments of cell cycle distribution were performed. After 2 Gy irradiation (Fig. 2), no G_1/S arrest was detected, but accumulation of cells in S-phase during the first 8 hours and G_2/M arrest from 4 hours, were observed in KB and KB3 cell lines. Statistically significant maximum G_2/M accumulation was highlighted 10 hours after irradiation for KB cells (Table 2) and only 12 hours after irradiation in KB3 cells. In both cell lines, G_2/M accumulation decreases significantly 14 hours after irradiation.

Maximum G_2/M accumulation intensity was similar in both cell lines, so no significant relationship was observed between intensity of G_2/M accumulation after 2 Gy irradiation and radiosensitivity.

P53 expression

In untreated cell lines, KB displayed a lower P53 protein expression than KB3 (Fig. 3). In KB cell line, 2 Gy irradiation led to increase in P53 expression from 8 hours with a maximum from 12 to 18 hours. P53 expression decreased from 24 h after irradiation. In KB3 subline, maximal P53 expression occurred 12 hours after irradiation, decreased from 18 hours and increased slightly at 24 hours (Fig. 3).

Apoptosis

Apoptosis was evaluated 4, 8, 14 and 24 h after 2 Gy irradiation and the percentage of apoptotic cells was compared to unirradiated control. In untreated cell lines, KB displayed a significantly lower apoptosis rate than KB3, with 5 % and 16 % respectively ($p < 0.05$) (Fig. 4).

In response to 2 Gy radiation dose, a significant apoptosis induction was observed in KB3 subline from 8 hours after irradiation (Fig.5). On the contrary, in KB cell lines, no significant variation in apoptosis induction was detected during the first 24 hours after 2 Gy irradiation (Fig. 5).

Discussion

In the present study, we analyzed the radiation response of KB3, a head and neck subline, selected to be chemoresistant after 5FU continuous exposure, compared to KB parental cell line.

KB3 subline was found to be more radiosensitive than KB parental cell line. With other subclones selected using the same procedure as for KB3, a significant inverse correlation between IC_{50} and SF_2 parameters was obtained (Didelot et al. 2000). So, these results suggested that radiotherapy could be effective in second line after failure to 5FU treatment, since chemoresistance induction led to radiosensitization. However, these preliminary results may be confirmed with others sublines of different cell line selected with the same procedure.

The literature described that 5FU was a radio-sensitizer when it was used before irradiation in association treatment. However, no study explained how 5FU can lead to an irreversible radiosensitization.

KB and KB3 cell lines expressed wild type P53 protein, but did not stop in G_1/S phase after irradiation, although G_1/S delay was previously described in KB after another genotoxic stress (Mirjolet et al. 2000; Mirjolet et al. 2002). After 2 Gy irradiation, KB and KB3 displayed S-phase accumulation during the first 8 hours, which was consistent with a decrease in the DNA synthesis rate (Painter 1986). Finally, a G_2/M arrest was observed in both cell lines, shortly after 2 Gy irradiation. Unlike several studies, no correlation between G_2/M arrest magnitude and cell radiosensitivity was observed. A time difference of 2 h was observed between KB and KB3 cell lines, before reaching maximal G_2/M arrest. Thus, in the KB cell line, the maximum G_2/M arrest was reached earlier than in the KB3 subline. Numerous authors have hypothesized that cell cycle progression is arrested in response to DNA damage, in order to allow cells to repair this damage (Bernhard et al. 1999). In such a context, this 2 hour-delay between KB and KB3 could partially explain their difference in radiosensitivity parameters, as the KB cell line could have more time to repair DNA. This hypothesis correlates with experiments leading to cellular radiosensitization with G_2/M delay abrogation after irradiation (Roberge et al. 1998), or induction of radioresistance by increasing G_2/M delay (Jung et al. 1994).

We found that decrease in the number of G_2/M cells, 14 hours after irradiation, was not related to an apoptosis induction, as already reported (Arita et al. 1997; Bache et al. 1999). In fact, only KB3

subline underwent apoptosis after irradiation, which began 8 hours after 2 Gy irradiation, and so, before G₂/M exit. KB, the most radioresistant cell line, did not present apoptosis induction during the first 24 hours after 2 Gy irradiation. In both cell lines, the decrease in the number of cells in G₂/M phase 12 hours after irradiation was correlated to a high P53 expression, suggesting that in these models, P53 could facilitate exit from G₂/M arrest. So, in this model, P53 could facilitate exit from G₂/M arrest. However, contrary to many studies (Guillouf et al. 1995; Schwartz et al. 1997; Skladanowski and Larsen 1997), this exit was not found to be associated with apoptosis induction. Moreover, the fact that in the KB3 subline, apoptosis induction began as soon as 4 h following irradiation, while P53 induction started only 12 hours after 2 Gy irradiation, suggests that in this subline, radiation-induced apoptosis could be independent of P53.

So, the difference of radiosensitivity between KB and KB3 could be explained by two mechanisms : longer time to repair DNA damage in G₂/M delay for KB, and a higher apoptosis induction rate for KB3.

Exposure to 5FU led to an increase in constitutive P53 expression in KB3, as compared to the KB parental cell line. This difference may be correlated with the variation in the basal apoptosis rate between the two cell lines. Therefore, basal apoptosis should depend on P53, while radio-induced apoptosis should be independent of P53.

With other sublines, obtained using the same procedure as for KB3, a significant correlation was observed between this basal apoptosis and intrinsic radiosensitivity quantified by SF₂ parameter ($r=0.907$, $p=0.007$, data not shown). This relationship has already been described with the percentage measurement of apoptotic cells in pre-therapy biopsies of cervix carcinoma (Levine et al. 1995). These authors suggested the possible use of this apoptosis index as a predictive factor for tumor response to radiotherapy. Moreover, as mutation or loss of P53, has been shown to enhance radiation resistance (Bristow et al. 1998; Bristow et al. 1994; Pardo et al. 1994), the study of the relationship between constitutive P53 protein expression and intrinsic radiosensitivity is a matter of interest.

In conclusion , 5FU continuous exposure, led to an increase in 5FU resistance and a decrease in radioresistance. This exposure also increased the constitutive P53 protein expression, and consequently, basal apoptosis fraction. In spite of wild type P53 expression, and with or without 5FU selection, cells stopped only in G₂/M checkpoint after irradiation. In order to reach maximum

induction, a 2 hour-delay between the two cell lines was observed. Exit from G₂/M arrest was related to P53 expression induction, and not to apoptosis induction, since an increase in apoptotic cell fraction appeared before maximum G₂/M arrest.

Only the more radiosensitive subline, underwent P53-independent apoptosis after irradiation. These apoptosis initiation mechanisms remain to be elucidated. The difference in radiosensitivity between the KB and KB3 cell lines could be related to two distinct mechanisms : apoptosis induction and G₂/M delay which allow DNA damage repair.

Acknowledgements

This work was supported by the French "Ligue Nationale contre le Cancer des Comités Lorrains".

References

- Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R. and Stark, G.R. 1995. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**: 8493-8497.
- Arita, D., Kambe, M., Ishioka, C. and Kanamaru, R. 1997. Induction of p53-independent apoptosis associated with G2M arrest following DNA damage in human colon cancer cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**: 39-43.
- Bache, M., Dunst, J., Wurl, P., Frode, D., Meye, A., Schmidt, H., Rath, F.W. and Taubert, H. 1999. G2/M checkpoint is p53-dependent and independent after irradiation in five human sarcoma cell lines. *Anticancer Res.*, **19**: 1827-1832.
- Bernhard, E.J., Maity, A., Muschel, R.J. and McKenna, W.G. 1994. Increased expression of cyclin B1 mRNA coincides with diminished G2-phase arrest in irradiated HeLa cells treated with staurosporine or caffeine. *Radiat. Res.*, **140**: 393-400.
- Bernhard, E.J., McKenna, W.G. and Muschel, R.J. 1999. Radiosensitivity and the cell cycle. *Cancer J. Sci. Am.*, **5**: 194-204.
- Bristow, R.G., Hu, Q., Jang, A., Chung, S., Peacock, J., Benchimol, S. and Hill, R. 1998. Radioresistant MTP53-expressing rat embryo cell transformants exhibit increased DNA-dsb rejoining during exposure to ionizing radiation. *Oncogene*, **16**: 1789-1802.
- Bristow, R.G., Jang, A., Peacock, J., Chung, S., Benchimol, S. and Hill, R.P. 1994. Mutant p53 increases radioresistance in rat embryo fibroblasts simultaneously transfected with HPV16-E7 and/or activated H-ras. *Oncogene*, **9**: 1527-1536.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, **282**: 1497-1501.
- Busse, P.M., Bose, S.K., Jones, R.W. and Tolmach, L.J. 1978. The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. III. Enhancement of X-ray-induced killing during G2 arrest. *Radiat. Res.*, **76**: 292-307.
- Didelot, C., Mirjolet, J.F., Barberi Heyob, M., Milano, G. and Merlin, J.L. 2000. Influence of S-phase duration on G2 arrest-mediated apoptosis induction by radiations in cell

lines expressing different level of sensitivity to 5-fluorouracil (5FU). In *American Association for Cancer Research*, **41**. p. 785.

Griffon Etienne, G., Merlin, J.L. and Marchal, C. 1996. In vitro evaluation of Taxol combined with radiations in human squamous cell carcinoma spheroids. *Cancer Lett.*, **109**: 23-32.

Griffon-Etienne, G., Merlin, J.-L. and Marchal, C. 1996a. Association of docetaxel/paclitaxel with irradiation in ovarian carcinoma cell lines in bidimensional (sulforhodamine B assay) and tridimensional (spheroids) cultures. *Anti-Cancer Drugs*, **7**: 660-670.

Griffon-Etienne, G., Merlin, J.L. and Marchal, C. 1996b. In vitro evaluation of Taxol(R) combined with radiations in human squamous cell carcinoma spheroids. *Cancer Lett.*, **109**: 23-32.

Guillouf, C., Rosselli, F., Krishnaraju, K., Moustacchi, E., Hoffman, B. and Liebermann, D.A. 1995. p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, **10**: 2263-2270.

Heenan, M., Kavanagh, K., Redmond, A., Maher, M., Dolan, E., O'Neill, P., Moriarty, M. and Clynes, M. 1996. Absence of correlation between chemo- and radioresistance in a range of human tumour cell lines. *Cytotechnology*, **19**: 237-242.

Jung, M., Kern, F.G., Jorgensen, T.J., McLeskey, S.W., Blair, O.C. and Dritschilo, A. 1994. Fibroblast growth factor-4 enhanced G2 arrest and cell survival following ionizing radiation. *Cancer Res.*, **54**: 5194-5197.

Kelland, L.R. and Tonkin, K.S. 1989. In vitro chemosensitivity of four new carcinoma of the cervix cell. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **25**: 1211-1218.

Levine, E.L., Renehan, A., Gossiel, R., Davidson, S.E., Roberts, S.A., Chadwick, C., Wilks, D.P., Potten, C.S., Hendry, J.H., Hunter, R.D. and et al. 1995. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother. Oncol.*, **37**: 1-9.

McKenna, W.G., Iliakis, G., Weiss, M.C., Bernhard, E.J. and Muschel, R.J. 1991. Increased G2 delay in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and v-myc. *Radiat. Res.*, **125**: 283-287.

McKenna, W.G., Weiss, M.C., Endlich, B., Ling, C.C., Bakanauskas, V.J., Kelsten, M.L. and Muschel, R.J. 1990. Synergistic effect of the v-myc oncogene with H-ras on radioresistance. *Cancer Res.*, **50**: 97-102.

Merritt, A.J., Allen, T.D., Potten, C.S. and Hickman, J.A. 1997. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene*, **14**: 2759-2766.

Mirjolet, J.F., Barberi-Heyob, M., Didelot, C., Peyrat, J.P., Abecassis, J., Millon, R. and Merlin, J.L. 2000. Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *Br. J. Cancer*, **83**: 1380-1386.

Mirjolet, J.F., Didelot, C., Barberi Heyob, M. and Merlin, J.L. 2002. G1/S but not G0/G1 cell fraction is related to 5-Fluorouracil cytotoxicity. *Cytometry*, **in press**.

Olver, I.N., Hughes, P.G., Smith, J.G., Narayan, K. and Bishop, J.F. 1996. Concurrent radiotherapy and continuous ambulatory infusion 5- fluorouracil in advanced head and neck cancer. *Eur. J. Cancer*, **32A**: 249-254.

Painter, R.B. 1986. Inhibition of mammalian cell DNA synthesis by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **49**: 771-781.

Pardo, F.S., Su, M., Borek, C., Preffer, F., Dombkowski, D., Gerweck, L. and Schmidt, E.V. 1994. Transfection of rat embryo cells with mutant p53 increases the intrinsic radiation resistance. *Radiat. Res.*, **140**: 180-185.

Roberge, M., Berlinck, R.G., Xu, L., Anderson, H.J., Lim, L.Y., Curman, D., Stringer, C.M., Friend, S.H., Davies, P., Vincent, I., Haggarty, S.J., Kelly, M.T., Britton, R., Piers, E. and Andersen, R.J. 1998. High-throughput assay for G2 checkpoint inhibitors and identification of the structurally novel compound isogranulatimide. *Cancer Res.*, **58**: 5701-5706.

Schwartz, D., Almog, N., Peled, A., Goldfinger, N. and Rotter, V. 1997. Role of wild type p53 in the G2 phase: regulation of the gamma- irradiation-induced delay and DNA repair. *Oncogene*, **15**: 2597-2607.

Skladanowski, A. and Larsen, A.K. 1997. Expression of wild-type p53 increases etoposide cytotoxicity in M1 myeloid leukemia cells by facilitated G2 to M transition: implications for gene therapy. *Cancer Res.*, **57**: 818-823.

Stewart, N., Hicks, G.G., Paraskevas, F. and Mowat, M. 1995. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene*, **10**: 109-115.

Su, L.N. and Little, J.B. 1993. Prolonged cell cycle delay in radioresistant human cell lines transfected with activated ras oncogene and/or simian virus 40 T- antigen. *Radiat. Res.*, **133**: 73-79.

Thames, H.D., Jr., Rozell, M.E., Tucker, S.L., Ang, K.K., Fisher, D.R. and Travis, E.L. 1986. Direct analysis of quantal radiation response data. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **49**: 999-1009.

Table 1 : Radiosensitivity parameters for KB and KB3 cell lines, obtained after linear and quadratic fitting.

	SF_2 *	α †
KB	0.91 ± 0.06 #	0.002 ± 0.042
KB3	0.52 ± 0.21	0.312 ± 0.260

*: Surviving fraction at 2 Gy

†: Initial slope of the radiation cell survival curve

: Mean $\pm$ s.d. of three independent experiments

Table 2 : Relative increase percentage in G₂/M phase fraction after 2 Gy irradiation relative to untreated control.

	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h
KB	228 ± 35 #	334 ± 24	363 ± 42	393 ± 39	202 ± 69
KB3	194 ± 35	264 ± 46	291 ± 23	411 ± 17	219 ± 57

Mean ± s.d. of three independent experiments

In bold : statistic maximum peak values for each cell lines

Figure 1 : Radiosensitivity curves of KB (■) and KB3 (◆) head-and-neck cancer cell lines.

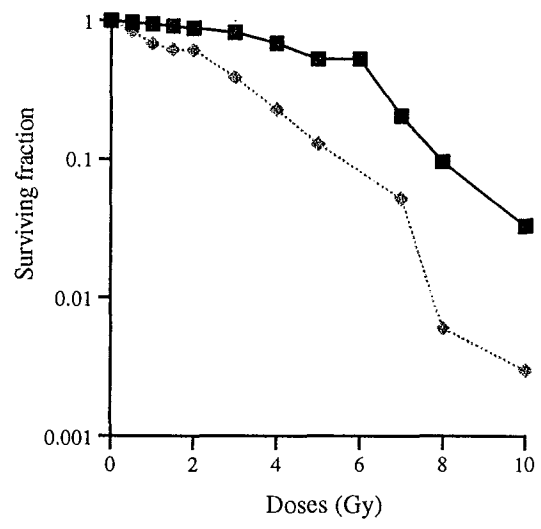
Results are the means of three independent experiments and s.d. were below to 15 %.

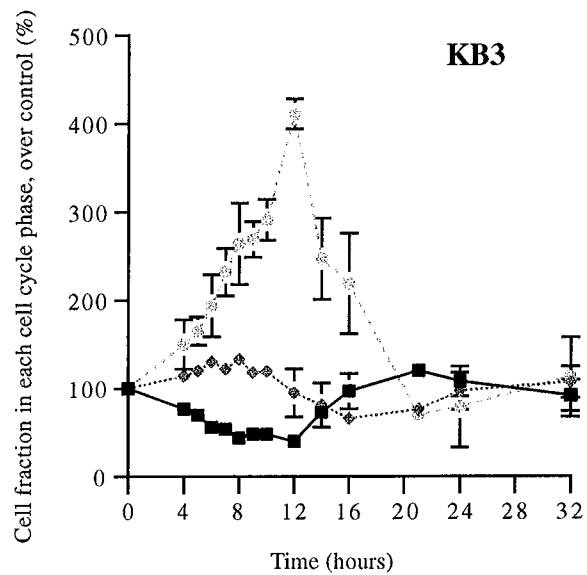
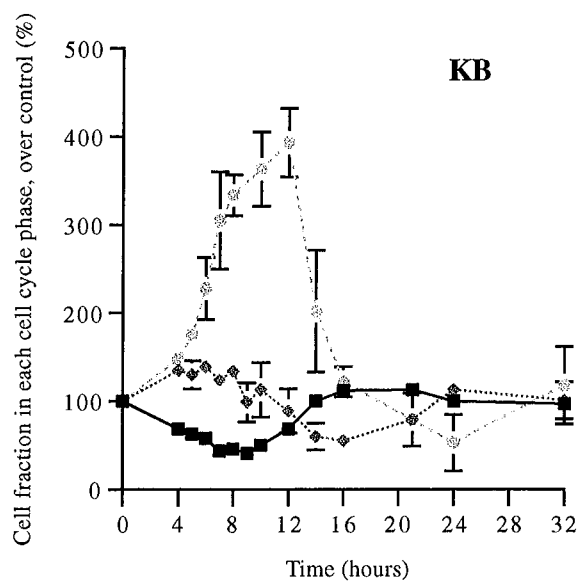
Figure 2 : Cell cycle analysis of KB and KB3 after 2 Gy irradiation. The proportion of cells in G₁/S (■), S (◆), and G₂/M (⊗) phase fraction are expressed as compared to untreated controls. (mean ± s.d. of three independent experiments).

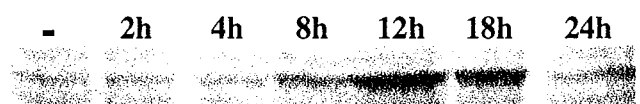
Figure 3 : Expression of P53 proteins after 2 Gy irradiation (2, 4, 8, 12, 18 and 24 h) compared to untreated sample (-) for KB and KB3 cells. Sample a was KB control in the same blot of KB3 samples. These western blot pictures are representative of three independent experiments.

Figure 4 : Bivariate flow cytometry accumulated plots of FITC-Annexin-V (FL1) stained *versus* PI (FL2)-stained for KB (A) and KB3 (B) untreated cells. Similar data were obtained in five independent experiments.

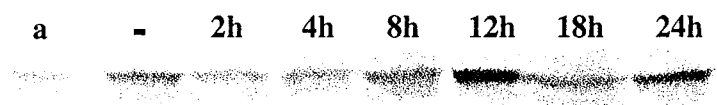
Figure 5 : Variation of apoptotic cell fraction during 24 hours after 2 Gy irradiation for KB (■) and KB3 (▣). These results are mean values of three independent experiments. * indicates a significant induction as compared to non irradiated control (p<0.05).



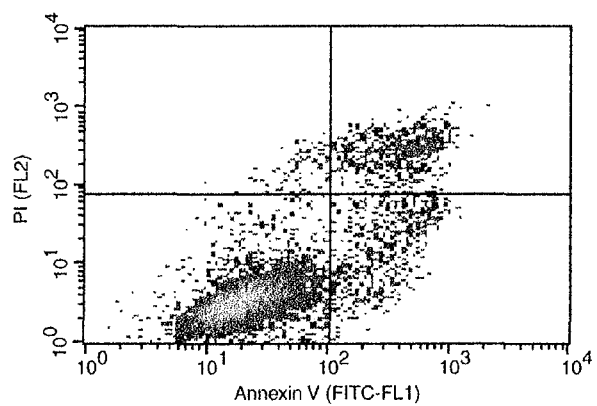
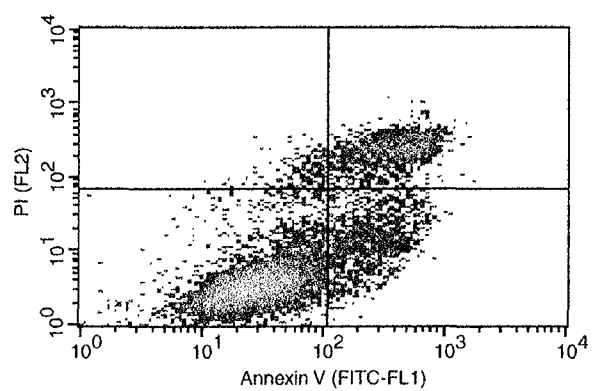


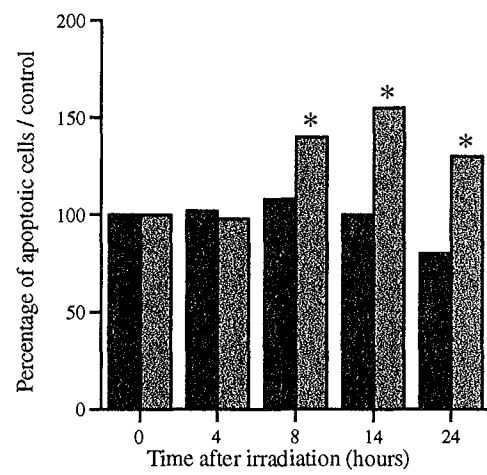


KB



KB3

A**B**



**E6 AND E7 ONCOPROTEINS EXPRESSION DO NOT PREVENT
5-FLUOROURACIL (5FU) MEDIATED G₁/S ARREST AND APOPTOSIS IN 5FU
RESISTANT CARCINOMA CELL LINES**

C Didelot *, J-F Mirjolet *, M Barberi-Heyob, C Ramacci, M-H Teiten, J-L Merlin

Centre Alexis Vautrin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, Avenue de Bourgogne, 54511
Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

* These authors contributed equally to this study

Key words : 5FU sensitivity, HPV18, E6/E7, G₁/S arrest, apoptosis, head and neck carcinoma
cell lines

Address for reprints and correspondence:

MIRJOLET Jean-François

Centre Alexis Vautrin

Laboratoire de Recherche en Oncologie

Avenue de Bourgogne

54511 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

Tel. 33 + 3 83 59 83 06

Fax. 33 + 3 83 44 76 35

E-mail : jf.mirjolet@wanadoo.be

SUMMARY

5-fluorouracil (5FU) exposure can lead to both G₁/S arrest and apoptosis induction which were dependent of P53 induction. The human papilloma virus oncoproteins (HPV), E6 and E7, inactivate respectively P53 and Rb. P53 degradation by E6 protein, leads to lack of G₁/S arrest after genotoxic stress. Overexpression of E7 protein prevents P53-induced G₁/S arrest following DNA damage. However, no study have described 5FU effect and efficacy on cancer cell lines presenting HPV 18 positive status. KB cell line and KB3 subline presented wild type P53 status and difference in 5FU sensitivity. During 5FU exposure, P53 gene and protein expression was increased in both cell lines. E6 and E7 mRNA and protein expression was decreased in KB and KB3. P53 and E6 protein expressions were inversely correlated. 5FU exposure, induced a G₁/S arrest which can be maintained or intensified by P53 *via* P21 induction expression. Finally, 5FU exposure has led to apoptosis induction related to P53 induction. In present study, 5FU exposure can induce G₁/S arrest and apoptosis by P53 dependent molecular pathway, in HPV 18 positive cells.

INTRODUCTION

Human papilloma viruses (HPV) are a family of DNA viruses that can infect, prolong the life, and transform epithelial cells, (1). The products of HPV oncogenes, E6 and E7, cooperate to immortalize and transform cells. E6 and E7 proteins inactivate respectively the cellular tumor suppressor proteins P53 and Rb (2).

E6 protein acts by stimulating degradation of P53 through the ubiquitin-dependent proteolysis pathway. The cellular protein, E6-AP (E6 associated protein), is required to mediate this P53 degradation (3). Formation of P53, E6, and E6-AP trimeric complex leads to ubiquitination of P53 and its subsequent degradation by the proteasome (4). Efficient degradation of P53 by E6 possibly accounts for the low frequency of P53 mutation in HPV positive cervical cancer. This P53 degradation leads to lack of G₁/S arrest after genotoxic stress.

E7 binds preferentially to unphosphorylated Rb and disrupts Rb-E₂F complex (5). Consequently, E₂F transcription factor is available to induce transcription of gene implicated to S phase entry. So, several studies have shown that overexpression of E7 protein prevents P53-induced G₁ arrest following DNA damage (6).

Genotoxic stress such as 5-fluorouracil (5FU) exposure, can lead to an accumulation of wild type P53 protein which is able to induce both G₁/S cell cycle arrest and apoptosis (7). We have shown recently that in cells expressing wild-type P53, 5FU-dependent apoptosis is associated with an increase in Bax protein expression (8).

P53 is a transcription factor which binds specific DNA sequences identified in the promoters of several target genes (9, 10). Among the known P53-responsive gene, p21 is an important mediator of p53-induced G₁ arrest (11, 12). P21 blocks phosphorylation of Rb by its cyclin dependent kinase inhibitor activity. Rb unphosphorylated is complexed with E₂F. This Rb-E₂F complex cannot induce transcription of gene implicated in S phase entry. So, cells are blocked in G₁/S checkpoint.

In the present study, we shown that 5FU exposure can lead to G₁/S arrest and apoptosis, associated to P53 expression variations, in spite of HPV 18 E6 and E7 protein expression.

MATERIALS AND METHODS

Materials and chemicals

Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France), culture media and additives from Invitrogen (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), except for fetal calf serum, which was obtained from Costar. Taq-polymerase, RNase H, random primers, SuperScript II® DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate were purchased from Invitrogen. Anti-bromodeoxyuridin monoclonal antibodies, P53 monoclonal antibodies (DO-7) and peroxidase-conjugated antibodies were provided by Dako (Trappes, France). HPV E6 and E7 monoclonal antibodies were purchased from Santa Cruz (Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France). All other chemicals were purchased from Sigma (S^t Quentin Fallavier, France) and were of molecular biology grade.

Cell culture

KB, head and neck carcinoma cell line, were obtained from Pr. A. Hanauske (Munich University, Germany) as part of the EORTC Preclinical Therapeutic Models Group exchange program. KB cell line is known to be HPV 18 positive (13) and was found to express wild type P53 protein (8). KB₃ subline was obtained after 5FU continuous exposure and selected by limited dilution method. Both cell lines were grown in 75 cm² plastic tissue culture flasks in RPMI 1640 medium supplemented with 9 % heat inactivated fetal calf serum, penicillin (100 i.u./ml), streptomycin (100 µg/ml) in a 37°C, 5 % CO₂ atmosphere. The cells were exposed to equitoxic 5FU concentrations inducing 50 % cell growth inhibition in both cell lines (IC₅₀) and harvested at various time (T4, T8, T12, T24 and T32).

Cytotoxicity assay

MTT assays were carried out according to a procedure previously reported (14). Briefly, cells were seeded at the initial density of 10⁴ cells per milliliter in 96-wells microtitration plates. Seventy-two hours after plating, cells were exposed for 72 h to 5FU concentrations ranging from 0.08 to 4.10⁴ µM, each concentration being tested in sextuplicate. Fifty microliters of

0.5 % 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) solution was then added in each well and incubated for 3 h at 37°C to allow MTT metabolization. The formazan crystals were dissolved by adding 50 µl per well of 25 % sodium dodecylsulfate solution and vigorous pipetting. Absorbance was measured at 540 nm using a Multiskan MCC/340 plate reader (Labsystem, Cergy-Pontoise, France). Results were expressed as relative absorbance to untreated controls. 5FU concentrations yielding 50 % growth inhibition (IC₅₀) were calculated using median-effect algorithm (15) and were expressed as the mean values of five independent experiments.

RNA isolation and RT-PCR analysis

Isolation of total RNA was performed using TRIzol® and according to the manufacturer's specifications (Life Technologies). cDNA synthesis was performed with 1 µg total RNA in a reaction volume of 20 µl containing 100 ng of random primers, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate, 10 mM dithiothreitol and 200 units SuperScript II® reverse transcriptase and incubated for 10 min at room temperature, 50 min at 42°C, followed by 15 min at 70°C. RNase-H (2.5 units) was added into each sample, then incubated for 20 min at 37°C. cDNA samples were stored at -20°C until analyzed.

. p53 , p21, E6-E7 and mdm2

p53, p21 and E6-E7 semi-quantitative PCR analysis were then performed using β-2-microglobulin (β₂m) as reference gene. 0.5 µl or 1 µl of cDNA samples were mixed, respectively for p53 or p21 amplification, in a volume of 20 µl containing 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.01 % Tween 20, 2 or 1.5 mM MgCl₂ respectively for p53 and p21, 0.2 mM dNTP, 5 µM of each 5'- and 3'-primers, and 1 unit of Taq polymerase. The primers sequences were 5'-TCTGTGACTTGACGTACTC-3' (sense) and 5'-CACGGATCTGAAGGGTGAAA-3' (antisense) for p53 (16), 5'-CCCAGTGGACAGCGAGCAGC-3' (sense) and 5'-ACTGCAGGCTTCCTGTGGGC-3' (antisense) for p21, 5'-AATGTTGCCTTAGGTCCATGC-3' (antisense), 5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3' (sense) for E6-E7 (17), and 5'-

AACACGGCGACCCTACAAGCT-3' (sense) and 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3' (antisense) for β_2m (18).

The PCR tubes were incubated for p53 or p21 and β_2m amplification, as follows. The first cycle was 5 min at 95°C, 1 min at 57°C and 1 min at 72°C. The 33 and 36 following cycles, respectively for p53 and p21 amplification, were 30 sec at 94°C, 1 min at 57°C and 1 min at 72°C. In each case, after completion of PCR cycles, the mixture was finally incubated for 8 min at 72°C. For HPV E6-E7 vs β_2m amplification, hot start PCR was used as follows. The first cycle was 5 min at 95°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C. The 28 following cycles were 1 min at 95°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C. After completion of PCR cycles, the mixture was finally incubated for 7 min at 72°C.

p53, p21 and β_2m PCR products were electrophoretised on 1 % agarose gel containing 0.1 $\mu\text{g/ml}$ of ethidium bromide. HPV18 E6-E7 and β_2m PCR products were electrophoretised on 2 % agarose gel.

Quantification was performed by UV transillumination using a Gel Doc 1000 system (Bio Rad, Ivry-sur-Seine, France). Finally, for each cDNA sample, p53/ β_2m , p21/ β_2m or E6-E7/ β_2m relative expression ratio (RER) were calculated as the ratio of the fluorescence intensities of p53, p21 or E6-E7 and β_2m PCR products bands.

Functionality of P53 protein was analyzed by RT-PCR of mdm2 p2 promoter as described previously (8).

Western blot analysis

Cells were collected in PBS, washed twice, and lysed in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 % CHAPS). Samples were incubated for 1 h on ice then stored at -80°C until analyzed. Defrosted samples received 100 μg of protein in Laemmli buffer (Bio Rad) for P53, 40 μg for E7 and 100 μg for E6, and boiled for 5 min. Samples were separated by SDS-PAGE analysis using 10 % acrylamide gels for P53 protein and 12.5 % for E6 and E7 proteins. After migration at 100 V during 2 hours, the proteins were transferred onto Immobilon-P transfer membranes (Millipore, S' Quentin Yvelynes, France) using semi-dry blotting techniques. Membranes were probed overnight at 4°C with DO-7 mouse P53 primary monoclonal antibody,

goat E6 primary monoclonal antibody or goat E7 primary monoclonal antibody. Then, the membranes were probed with horseradish peroxidase labeled secondary antibody for 1 h at room temperature (Dako). Immunological complexes were visualised by chemiluminescence detection according to the manufacturer's recommendations (Amersham-Pharmacia Biotech).

Cell cycle distribution analysis

Samples were processed using flow cytometry according to the method reported previously (19). Firstly, 200 μ M BrdU was added directly to the culture medium for 20 min followed by two washes with PBS. Cell suspensions were prepared by trypsination and resuspended in cold PBS. While being vortexed, the samples were fixed by the addition of 2 ml cold 70 % ethanol for storage at -20°C . Single nuclei suspensions were prepared by resuspending fixed cells in 0.1 N HCl and by incubating for 15 min in 2 N HCl. After three washes with PBS, nuclei were labeled with 40 μ g/ml anti-BrdU mouse monoclonal antibody in PBS containing 0.5 % normal rabbit serum, 0.5 % Tween 20. After 1 h incubation at room temperature, samples were washed with PBS, resuspended in the PBS/serum/Tween 20 solution, and stained with 20 μ g/ml fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin serum. After 1 h of incubation at room temperature, nuclei were washed twice with PBS and 25 μ g/ml propidium iodide (PI) solution in PBS was added. At least 10,000 events were collected in each sample. Bivariate distributions of BrdU content (FITC) *versus* DNA content (PI) were analyzed. FITC and PI fluorescence intensities were, respectively, recorded through a 520/530 nm band pass and 575 nm high pass filters. The data were analyzed using Multi2D software (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). The G₁/S subpopulation, corresponding to BrdU-positive cells containing G₁ DNA, was determined (19).

Apoptosis detection

Flow cytometry

Samples were processed using flow cytometry according to the method reported previously (20). Cells were seeded at 10^4 cells/ml in 75 cm² plastic tissue culture flasks. Four days later, cells were exposed to 5FU IC₅₀ from 12 to 48 hours and were incubated in 5 mM EDTA for 5

min, and washed with PBS. 10^5 cells were incubated with 100 μ l of binding buffer (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2), 5 μ l Annexin V-FITC (PharMingen, Becton Dickinson) and 2 μ l PI (50 μ g/ml). After 15 minutes at 4°C in the dark, cells were suspended in 400 μ l of binding buffer (PharMingen) and analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson) and using Cell Quest software (Becton Dickinson).

Fluorescent microscopy

Cells were seeded at 10^4 cells/ml in Slideflasks (Polylabo). Four days later, cells were exposed to 5FU IC_{50} from 12 to 48 hours and then incubated with Hoechst 33342 (5 μ g/ml solution in PBS, Molecular Probes, Interchim, Asnières, France) and PI (10 μ g/ml, Sigma), during 30 min at 37°C (21). Fluorescence microscopy analysis was then performed with excitation at 330-385 nm and emission at 420-460 nm using epifluorescence microscopy (AX70 Provis, Olympus, Rungis, France). Cells were classified as "intact cells" with uncondensed chromatin and PI unstained, "apoptotic cells" exhibiting apoptotic features (i.e., perinuclear condensed chromatin and apoptotic bodies) and PI stained in later phase. The "necrotic cells" were stained by PI and presented uncondensed chromatin. All analyses were performed by morphological examination of at least 150 cells and repeated at least 3 times.

Statistical analysis

Unless indicated, all data are mean values $\pm$ standard deviation (S.D.) calculated from at least four independent experiments. Spearman's rank correlation was used to test the correlation between the different parameters and Mann and Whitney U test was used to test for the significance level between independent variables.

RESULTS

• 5FU sensitivity

KB₃ was 3.3 fold more resistant to 5FU than KB cell line, with IC₅₀ of 154±14 µg/ml for KB, and 513±69 µg/ml for KB₃.

• P53 status and expression

As already reported, sequencing of exons 2 to 9 of p53 gene revealed a wild type status for KB cell line (8). No mutation was detected in p53 gene analysis for KB₃ subline (data not shown).

Basal p53 gene expression was lower in KB₃ than in KB cells (79±9 %, p=0.0139). During 5FU exposure, p53 gene expression was increased in both cell lines. However, significant increase appeared from T16 in KB, while it started only at T32 in KB₃. KB displayed higher increase of p53 gene expression than KB₃, with statistically significant difference from T16, and maximum induction of 3.4±0.9 fold and 1.9±0.4 fold for KB and KB₃ cell lines respectively (Figure 1A).

In untreated cells, KB displayed a lower P53 protein expression than KB₃ (Figure 2a). In KB cell line, 5FU IC₅₀ treatment led to a decrease in P53 protein expression at T8 and an increase from T12 up to T32. In KB₃ subline, P53 expression was decreased during first 12 hours of 5FU IC₅₀ exposure, then this expression was increased from T24 up to T32 (Figure 2b).

• P53 protein functionality as transcription factor: mdm2 transcript expression

Mdm2 mRNA expression with or without 5FU exposure during 24 h was reported in figure 3.

Constitutive mdm2 transcript expression was significantly higher in KB3 than in KB cell line. A significant induction of mdm2 transcription at p53 responsive element was observed with a 3.5±1.0 fold increase in mdm2 transcript in KB *versus* 1.5±0.5 fold in KB3 cell line.

• HPV 18 status and expression

No difference was observed in HPV 18 E6-E7 basal gene expression. After 5FU exposure, HPV 18 E6-E7 gene expression decreased from T24 in KB cells, and from T32 in KB₃ cell line. Difference in E6-E7 expression was statistically significant between both cell lines from T24, with KB₃ displaying higher E6-E7 gene expression than KB (Figure 1B).

Constitutive E6 protein expression was higher in KB cells than in KB₃ cells (Figure 2a). After 5FU exposure, E6 protein expression was decreased at T4, increased at T8 and decreased again at T24 and T32 in KB cell line. In KB₃ subline, E6 protein expression was decreased at T4 and T8, then increased from T12, and decreased again from T32 (Figure 2b).

Constitutive E7 protein expression presented the same level for KB and KB₃ cell lines (Figure 2a). In KB and KB₃ cell lines, no significant E7 protein expression variation was observed during the first twelve hours of 5FU treatment. This expression decreased from T24 in KB and from T32 in KB₃ cell line (Figure 2b).

• p21 gene expression

Constitutive p21 gene expression was 1.8 ± 0.2 fold higher in KB than in KB₃ cell line. p21 mRNA was statistically over-expressed from T16 of 5FU exposure for both cell lines. But, KB displayed a 1.4 fold higher increase than KB₃ at T16 and T24. Both cell line displayed the same over-expression at T32 (Figure 1C).

• Cell cycle analysis

BrdU analysis shown that both cell lines were delayed at G₁/S boundary as previously defined ((19) and Figure 4). KB cell line was delayed earlier in G₁/S boundary than KB₃ with increase in 5.7 ± 1.1 fold of G₁/S population for KB at 16 hours *versus* only 3.0 ± 0.6 fold for KB₃ (Figure 4).

• Apoptosis detection

As displayed by Annexin V flow cytometry analysis, 5FU treatment resulted in significant apoptosis from T24, increasing up to 285 ± 38 % at T32 in KB cells (Figure 5).

KB₃ subline displayed also significant apoptosis, but only from T32 and up to 301 ± 16 % at T48. A delay of 12 hours in apoptosis initiation was observed for KB3 *versus* KB cell.

Delay of significant apoptosis detection was confirmed by fluorescent microscopy analysis of nuclear DNA fragmentation (Figure 6).

This analysis shown that significant apoptosis was detected 12 hours earlier for KB than KB₃.

DISCUSSION

Cellular behavior after 5FU exposure was described widely (7, 8). In cells expressing functional P53 protein, 5FU exposure led to both G₁/S arrest and apoptosis induction. These two phenomena were related to P53 induction controlled by mRNA induction (22) and mostly by protein stabilization (10). After DNA damage, the central role for wild type P53 protein was to inhibit DNA synthesis by controlling cell cycle (i.e. by G₁/S arrest induction) and apoptosis initiation (10, 23). 5FU presented papillomavirus antiviral activity, and this treatment was used clinically in cervicovaginal human papillomavirus infected (24). However, no study have described 5FU effect and efficacy on cancer cell lines presenting HPV 18 positive status. Nevertheless, several genotoxic stress such as mitomycin C and cisplatin led to strong repression of E6-E7 expression in HPV positive cells, and induced apoptosis (25).

KB cell line has been reported to be HPV 18 positive (13). KB₃ subline was selected after continuous 5FU exposure of KB cells. KB₃ subline was 3.3 fold more resistance to 5FU than parental KB cells. KB and KB₃ cells expressed E6 and E7 viral oncoproteins and a wild type P53 protein (8). P53 transcriptional functionality was demonstrated through mdm2 mRNA expression. According to our results in head and neck carcinoma cells, Butz *et al.* have described that P53 is inducible and can activate p21 expression in response to DNA-damaging agents, despite the presence of E6 in HPV-infected cervical carcinoma cells (26).

In this present study, 5FU induced G₁/S arrest in KB and KB₃ cells despite E6 and E7 protein expression. This arrest can be explained by several simultaneous mechanisms. On the one hand, E6 protein expression decreased in relation with increase in P53 protein expression. This induced p21 mRNA increase correlating with G₁/S arrest establishment. The P53 protein expression was related inversely to E6 protein expression. This phenomenon can be explained by E6 function which led to P53 degradation. However, relation between P53 and E6 protein expression variation is still controversial (27, 28). On the other hand, E7 expression decreased after exposure to 5FU for 12 or 24 hours, in KB and KB₃ respectively. This decrease can lead to G₁/S arrest since E7 induces S phase entry by E₂F release from Rb-E₂F complex (5). E7 can repress P53 transcriptional activity to interact with TBP (TATA box binding protein) which is

essential to induce transcription (29). So, decrease in E7 expression can allow p21 transcription induction by P53 protein, and G₁/S arrest. However, decrease in E6 and E7 protein expression cannot totally explain G₁/S arrest induction, because decrease appeared after initiation of this cell cycle arrest. Thus, early G₁/S arrest induction may be explained by TS inhibition after 5FU exposure. Inhibition of TS activity results in inhibition of DNA synthesis. In both cell line, TS inhibition can be displayed by a ternary complex formation induced by 5FU exposure (data not show). Thus, cells have not able to synthesize DNA and stopped at G₁/S checkpoint (19). So, P53 was not implicated in G₁/S arrest initiation, but this transcription factor could be involved in the keeping or reinforcement of this arrest. In contrast, DNA synthesis inhibition was probably responsible of this G₁/S arrest after 5FU exposure.

Consecutively to G₁/S arrest, 5FU exposure led to apoptosis in both cell lines. Appearance of these two phenomena was statistically correlated ($r=0.857$ for KB and $r=0.825$ for KB₃, $p<0.001$). E6 protein was described to inhibit apoptosis, induced by different genotoxic agents (30). In KB and KB₃, E6 expression decreased respectively after 24 and 32 hours 5FU exposure. This decrease led to induction of P53 protein level and apoptosis induction.

Other HPV protein could be related to apoptosis regulation. E2 HPV protein can also be implicated in apoptotic mechanism *via* a dependent- or independent P53 pathway. However, E2 was expressed only if HPV virus is free and not when it is integrated in genomic DNA as in our cellular model (31).

Chemosensitivity difference between KB parental cell line and its KB₃ subline can be explained by G₁/S arrest and apoptosis induction mechanisms induced by 5FU exposure. On the one hand, there is difference in both G₁/S arrest magnitude and delay to reached maximum block. This delay was related to delay in induction of P53 expression, still in relation to decrease in E6 expression, and mRNA p21 expression. Finally, delay in G₁/S arrest was correlated to 12 hours delay between KB and KB₃ apoptosis induction. In both cell line, G₁/S arrest and apoptosis were induced, so variation in chemosensitivity could be related to differences in cell cycle response (32) and in time to initiate cellular mechanisms.

P53 plays an essential role in apoptosis induction and 5FU sensitivity (7). HPV-positive cell lines were often compared to unfunctional mutated P53 cell lines but this theory is still

controversed. On one hand, in oncogenics HPV-infected cells, P53 was not available for the transduction of G₁/S arrest or apoptosis induction after genotoxic signals as actinomycin D (33). On the other hand, despite the presence of E6 in HPV-infected cells, P53 is inducible and can activate p21 gene which is implicated in G₁/S arrest, in response to DNA damage (25, 26).

In conclusion, 5FU exposure can induce G₁/S arrest and apoptosis by P53 dependent molecular pathway, in HPV 18 positive cells. Chemoresistance to 5FU in KB₃ subline, may be explained by time delay to initiate the molecular mechanisms implicated in cell cycle arrest and in apoptosis induction. So, in addition to 5FU antiviral action, its antitumoral property was kept in cancer cell lines infected by HPV 18. Thus HPV-positive tumoral cells can be treated by 5FU, since these cells have kept capacity to induce apoptosis after this chemotherapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was performed within the framework of the "Pôle Européen de Santé Région Lorraine Communauté Urbaine du Grand Nancy" and was supported by the French "Ligue contre le Cancer".

REFERENCES

1. Lochmuller H, Johns T, Shoubbridge EA. Expression of the E6 and E7 genes of human papillomavirus (HPV16) extends the life span of human myoblasts. *Exp Cell Res* 1999;248(1):186-93.
2. Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv* 1992;12:197-217.
3. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* 1991;10(13):4129-35.
4. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* 1993;13(2):775-84.
5. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(10):4549-53.
6. Demers GW, Foster SA, Halbert CL, Galloway DA. Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(10):4382-6.
7. Yang B, Eshleman JR, Berger NA, Markowitz SD. Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 1996;2(10):1649-57.
8. Mirjolet JF, Barberi Heyob M, Didelot C, Peyrat JP, Abecassis J, Millon R, et al. Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *British Journal of Cancer* 2000;10(10):1380-1386.
9. Selivanova G, Wiman KG. p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv Cancer Res* 1995;66:143-80.

10. Kastan MB, Zhan Q, el Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992;71(4):587-97.
11. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75(4):817-25.
12. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995;55(22):5187-90.
13. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J* 1984;3(5):1151-7.
14. Barberi Heyob M, Griffon G, Merlin JL, Weber B. Sequence-dependent growth-inhibitory effects of the in vitro combination of fluorouracil, cisplatin, and dipyridamole. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;33(2):163-70.
15. Chou TC, Talalay P. Application Of The Median-Effect Principle For The Assessment Of Low Dose Risk Of Carcinogens And For The Quantitation Of Synergism And Antagonism Of Chemotherapeutic Agents. In: Harrap KR, Connors TA, editors. *New Avenues in developmental Cancer Chemotherapy*. New-York: Academic Press; 1987. p. 37-64.
16. Aguilar Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M. Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *Int J Cancer* 1996;69(2):114-9.
17. Czegledy J, Evander M, Hernadi Z, Gergely L, Wadell G. Human papillomavirus type 18 E6* mRNA in primary tumors and pelvic lymph nodes of Hungarian patients with squamous cervical cancer. *Int J Cancer* 1994;56(2):182-6.
18. Gussow D, Rein R, Ginjaar I, Hochstenbach F, Seemann G, Kottman A, et al. The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol* 1987;139(9):3132-8.
19. Mirjolet JF, Didelot C, Barberi Heyob M, Merlin JL. G1/S but not G0/G1 cell fraction is related to 5-Fluorouracil cytotoxicity. *Cytometry* 2002;in press.

20. Didelot C, Barberi-Heyob M, Bianchi A, Becuwe P, Mirjolet JF, Dauca M, et al. Constitutive NF-kappaB activity influences basal apoptosis and radiosensitivity of head-and-neck carcinoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51(5):1354-60.
21. Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P, et al. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 1994;17(1):59-65.
22. Sun X, Shimizu H, Yamamoto K. Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. *Mol Cell Biol* 1995;15(8):4489-96.
23. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(16):7491-5.
24. Holmes MM, Weaver SH, 2nd, Vermillion ST. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of 5-fluorouracil for the treatment of cervicovaginal human papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999;7(4):186-9.
25. Butz K, Geisen C, Ullmann A, Spitkovsky D, Hoppe-Seyler F. Cellular responses of HPV-positive cancer cells to genotoxic anti-cancer agents: repression of E6/E7-oncogene expression and induction of apoptosis. *Int J Cancer* 1996;68(4):506-13.
26. Butz K, Whitaker N, Denk C, Ullmann A, Geisen C, Hoppe-Seyler F. Induction of the p53-target gene GADD45 in HPV-positive cancer cells. *Oncogene* 1999;18(14):2381-6.
27. Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *Embo J* 1992;11(8):3045-52.
28. Chen TM, Chen CA, Hsieh CY, Chang DY, Chen YH, Defendi V. The state of p53 in primary human cervical carcinomas and its effects in human papillomavirus-immortalized human cervical cells. *Oncogene* 1993;8(6):1511-8.
29. Massimi P, Banks L. Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 proteins. *Virology* 1997;227(1):255-9.
30. Jackson S, Storey A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 2000;19(4):592-8.

31. Desaintes C, Demeret C. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol* 1996;7(6):339-47.
32. Pickard M, Dive C, Kinsella AR. Differences in resistance to 5-fluorouracil as a function of cell cycle delay and not apoptosis. *Br J Cancer* 1995;72(6):1389-96.
33. Kesis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, et al. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(9):3988-92.

Figure 1 :

p53/ β_2m (A), E6-E7/ β_2m (B) and p21/ β_2m (C) RER expression were normalised over control and presented as percentage of p53, E6-E7 and p21 transcript induction after IC₅₀ 5FU exposure for KB (□) and KB₃ (■) cell lines (mean $\pm$ SD of three independent experiments). Statistically significant difference from the control was indicated as * $p < 0.05$.

Figure 2 :

Expression of P53, E6 and E7 proteins before *a*) and after *b*) IC₅₀ 5FU exposure (4, 8, 12, 24 and 32 h) for KB (A) and KB₃ (B) cells. These western blot pictures were representative of three independent experiments.

Figure 3 :

Mdm2 transcript relative expression ratio vs β_2m before (-) and after 24 h IC₅₀ 5FU exposure for KB (□) and KB₃ (■) cell lines. Results are means values $\pm$ SD of two independent experiments. Statistically significant difference from the control was indicated as * $p < 0.05$.

Figure 4 :

Cell accumulation in G₁/S checkpoint after IC₅₀ 5FU exposure for KB (■) and KB₃ (■) cell lines. Data was normalised and presented as percentage of G₁/S arrest induction (mean $\pm$ SD of three independent experiments). Statistically significant difference between two cell lines at the same time, was indicated as * $p < 0.05$.

Figure 5 :

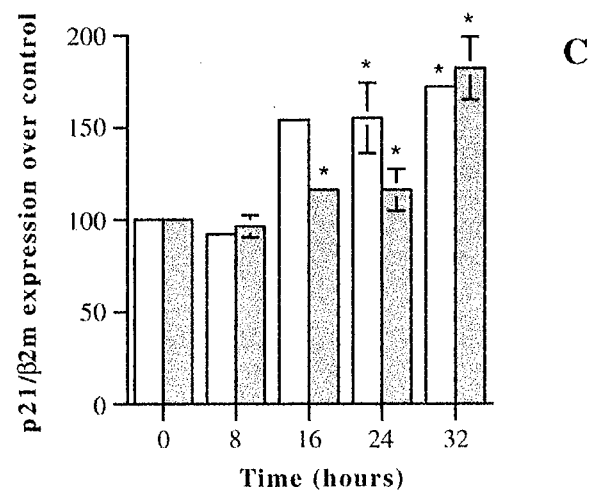
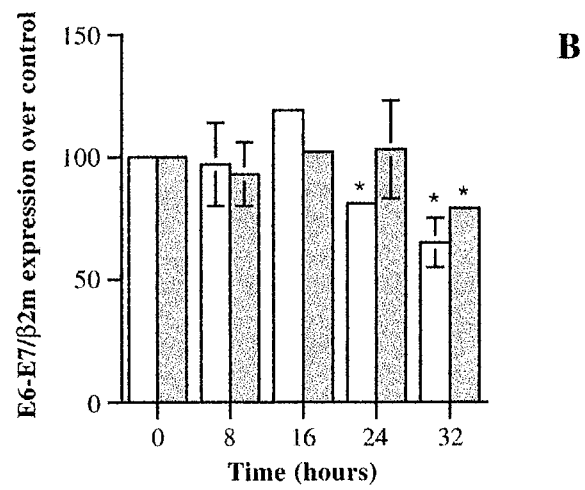
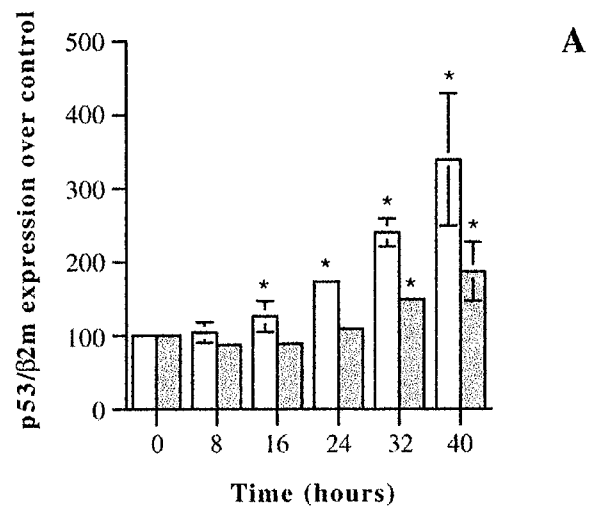
Effect of IC₅₀ 5FU treatment on KB (□) and KB₃ (■) cells on the apoptotic cell fraction. Apoptotic cells were detected by annexin V assay. The results are expressed as relative variation in apoptotic cell fraction as compared to untreated controls (mean $\pm$ SD of three independent experiments). Statistically significant difference from the control was indicated as * $p < 0.05$.

Figure 6 :

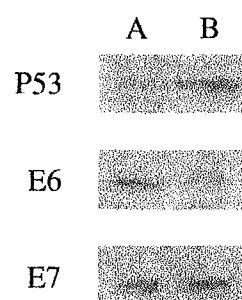
Morphological DNA features stained with Hoechst 33342 and cells with permeabilized membrane with PI. Filter sets used were Hoechst 33352 (excitation BP 330-385 nm, emission BP 420-460 nm) and PI (excitation BP 460-490 nm, emission LP 590 nm).

These pictures represented KB (A) and KB₃ (B) cells before (a) and after 12 h (b), 24 h (c), 32 h (d) or 48 h (e) IC₅₀ 5FU exposure.

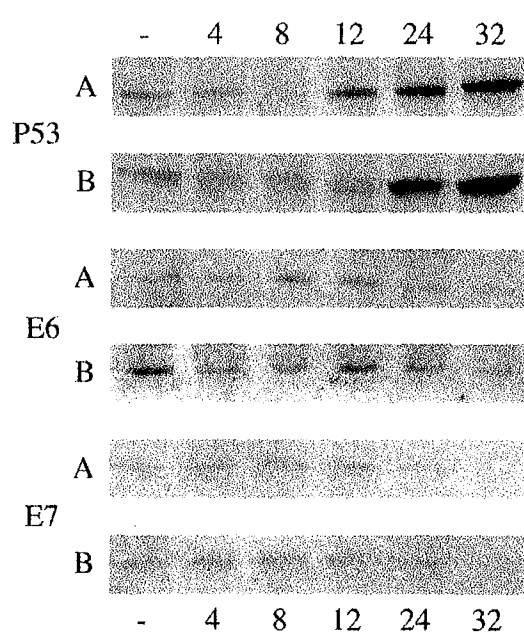
These results were representative of three independent experiments.

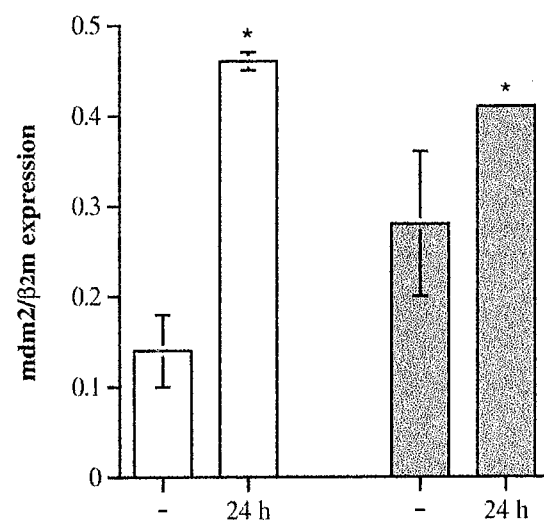


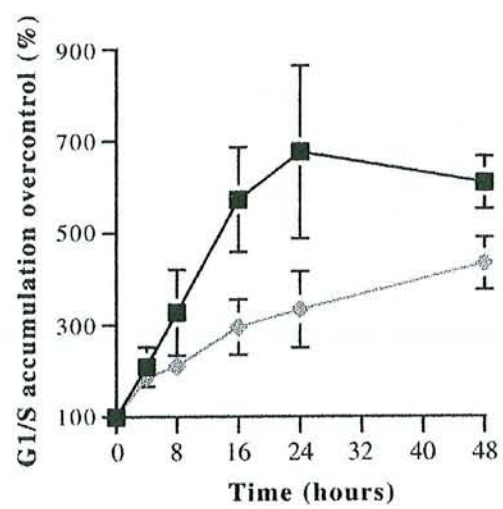
a)

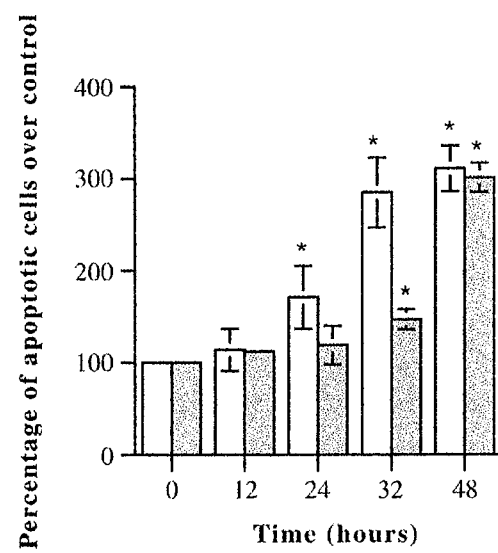


b)

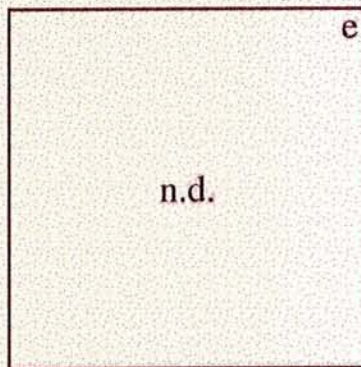
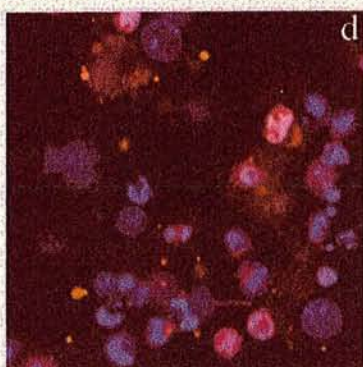
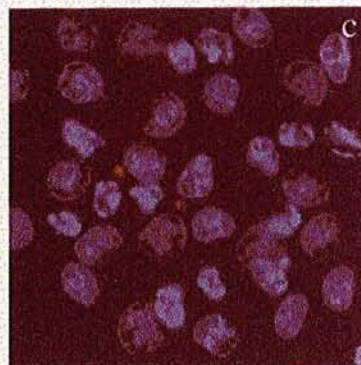
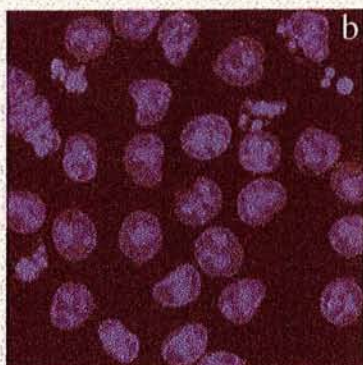
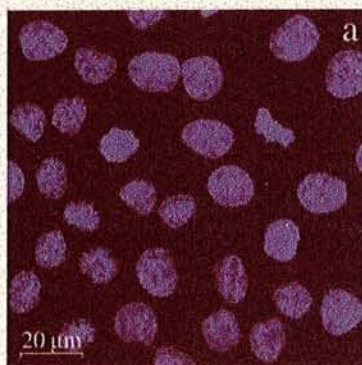




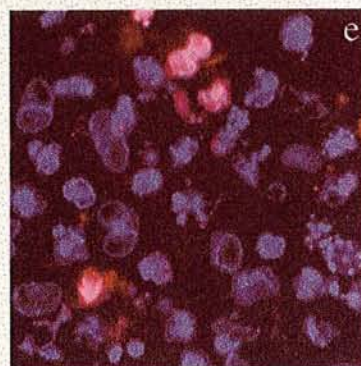
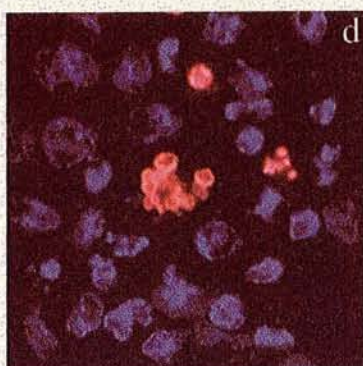
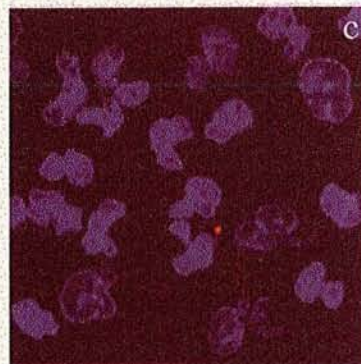
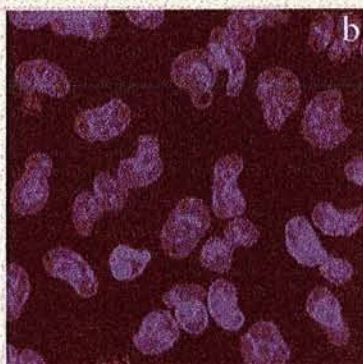
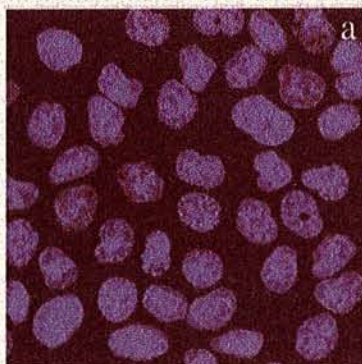




A



B





Prénom, Nom : **Céline DIDELOT**

Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 16 AVR. 2002 n°651

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



DOCTORAT DE L'UHP
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Présentée et soutenue publiquement le 3 avril 2002

Par Céline DIDELOT

RESUME

Dans le cadre de l'étude de la réponse aux traitements anticancéreux, de nombreuses équipes se sont intéressées aux comportements cellulaires après exposition aux stress génotoxiques. Les mécanismes cellulaires qu'ils induisent, tels que des blocages dans le cycle ou la mise en place de l'apoptose, ainsi que la sensibilité des cellules, varient selon la nature de ces stress. La protéine P53 occupe un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire ainsi que dans la régulation de l'apoptose. Cependant, dans de nombreux cancers, la fonctionnalité de la protéine P53 est abrogée par des mutations ou des délétions de son gène. D'autres facteurs peuvent entraîner la perte de fonctionnalité de P53. Ainsi, la protéine E6 codée par le virus du papillome humain (HPV), est responsable de la dégradation de P53. Les études portant sur le comportement de cellules HPV positives exposées à des stress génotoxiques comme le 5-fluorouracile (5FU) ou les radiations ionisantes restent rares.

La répartition des cellules dans le cycle cellulaire ainsi que l'induction de l'apoptose ont été étudiées après exposition au 5FU ou aux radiations ionisantes, pour les lignées KB et KB3 de carcinome humain de la tête et du cou exprimant une protéine P53 sauvage et infectées par HPV-18.

Les deux types de stress induisent une augmentation de l'expression de la protéine P53, en relation avec une diminution de l'expression de la protéine virale E6. Ainsi, malgré le statut HPV des cellules, la protéine P53 reste inductible et fonctionnelle.

Le 5FU entraîne un arrêt des cellules en G₁/S alors qu'après irradiation les cellules se bloquent en G₂/M. L'arrêt en G₁/S apparaît avant l'induction de P53, mais celle-ci peut participer au maintien de ce blocage puisqu'elle induit l'expression de P21. Par contre, la mise en place de l'arrêt en G₂/M est indépendante de P53 mais celle-ci pourrait participer à la levée de ce blocage. Enfin, les deux types de stress peuvent induire de l'apoptose P53-dépendante après exposition au 5FU et P53-indépendante après irradiation. Selon le type de stress génotoxique, le comportement cellulaire peut être différent et l'implication de la protéine P53 sur les mécanismes cellulaires induits, peut se faire à différents niveaux même pour des lignées HPV-positives.

Cependant, la protéine P53 n'est pas la seule à posséder un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. En effet, le facteur de transcription NF- κ B a été décrit comme étant impliqué dans ces mécanismes cellulaires ainsi que dans la sensibilité des cellules à un stress tel qu'une irradiation. Pour les lignées KB et KB3, une différence d'activité constitutive de NF- κ B a été mise en évidence. La modulation de cette activité par exposition des cellules au TNF α et à la dexaméthasone, a permis de démontrer que l'activité constitutive de NF- κ B était en relation avec le phénomène d'apoptose spontanée et le niveau de radiosensibilité. Ainsi, cette activité constitutive serait un paramètre prédictif de la radiosensibilité des cellules et son inhibition avant traitement pourrait être une nouvelle approche de radiopotentialisation.

MOTS CLES

P53, 5-fluorouracile, radiations ionisantes, HPV-18, cycle cellulaire, apoptose, NF- κ B.