

Université de Sherbrooke

**Résistance au cisplatine dans le cancer ovarien :  
rôle de la protéine anti-apoptotique Bcl-2?**

par

Sylvie Bélanger

Département de microbiologie et infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc.)

Février 2003



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-80559-X

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
RÉSUMÉ	1
INTRODUCTION	3
1. Le cancer ovarien	3
2. Bases moléculaires de la résistance	4
2.1. Mécanisme d'action du cisplatine	5
2.2. Mécanismes impliqués dans le phénomène de résistance	5
3. Apoptose	11
3.1. Changements morphologiques et moléculaires pendant l'apoptose	12
3.2. Caspases	13
3.3. Deux principales voies d'activation des caspases	14
3.3.1. Voie des récepteurs de mort cellulaire	15
3.3.2. Voie mitochondriale	15
3.4. Les protéines de la famille Bcl-2	16
3.5. Implication de la famille Bcl-2 dans le cancer	20
4. Stratégies pour inhiber un ARNm ou une protéine	24
4.1. Qu'est-ce qu'un anticorps monovalent modifié ou scFv?	25
4.2. Avantages de l'approche des scFvs	27
5. Nos buts et objectifs	29

<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>30</b>
<b>6. Lignées cellulaires et réactifs</b>	<b>30</b>
<b>7. Plasmides</b>	<b>31</b>
<b>8. Transfections</b>	<b>32</b>
<b>8.1. Transfections transitoires</b>	<b>32</b>
<b>8.2. Clones stables</b>	<b>33</b>
<b>8.3. Antisens Bcl-2</b>	<b>34</b>
<b>8.3.1. Analyse de l'effet de l'antisens Bcl-2 sur l'expression de la protéine Bcl-2</b>	<b>34</b>
<b>8.3.2. Analyse de l'effet de l'antisens Bcl-2 sur la survie cellulaire</b>	<b>35</b>
<b>9. Analyse par immunobuvardage</b>	<b>36</b>
<b>9.1. Préparation des échantillons protéiques</b>	<b>36</b>
<b>9.2. Transfert sur membrane de PVDF</b>	<b>36</b>
<b>9.3. Blocage, anticorps et lavages</b>	<b>37</b>
<b>9.4. Révélation au ECL+</b>	<b>38</b>
<b>10. Immunoprécipitation</b>	<b>39</b>
<b>11. Immunofluorescence</b>	<b>39</b>
<b>12. Essai de cytotoxicité</b>	<b>41</b>
<b>13. Essais d'apoptose</b>	<b>42</b>
<b>13.1. Coloration de Hoechst</b>	<b>42</b>
<b>13.2. Essais de caspase-3</b>	<b>43</b>

<b>RÉSULTATS</b>	<b>44</b>
<b>14. Caractérisation des cellules d’ovaire normales et cancéreuses</b>	<b>44</b>
<b>14.1. Expression de la protéine Bcl-2 dans les cellules normales et cancéreuses</b>	<b>44</b>
<b>14.2. Sensibilité des cellules d’ovaire normales et cancéreuses au cisplatine</b>	<b>44</b>
<b>14.3. Activation de la cascade apoptotique par le cisplatine dans les différentes lignées de cancer ovarien</b>	<b>49</b>
<b>14.4. Statut de p53 dans les lignées cellulaires ovariennes cancéreuses</b>	<b>52</b>
<b>15. Validation du scFv Bcl-2 dans les vecteurs d’expression eucaryotiques pSTCF et pLTR</b>	<b>53</b>
<b>15.1. Localisation intracellulaire du scFv Bcl-2</b>	<b>57</b>
<b>15.2. Vérification de la séquence du scFv Bcl-2</b>	<b>60</b>
<b>15.3. Interaction du scFv avec la protéine Bcl-2</b>	<b>60</b>
<b>15.4. Le scFv Bcl-2 inhibe l’interaction entre Bcl-2 et Bax, une protéine qui hétérodimérise naturellement avec Bcl-2</b>	<b>66</b>
<b>16. Établissement de clones stables exprimant le scFv Bcl-2 dans les lignées de cancer ovarien SKOV-3 et SKOV-3ip1</b>	<b>70</b>
<b>16.1. Analyse de l’expression du scFv Bcl-2 dans les clones stables</b>	<b>71</b>
<b>17. Effets biologiques de l’inhibition de la protéine Bcl-2</b>	<b>74</b>
<b>17.1. L’inhibition de Bcl-2 par le scFv CYTO/Bcl-2 semble sensibiliser les cellules au cisplatine dans les SKOV-3 mais non dans les SKOV-3ip1</b>	<b>74</b>

<b>17.2.</b>	L'inhibition par un antisens dirigé contre la protéine Bcl-2 ne sensibilise pas les cellules au cisplatine dans les SKOV-3ip1, bien qu'une diminution de l'expression de la protéine soit observée	<b>77</b>
<b>17.3.</b>	L'expression du scFv Bcl-2 n'influence pas les niveaux d'apoptose dans les clones stables KDEL et CYTO dans la lignée SKOV-3	<b>78</b>
<b>17.4.</b>	Courbes de croissance dans les clones KDEL et CYTO dans les cellules SKOV-3 en absence de drogue	<b>81</b>
<b>DISCUSSION</b>		<b>86</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>		<b>100</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>		<b>102</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>		<b>103</b>

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

<b>Tableau 1.</b>	Composantes des mélanges FuGENE : ADN pour les transfections simple, double et triple	<b>33</b>
<b>Tableau 2.</b>	Composantes des mélanges FuGENE : AS pour l'analyse de l'effet de l'AS Bcl-2 sur l'expression de la protéine Bcl-2 dans les cellules SKOV-3ip1	<b>35</b>
<b>Tableau 3.</b>	Anticorps primaires et secondaires employés pour les immunobuvardages	<b>38</b>
<b>Tableau 4.</b>	Anticorps primaires et secondaires employés pour les immunofluorescences	<b>41</b>
<b>Tableau 5.</b>	Statut clinique des patientes chez qui les cellules d'ovaire normales ou cancéreuses ont été prélevées pour développer les lignées correspondantes	<b>45</b>
<b>Figure 1.</b>	Liens formés dans l'ADN par le cisplatine	<b>6</b>
<b>Figure 2.</b>	Schéma des principales voies menant à l'apoptose	<b>13</b>
<b>Figure 3.</b>	Domaines des protéines de la famille Bcl-2	<b>17</b>
<b>Figure 4.</b>	Classement des membres de la famille Bcl-2	<b>19</b>
<b>Figure 5.</b>	Structure d'un scFv	<b>26</b>
<b>Figure 6.</b>	Expression de la protéine Bcl-2 et sensibilité au cisplatine de cellules ovariennes normales et cancéreuses	<b>47</b>
<b>Figure 7.</b>	Le cisplatine induit la mort cellulaire par l'activation de la cascade	<b>51</b>

apoptotique indépendamment de la sensibilité des cellules au cisplatine et à la staurosporine

<b>Figure 8.</b>	Analyse du statut de p53 dans différentes lignées de cancer ovarien	<b>54</b>
<b>Figure 9.</b>	Représentation schématique des vecteurs pSTCF.KDEL et CYTO et du vecteur pLTR	<b>56</b>
<b>Figure 10.</b>	Expression du scFv Bcl-2 dans des cellules eucaryotes	<b>58</b>
<b>Figure 11.</b>	Les scFvs peuvent être ciblés dans différentes localisations intracellulaires	<b>59</b>
<b>Figure 12.</b>	Analyse de la séquence du scFv Bcl-2	<b>61</b>
<b>Figure 13.</b>	Les domaines fonctionnels de la protéine Bcl-2	<b>63</b>
<b>Figure 14.</b>	Le scFv Bcl-2 interagit avec la protéine Bcl-2 <i>in vitro</i>	<b>65</b>
<b>Figure 15.</b>	L'interaction entre la protéine Bcl-2 et son partenaire naturel Bax est modulé par le scFv Bcl-2	<b>69</b>
<b>Figure 16.</b>	Expression des scFvs Bcl-2 KDEL et CYTO dans les clones stables établis dans les cellules SKOV-3 et SKOV-3ip1	<b>73</b>
<b>Figure 17.</b>	L'inhibition de Bcl-2 par le scFv CYTO/Bcl-2 semble sensibiliser les cellules au cisplatine dans les SKOV-3 et non dans les SKOV-3ip1	<b>76</b>
<b>Figure 18.</b>	L'inhibition par un antisens dirigé contre la protéine Bcl-2 ne sensibilise pas les cellules au cisplatine	<b>80</b>
<b>Figure 19.</b>	L'expression du scFv Bcl-2 n'influence pas les niveaux d'apoptose dans les clones stables KDEL et CYTO dans la lignée SKOV-3	<b>83</b>
<b>Figure 20.</b>	Courbes de croissance dans les clones KDEL et CYTO dans les SKOV-3	<b>84</b>



**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ADNc	ADN complémentaire
Apaf-1	« Apoptotic protease activating factor »
ARNm	ARN messenger
AS	Antisens
BH	« Bcl-2 homology domain »
Casp	Caspase
CDDP	<i>Cis</i> -diamminedichloroplatinum (II) ou cisplatine
CDR	Régions déterminant la complémentarité
Cyt c	Cytochrome c
DD	« Death domain »
FBS	Sérum fœtal bovin
Fv	Région de charpente
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase
IAPs	« Inhibitors of apoptotic proteins »
IP	Immunoprécipitation
$\Delta\psi_m$	Potentiel membranaire
MDR1	« Multidrug resistance »
MMR	« DNA mismatch repair »

NER	« Nucleotide excision repair »
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
PI-3K	Phosphatidyl-inositol 3-kinase
PS	Phosphatidylsérine
RE	Réticulum endoplasmique
RFC	Récepteur de facteur de croissance
RMC	Récepteur de mort cellulaire
ScFv	Anticorps monovalent modifié
TM	Domaine d'ancrage aux membranes
TNFR	« Tumor necrosis factor receptor »

## RÉSUMÉ

Parmi tous les cancers gynécologiques, le cancer ovarien est le plus mortel. Une femme sur soixante-dix développera un cancer ovarien au cours de sa vie. Les femmes qui en sont atteintes se présentent généralement avec un cancer métastatique au moment du diagnostic en raison de l'absence de symptômes précoces. Bien qu'environ 70% des femmes répondent au traitement initial, les réponses sont transitoires et 80% des patientes récidivent. Les femmes qui rechutent développent généralement une résistance clinique au traitement de chimiothérapie. Moins de 30% de ces femmes survivent plus de 5 ans suite au diagnostic.

Plusieurs évidences suggèrent que des membres impliqués dans le contrôle de l'activation de la cascade apoptotique et particulièrement les membres de la famille de protéines Bcl-2 pourraient jouer un rôle dans le phénomène de résistance observé dans les tumeurs ovariennes.

Le but de cette étude est de déterminer l'importance relative de la protéine Bcl-2 dans le phénomène de résistance clinique à la chimiothérapie dans le cancer ovarien, plus précisément au cisplatine. L'analyse de l'expression de la protéine Bcl-2 dans des cellules d'ovaire normales et cancéreuses a démontré une surexpression de la protéine dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules d'ovaire normales, mais aucune corrélation entre l'expression de la protéine Bcl-2 et la sensibilité au cisplatine des cellules d'ovaire cancéreuses n'a pu être établie.

Pour pouvoir mieux évaluer le rôle de la protéine Bcl-2 dans le phénomène de résistance, nous avons utilisé un anticorps monovalent modifié (scFv) dirigé contre cette

dernière. Ce scFv agit essentiellement comme un inhibiteur spécifique de la protéine Bcl-2 dans les cellules. Nous avons validé le scFv Bcl-2 en analysant sa séquence, en vérifiant sa localisation dans la cellule au niveau du cytoplasme ou du réticulum endoplasmique (RE), en vérifiant son interaction *in vitro* avec sa cible, et en nous assurant de sa spécificité et de son affinité pour la protéine Bcl-2.

Nous avons ensuite établi des clones stables exprimant le scFv Bcl-2 de façon inductible dans les lignées de cancer ovarien SKOV-3 et SKOV-3ip1. Nous avons démontré que l'expression du scFv Bcl-2 est régulable suite à l'ajout de doxycycline dans les clones SKOV-3 et SKOV-3ip1. Nous avons aussi démontré que l'inhibition de la protéine Bcl-2 par le scFv Bcl-2 ou un antisens dirigé contre l'ARNm de Bcl-2 ne sensibilise pas les cellules SKOV-3ip1 au cisplatine, suggérant que cette protéine n'a pas de rôle significatif dans le phénomène de résistance dans cette lignée de cancer ovarien. Cependant, l'inhibition de la protéine Bcl-2 par le scFv Bcl-2 dirigé au niveau du cytoplasme dans la lignée de cancer ovarien SKOV-3 sensibilise ces cellules à de faibles concentrations de drogue. Cette différence de sensibilisation ne semble pas être causée par une modification de l'activation de la cascade apoptotique ou par une différence dans le statut de p53. Cette différence observée à de faibles concentrations de drogues dans le clone CYTO dans les cellules SKOV-3 semble plutôt reliée à un arrêt ou un ralentissement dans la progression du cycle cellulaire. D'autres expériences seront nécessaires pour confirmer ou infirmer cette observation.

Mots clef : cancer ovarien, résistance, cisplatine, protéine Bcl-2, scFv

## INTRODUCTION

### 1. Le cancer ovarien

Le cancer ovarien est le quatrième cancer en importance chez les femmes. Parmi tous les cancers gynécologiques, il est certainement le plus mortel. Une estimation effectuée en 2001 aux États-Unis révèle que 23 400 nouveaux cas de cancer ovarien ont été diagnostiqués et qu'environ 13 900 femmes ont succombé à la suite de ce type de cancer au courant de la même année (GREENLEE et al., 2001). Étant donné la présentation clinique insidieuse et non spécifique de la maladie, en plus du manque de méthodes de dépistage efficaces, ce type de cancer est détecté très tardivement (BARNES et al., 2002). Environ 70% des femmes sont diagnostiquées à des stades très avancés de la maladie (stades III et IV) et ont déjà développé des métastases au niveau de la cavité péritonéale. Bien que la survie à cinq ans soit de 88 et 59% respectivement pour les stades I et II du cancer, les stades plus avancés III et IV n'entraînent une survie que d'approximativement 30 et 18% respectivement (RELES et al., 2001). Généralement, ce type de tumeur est caractérisé par une bonne réponse primaire à la thérapie standard. Cette thérapie inclut une chirurgie cytoréductive, qui consiste à enlever le plus grand nombre de tumeurs possible dans la cavité abdominale, suivie d'un traitement systémique de chimiothérapie (CUELLO et al., 2001). Dans les cas de cancer ovarien, la thérapie de première ligne contient un composé à base de platine, généralement le cisplatine (CDDP). Bien que les réponses initiales au traitement approchent les 70%, ce sont des réponses qui sont transitoires et environ 80% des patientes rechutent, présentant des tumeurs qui sont habituellement résistantes au traitement chimiothérapeutique initial (HAMAGUCHI,

et al., 1993). Ainsi, le facteur majeur limitant l'efficacité du traitement chez des patientes atteintes d'un cancer ovarien à un stade avancé est l'acquisition d'une résistance clinique.

## **2. Bases moléculaires de la résistance**

La résistance aux agents anticancéreux est un problème majeur dans le traitement de diverses tumeurs que les cliniciens rencontrent fréquemment. Les bases moléculaires de la résistance clinique à la chimiothérapie des tumeurs solides ne sont pas très bien comprises (PICHÉ et RANCOURT, 2001; GOTTESMAN, 2002). La résistance aux drogues peut être intrinsèque, nous l'observons alors lorsque des tumeurs sont exposées pour une première fois à l'agent anticancéreux, ou acquise lors d'un traitement de chimiothérapie, situation où les tumeurs ne sont plus affectées par les drogues auxquelles elles étaient sensibles initialement. Ces définitions de résistance aux drogues sont évidemment basées sur des critères cliniques, c'est-à-dire si le patient répond cliniquement ou non au traitement administré (PICHÉ et RANCOURT, 2001). Certains mécanismes de résistance, comme la perte d'un récepteur à la surface cellulaire ou d'un transporteur pour une drogue, le métabolisme spécifique ou la modification par mutation de la cible spécifique d'une drogue, entraînent une résistance à seulement quelques drogues apparentées. Dans de tels cas, l'utilisation de plusieurs drogues avec des mécanismes d'entrée et des cibles différents permettent généralement d'obtenir des traitements efficaces avec de bons taux de guérison. Trop souvent cependant, les cellules utilisent des mécanismes de résistance qui leur confèrent simultanément une résistance à plusieurs drogues structurellement et fonctionnellement non apparentées (GOTTESMAN,

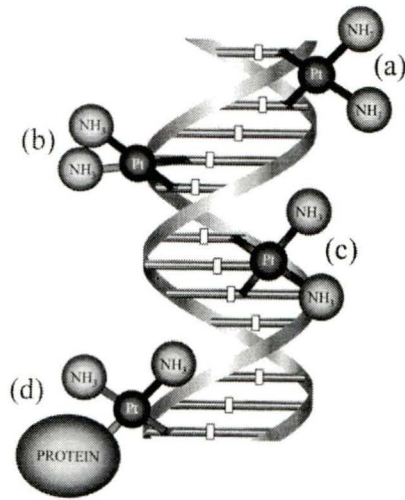
2002). Ce phénomène de résistance à plusieurs drogues peut découler de divers changements se produisant au sein des cellules en question.

### **2.1. Mécanisme d'action du cisplatine**

Le cisplatine, ou *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) est généralement utilisé comme traitement de première ligne dans les cas de cancer ovarien, seul ou en combinaison avec le taxol. Le cisplatine est un agent thérapeutique possédant une forte activité anti-tumorale. Il endommage la cellule en formant des liens intra- et interbrins dans l'ADN, dans l'ARN et également entre l'ADN et les protéines avoisinantes (Figure 1). Ces pontages entraînent par la suite une inhibition de la réplication de l'ADN et de la transcription de l'ARN, ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire et l'initiation du processus de mort cellulaire programmée. Cependant, les mécanismes moléculaires qui relient la formation de ces liens dans l'ADN avec ces événements biologiques ne sont pas très bien compris (KARTALOU et ESSIGMANN, 2001; JORDAN et CARMO-FONSECA, 2000).

### **2.2. Mécanismes impliqués dans le phénomène de résistance**

Les multiples mécanismes impliqués dans le phénomène de résistance incluent ceux empêchant les drogues cytotoxiques d'atteindre leurs cibles, et ceux qui contrôlent les réponses cellulaires en aval de l'interaction drogue/cible (HAMILTON et JOHNSON, 2000). Dans ce contexte, une modification du transport des drogues dans la cellule a été associée au phénomène de résistance. La surexpression de la glycoprotéine-P, produit du gène MDR1 (« multidrug resistance »), agit comme une pompe au niveau de la membrane cellulaire et



**Figure 1. Liens formés dans l'ADN par le cisplatine**

(a) lien interbrin, (b) lien 1,2-intrabrin, (c) lien 1,3-intrabrin, (d) lien protéine/ADN.

(GONZALEZ, et al., 2001)



permet l'expulsion de la drogue à l'extérieur des cellules. Cette fonction de transporteur permet aux cellules avec de hauts niveaux de glycoprotéine-P de maintenir de faibles niveaux intracellulaires de drogue chimiothérapeutique (SOOD et BULLER, 1998). Dans le cancer ovarien, le rôle de l'expression du gène MDR1 n'est pas très clair. À la suite de biopsies de tumeurs ovariennes, certains n'ont observé aucune expression du gène MDR1, tandis que d'autres ont décelé des tumeurs positives chez plusieurs patientes, qu'elles aient subi ou non des traitements de chimiothérapie au moment de la biopsie (HAMILTON et JOHNSON, 2000). Des études plus approfondies seront nécessaires pour éclaircir le rôle du gène MDR1 ainsi que son importance dans le cancer ovarien.

D'autre part, une variété de voies de détoxication peuvent permettre aux cellules d'inactiver une drogue cytotoxique. Les mécanismes médiant une résistance aux drogues dans le cancer ovarien auxquels le plus d'attention a été porté incluent une augmentation des niveaux de glutathion (GSH), de glutathion-S-transférases (GSTs) et des métallothionéines. La conjugaison spontanée du GSH avec des drogues comme le cisplatine a été démontrée *in vitro*, et de hauts niveaux de GSH ont été associés avec une résistance aux agents à base de platine. Les glutathion-S-transférases font partie d'une famille de protéines dont les membres catalysent la conjugaison du GSH avec des drogues électrophiles; elles sont aussi impliquées dans la résistance aux drogues à base de platine. En raison de leur contenu élevé en cystéines, il a aussi été suggéré que les métallothionéines inactivent les drogues anticancéreuses électrophiles. Même si ces molécules ne sont pas spécifiques au cisplatine, il a été montré qu'elles confèrent une résistance à travers l'activation de plusieurs voies, telles que celles impliquées dans le « turnover » et l'inactivation de la drogue en question. De plus, des

niveaux intracellulaires élevés de glutathion ont été retrouvés dans des cellules d'ovaires cancéreuses humaines et de rats résistantes au cisplatine (COUKOS et RUBIN, 1998; HAMILTON et JOHNSON, 2000).

L'augmentation de la réparation de l'ADN et de la tolérance des dommages causés à l'ADN sont deux autres mécanismes permettant à la cellule de développer une résistance. Une augmentation de l'activité du système de « Nucleotide Excision Repair » (NER) expliquerait l'augmentation de la réparation observée, tandis qu'un mauvais fonctionnement du système de « DNA Mismatch Repair » (MMR) justifierait la tolérance des dommages causés par la drogue. Ces deux mécanismes ont été associés à la résistance au cisplatine dans différents types de tumeurs, incluant de nombreux cas de cancer ovarien (HAMILTON et JOHNSON, 2000). Les mécanismes cellulaires mentionnés ci-dessus agissent principalement en réduisant les niveaux de dommages induits par la drogue utilisée.

Une explication alternative est que le phénotype de tolérance aux dommages causés par les drogues à base de platine soit le résultat d'une diminution de l'expression ou l'inactivation d'une ou plusieurs composantes de la voie de la mort cellulaire programmée (apoptose). La séquence des événements qui se produisent à la suite de la formation des pontages dans l'ADN causés par le cisplatine menant à la mort cellulaire est encore mal connue; cependant, les cellules traitées montrent un phénotype et des caractéristiques biochimiques associés à l'apoptose. L'observation de ces caractéristiques apoptotiques à la suite d'un traitement sur ces cellules suggère la présence d'une voie qui permet la détection des dommages et la transmission d'un signal à la machinerie apoptotique. Le processus signalant la mort cellulaire pourrait dépendre de toute une série de facteurs, incluant la phase

du cycle cellulaire, l'influence de voies de signalisation mitogènes et l'expression des membres de la famille de gènes Bcl-2. À la suite d'une exposition au cisplatine, les cellules tumorales s'arrêtent principalement dans la phase G<sub>2</sub> du cycle cellulaire. Pendant ce temps, les cellules tentent de réparer les dommages et reçoivent une série de signaux déterminant leur sort. Ce processus dynamique n'est actuellement pas bien compris, cependant de nombreux groupes tentent d'élucider quelles protéines pourraient participer à ces événements. Par exemple, l'arrêt du cycle cellulaire en G<sub>1</sub> suivant des dommages causés à l'ADN est associé avec des niveaux et une activité élevés de p53 (HAMILTON et JOHNSON, 2000). Ainsi, p53 est un régulateur critique de l'apoptose en réponse aux drogues anticancéreuses. Le cisplatine et d'autres agents endommageant l'ADN induisent la stabilisation et la translocation nucléaire de p53. Un des effecteurs en aval de p53 est p21<sup>waf-1/CIP-1</sup>, un inhibiteur de kinase cycline-dépendante qui médie l'arrêt du cycle cellulaire. Quoique bien caractérisé comme régulateur du cycle cellulaire, p21<sup>waf-1/CIP-1</sup> pourrait aussi protéger les cellules de l'apoptose. À la suite de diverses études, il a été conclu que des mutations de p53 résultent en une perte du contrôle du « checkpoint » en G<sub>1</sub>/S et abrogent l'habileté de p53 à médier l'apoptose en réponse à des dommages dans l'ADN (DEMPKE et al., 2000). Bien que la perte de p53 corrèle avec la progression maligne des cancers ovariens, une association avec la résistance aux drogues est plutôt controversée dans ce type de cancer (TILLY et JOHNSON, 1999; EL-DEIRY, 1999; VELCULESCU et EL-DEIRY, 1996). Des mutations dans p53 ont été détectées plus fréquemment dans des cancers de stades III et IV (50%), comparativement aux stades I et II (15%). De plus, un p53 mutant inactif est fortement exprimé dans les formes plus agressives de carcinomes ovariens (EL-DEIRY, 1999). L'inactivation de p53 peut aussi se produire sans

mutation, par exemple par la surexpression de Mdm-2, qui cible p53 pour sa dégradation (TILLY et JOHNSON, 1999). Cependant, d'autres études ont montré que le cisplatine conserve sa cytotoxicité sur les cellules de cancer ovarien exprimant un p53 mutant (DE FEUDIS et al., 1997). De plus, une évaluation immunohistochimique de p53 de carcinomes ovariens de stades III et IV primaires et de récurrences n'a pas permis de démontrer une différence d'expression consistante de la protéine (EL-DEIRY, 1999; DEBERNARDIS et al., 1997, LANNI et al., 1997). L'ensemble de ces données suggère que bien que p53 semble être impliqué dans la chimiosensibilité initiale des tumeurs primaires, son rôle dans le développement de la résistance aux drogues des cas de récurrences est beaucoup moins clair, suggérant l'existence d'autres voies.

En effet, d'autres facteurs, comme certains membres de la famille des récepteurs de facteurs de croissance épidermiques, tel que HER/neu et EGFR, activent directement ou indirectement la cascade apoptotique. Ces deux récepteurs sont surexprimés dans de nombreux types de cancers humains. Leur surexpression est associée à de mauvais pronostics et à une baisse de sensibilité à la chimiothérapie (KOLATA 1987; FOX et al., 1994; UHLMAN et al., 1995). La liaison de ces récepteurs par leurs ligands stimule leur dimérisation et active un domaine interne possédant une activité tyrosine kinase (RYAN et al., 2000). De manière plus importante, ils augmentent l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, permettant une tolérance plus importante des cellules aux lésions causées par des agents endommageant l'ADN (PAGE et al., 2000). D'autres données récentes suggèrent qu'une autre voie de signalisation, qui requiert l'activité de la phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI-3K) et de la sérine/thréonine kinase appelée Akt, pourrait entraîner la

phosphorylation de Bad (DATTA et al., 1997; RANCOURT et al., 1998; DELPESO et al., 1996; DOUGLAS et al., 1996). Lorsque Bad est phosphorylée, elle ne peut former d'hétérodimères avec Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub>, et ainsi ne peut neutraliser leur activité anti-apoptotique. Ainsi, de nombreux facteurs influencent directement ou indirectement les voies de la cascade apoptotique p53-dépendente ou -indépendante. Certaines données de la littérature confirment que la modulation de tels facteurs peut contribuer au phénomène de résistance à la chimiothérapie dans divers types de cancers.

### **3. Apoptose**

Dans la plupart des organismes multicellulaires, la mort cellulaire programmée ou apoptose, considérée comme un suicide cellulaire, joue un rôle important dans la maintenance de l'homéostasie cellulaire (GUPTA, 2001). Cependant, le dysfonctionnement de la cascade apoptotique semble aussi impliqué dans une vaste gamme de conditions pathologiques, incluant des maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, immunologiques, et certainement dans le cancer (ZIMMERMANN et al., 2001). L'apoptose est étroitement régulée par une série de gènes qui promouvoient la mort ou la survie cellulaire. La signalisation pour l'induction de l'apoptose se fait à travers de multiples voies indépendantes qui peuvent être initiées par le déclenchement d'événements intra- ou extracellulaires. Même si un grand nombre de stimuli semblent entraîner le processus apoptotique, il n'y a que deux voies de signalisation majeures : la voie des récepteurs de mort cellulaire (« death receptor ») et la voie mitochondriale (Figure 2). Il y a des évidences qui suggèrent que, dans certaines conditions et dans certains types cellulaires, ces deux voies pourraient interagir (GUPTA, 2001). Toutes

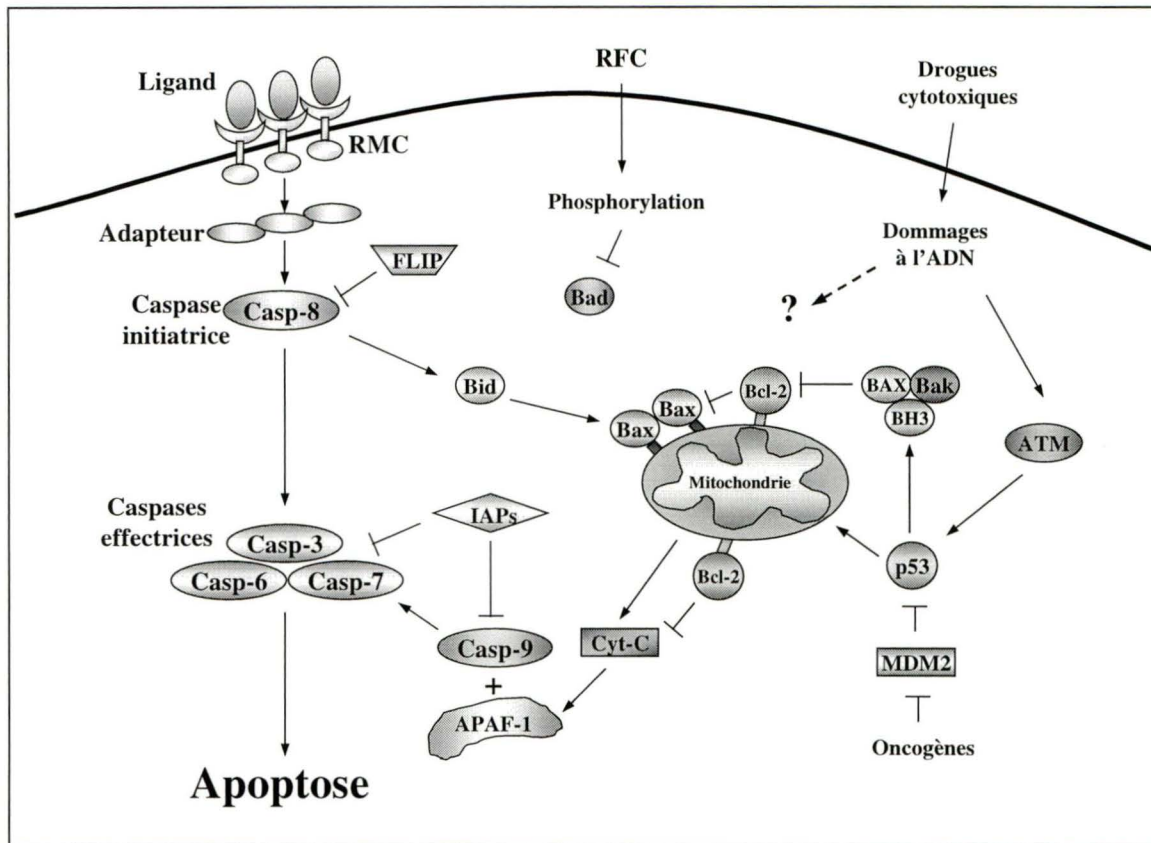
les voies de signalisation apoptotiques convergent en l'activation d'une machinerie de destruction cellulaire qui est activée par une famille de cystéines protéases, les caspases. Le démantèlement et l'élimination des cellules condamnées sont accomplis par la protéolyse des constituants cellulaires vitaux, la dégradation de l'ADN, et la phagocytose par des cellules avoisinantes (STRASSER et al., 2000; THORNBERRY et LAZEBNIK, 1998).

### **3.1. Changements morphologiques et moléculaires pendant l'apoptose**

Des analyses en microscopie électronique ont permis l'identification des changements morphologiques se produisant pendant l'apoptose, incluant la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, le rétrécissement du cytoplasme, le gonflement de la membrane plasmique et le démantèlement de la cellule en de petites vésicules, nommées corps apoptotiques (THORNBERRY et LAZEBNIK, 1998). Certains ont également rapportés le gonflement de la membrane mitochondriale externe et la relâche de cytochrome c. Les changements moléculaires induits durant l'apoptose incluent le clivage de l'ADN internucléosomal et la redistribution aléatoire des phosphatidylsérines (PS) entre les feuillets interne et externe de la membrane plasmique (STRASSER et al., 2000).

### **3.2. Caspases**

Un groupe de cystéines protéases, les caspases, sont essentielles pour la mort cellulaire programmée chez toute une variété d'espèces. En fait, les caspases sont des régulateurs



**Figure 2. Schéma des principales voies menant à l'apoptose**

Ce schéma résume et représente quelques unes des composantes de la voie mitochondriale et de la voie des récepteurs de mort cellulaire menant ultimement à l'apoptose. Les composantes suivies d'un trait avec une extrémité en forme de flèche promouvoient l'apoptose, tandis que celles suivies d'une extrémité plate l'inhibent. Abréviations utilisées : RMC, récepteur de mort cellulaire; RFC, récepteur de facteur de croissance; Casp, caspase; Cyt-C, cytochrome c. Figure inspirée de JOHNSTONE et al., 2002.

critiques de l'initiation de l'apoptose. De nombreuses caspases ont été identifiées chez les mammifères; ces enzymes reconnaissent des motifs particuliers et clivent leurs substrats du côté carboxy-terminal d'un résidu aspartate. Les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs, les procaspases, ayant une activité enzymatique intrinsèque très faible. Le précurseur est habituellement converti en une enzyme active par clivage protéolytique. Ceci est médié par une autre protéase ou par auto-catalyse, processus déclenché par la liaison de cofacteurs ou le déplacement d'inhibiteurs (THORNBERRY et LAZEBNIK, 1998). Les enzymes complètement actives sont des hétérotétramères composés de deux sous-unités identiques d'environ 20 kDa et de deux sous-unités identiques d'environ 10 kDa. Certaines évidences indiquent que l'agrégation de certaines procaspases est suffisante pour promouvoir leur auto-clivage et ainsi leur auto-activation, d'où origine leur nom de caspases initiatrices (caspases-8 et -9). Ces caspases initiatrices déclenchent ainsi une cascade de clivages menant finalement à l'activation des caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7). Certaines caspases, particulièrement les caspases effectrices, clivent et inactivent toute une série de constituants cellulaires vitaux (STRASSER et al., 2000).

### **3.3. Deux principales voies d'activation des caspases**

Les caspases initiatrices sont activées par une vaste gamme de signaux apoptotiques. Deux cascades principales ont été proposées chez les cellules de mammifères. La première voie implique la famille des récepteurs de mort cellulaire (« the tumor necrosis factor receptor family ») et la seconde passe par la mitochondrie, impliquant les protéines de la famille Bcl-2.



### **3.3.1. Voie des récepteurs de mort cellulaire**

La première voie menant à l'activation des caspases origine de la signalisation des récepteurs de mort cellulaire, c'est-à-dire en passant par les récepteurs de la famille des « tumor necrosis factor receptors » (TNRF) incluant TNFR1, Fas (CD95), DR3 et les « TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo-2L receptors ». Les récepteurs de mort cellulaire ont une section intracellulaire d'acides aminés en C-terminal du récepteur, appelée « death domain » (DD). La liaison de ligands sur ces récepteurs mène à leur trimérisation et au recrutement de protéines adaptatrices au DD cytoplasmique. La molécule adaptatrice permet ensuite le recrutement de la procaspase-8, cette dernière est alors activée protéolytiquement et clive diverses protéines, incluant la procaspase-3, ce qui résulte en son activation et en l'achèvement de la mort cellulaire programmée (THORNBERRY et LAZEBNIK, 1998; WOLF et al., 2001; SUN et al., 1999; ZIMMERMANN et al., 2001; HERR et DEBATIN, 2001).

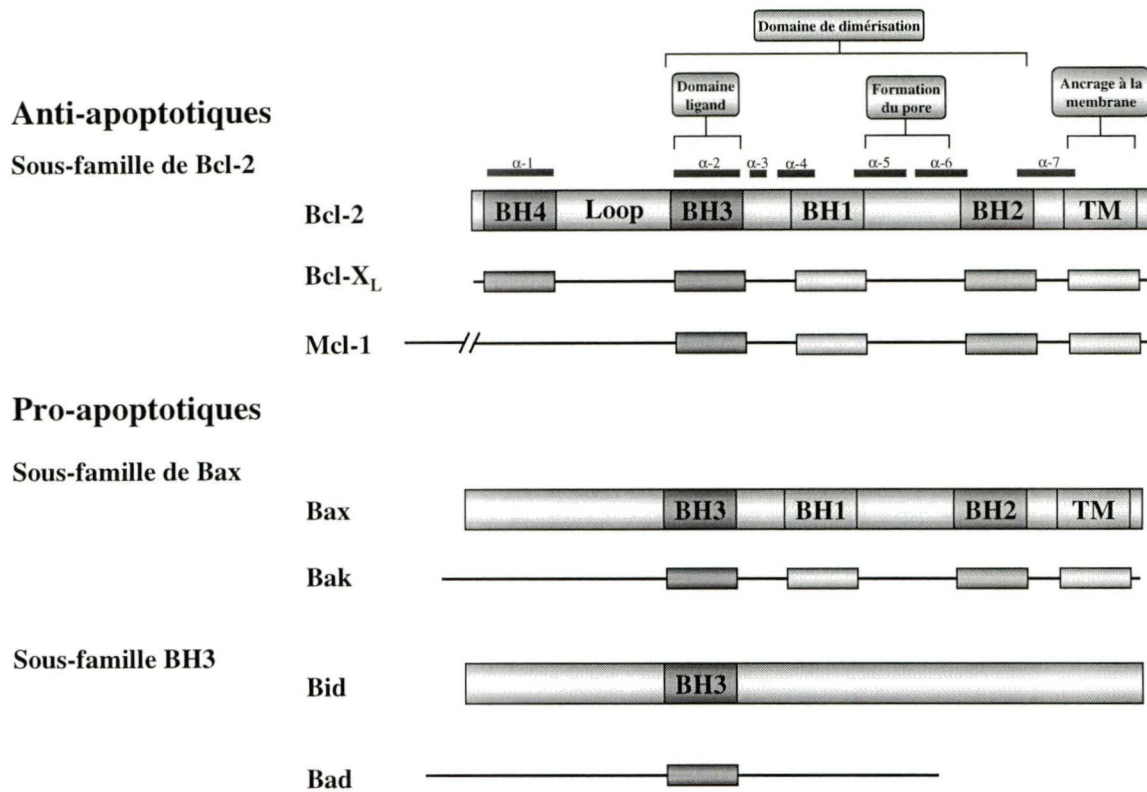
### **3.3.2. Voie mitochondriale**

Dans la seconde voie menant à l'activation des caspases, ce sont des drogues cytotoxiques tels que les agents chimiothérapeutiques et les radiations UV qui induisent l'activation via la voie mitochondriale. Cette voie implique l'intégration mitochondriale de signaux apoptotiques et la relâche subséquente de cytochrome c dans le cytoplasme (WOLF et al., 2001). Les membres de la famille de protéines Bcl-2 jouent un rôle important dans la régulation de cette voie. Suivant la relâche de cytochrome c, les caspases sont activées et la cellule entre en apoptose. Ceci se produit lors de la formation de l'apoptosome [comprenant le

cytochrome c, Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), et la procaspase-9], dépendant de l'ATP ou du dATP dans la cellule. Apaf-1 est une protéine contenue dans le cytoplasme. Lorsqu'elle est liée par le cytochrome c, ce dernier induit son oligomérisation, et ce nouveau complexe recrute alors la procaspase-9. Contrairement à d'autres caspases, la procaspase-9 ne semble pas être activée simplement par son clivage, mais doit plutôt être liée à Apaf-1 pour être activée. L'apoptosome peut ensuite recruter les procaspases effectrices (procaspases-3, -6 et -7) qui sont alors clivées et activées par la caspase-9 active. Ces caspases effectrices détruisent ensuite la cellule par la protéolyse de substrats cellulaires clés, tels que la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) et les lamines (GREEN et REED, 1998; THORNBERRY et LAZEBNIK, 1998; WOLF et al., 2001; SUN et al., 1999; ZIMMERMANN et al., 2001). Ces deux voies activatrices des caspases peuvent également être régulées par diverses protéines, incluant les protéines inhibitrices de l'apoptose, les « inhibitor of apoptotic proteins » (IAPs), qui affectent autant les caspases initiatrices qu'effectrices (JOHNSTONE et al., 2002).

### **3.4. Les protéines de la famille Bcl-2**

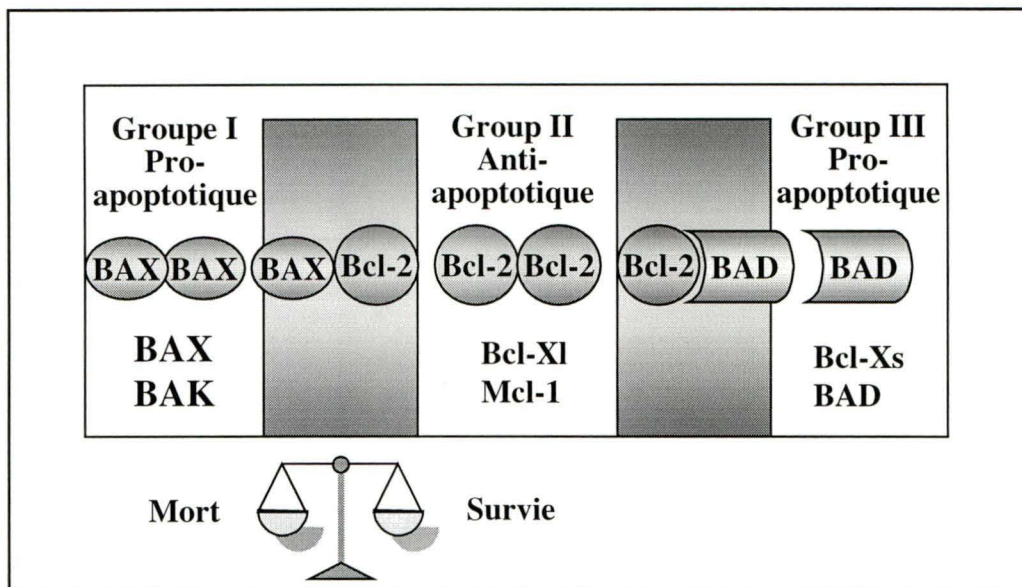
Le gène encodant la protéine Bcl-2 a initialement été découvert comme un proto-oncogène dans un lymphome folliculaire de cellule-B humain où fut observée sa surexpression suite à une translocation chromosomale t(14;18) (TSUJIMOTO et al., 1985). Subséquemment, il a été identifié chez les mammifères comme homologue du répresseur apoptotique ced-9 chez *C. elegans*. Depuis, au moins 19 membres de la famille Bcl-2 ont été



**Figure 3. Domaines des protéines de la famille Bcl-2**

Trois sous-familles sont décrites dans cette figure : les membres de la sous-famille de Bcl-2 promouvoient la survie cellulaire, tandis que les sous-familles de Bax et BH3 facilitent l'entrée en apoptose. Les domaines BH1 à BH4 sont des motifs conservés chez ces protéines. Les membres de la sous-famille de Bax ressemblent beaucoup à ceux de Bcl-2, mais ne possèdent pas le domaine BH4, qui semble être essentiel pour la fonction anti-apoptotique des protéines de la sous-famille Bcl-2. Comme l'indique bien son nom, la sous-famille BH3 ne possède que ce domaine, et les protéines de ce sous-groupe sont les seules à être dépourvues du domaine d'ancrage aux membranes.

identifiés chez les mammifères. Ces membres peuvent posséder jusqu'à quatre motifs conservés, les « Bcl-2 homology domains », nommés BH1, BH2, BH3 et BH4 (Figure 3). Les membres de la famille Bcl-2 peuvent être sous-divisés en trois catégories selon leur fonction et leur structure (Figure 4). Les membres anti-apoptotiques, comme Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, qui suppriment la mort cellulaire ont quatre domaines BH, tandis que les membres pro-apoptotiques n'ont pas le domaine BH4. Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent être divisés en deux sous-groupes : la sous-famille Bax, incluant Bax, Bak et Bok, dont les membres contiennent les domaines BH1, BH2 et BH3; et les protéines n'ayant que le domaine BH3, telles que Bid, Bad et Bim. Ce domaine BH3 est requis pour l'activité pro-apoptotique de ces protéines (MARTINOUE et GREEN, 2001). Plusieurs membres de la famille Bcl-2 contiennent aussi un domaine hydrophobique en C-terminal, qui permet à ces protéines de s'ancrer dans les membranes intracellulaires (ZIMMERMANN et al., 2001; MARTINOUE et GREEN, 2001). Cette région permet la localisation des protéines au niveau des membranes de la mitochondrie, du noyau et du réticulum endoplasmique (STRASSER et al., 2000). La perméabilisation de la membrane mitochondriale est régulée par les actions opposées des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (JOHNSTONE et al., 2002). La sensibilité des cellules à un signal apoptotique est déterminée, en partie, par le ratio entre les protéines pro- et anti-apoptotiques. Des études de localisation cellulaire ont permis de démontrer que Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> résident principalement dans la membrane externe mitochondriale (SUN et al., 1999; ZIMMERMANN et al., 2001). Les protéines de la famille Bcl-2 contrôlent la perméabilité de la membrane mitochondriale en formant directement des pores dans la membrane externe et/ou en régulant l'ouverture et la fermeture du pore



**Figure 4. Classement des membres de la famille Bcl-2**

Les membres de la famille Bcl-2 sont divisés en 3 catégories selon leur structure et leur fonction. Le groupe II situé au centre de la figure représente les membres anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> et Mcl-1. Les membres pro-apoptotiques peuvent être divisés en deux sous-groupes; les membres du groupe I, incluant Bax et Bak, possèdent les domaines BH1, BH2 et BH3, tandis que les membres du groupe III, incluant Bad et Bid, possèdent uniquement le domaine BH3, requis pour l'activité pro-apoptotique de ces protéines. Ces protéines fonctionnent comme un genre de rhéostat dans la cellule. La surexpression d'une protéine pro-apoptotique fera pencher la balance vers la mort cellulaire, tandis que la surexpression d'un membre anti-apoptotique fera plutôt pencher la balance vers la survie.

de perméabilité de transition (JOHNSTONE et al., 2002; MARTINOU et GREEN, 2001). L'effet final cependant, est la relâche régulée de cytochrome c de la mitochondrie, et l'induction des caspases plus en aval dans la voie (JOHNSTONE et al., 2002). En présence d'un signal apoptotique, les membre pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, qui sont normalement situés dans le cytoplasme, sont activés et subissent un changement conformationnel menant à l'exposition du domaine pro-apoptotique BH3, amenant ainsi une translocation à la mitochondrie. La translocation de Bax à la mitochondrie implique une homo-oligomérisation. La translocation de Bax, Bid, ou Bad à la mitochondrie peut ensuite induire un événement critique, soit la relâche des protéines contenues dans l'espace intermembranaire mitochondrial incluant le cytochrome c (SUN et al., 1999; ZIMMERMANN et al., 2001).

De plus, il est à noter que de considérables interactions peuvent se produire entre la voie des récepteurs de mort cellulaire et la voie mitochondriale. Par exemple, la protéine Bid peut être protéolytiquement activée par la caspase-8, et peut alors faciliter la relâche de cytochrome c de la mitochondrie. Ceci semble amplifier le signal apoptotique suivant l'activation de récepteurs de mort cellulaire (SUN et al., 1999; JOHNSTONE et al., 2002; KORSMEYER et al., 2000).

### **3.5. Implication de la famille Bcl-2 dans le cancer**

Tel que mentionné précédemment, le fait que plusieurs drogues anticancéreuses induisent l'apoptose soulève la possibilité que les tumeurs résistantes à la chimiothérapie soient incapables d'activer le processus apoptotique. En fait, il a été démontré que le

développement de la résistance dans diverses cellules cancéreuses est relié, du moins dans certains cas, à la surexpression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> (REED, 1995b). La surexpression de Bax, une protéine pro-apoptotique, a aussi été associée avec une sensibilité au cisplatine *in vitro* et *in vivo* (PEREGO et al., 1996). Ces protéines font partie d'une grande famille de protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose, la famille Bcl-2. Certaines de ces protéines agissent en tant que suppresseurs (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1), tandis que d'autres membres agissent en tant que promoteurs de mort cellulaire (Bax, Bcl-X<sub>S</sub>, Bak, Bad, Bik). La susceptibilité des cellules à un signal de mort cellulaire semble être déterminée, en partie, par le ratio entre les protéines pro- et anti-apoptotiques. Dans ce contexte, il a été reporté que la surexpression exogène de Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> confère une résistance à la chimiothérapie dans des essais de survie à court terme *in vitro* dans toute une variété de cellules tumorales (REED, 1995b). Leur rôle dans la résistance aux drogues est également supporté par le fait que plusieurs lignées cellulaires cancéreuses résistantes aux drogues surexpriment fréquemment Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub> (REED, 1995b, ELIOPOULOS et al., 1995). Inversement, il a été montré que la surexpression de Bax et Bad pouvait sensibiliser les cellules cancéreuses humaines *in vitro* à certaines drogues chimiothérapeutiques (STROBEL, 1996, 1998a, 1998b). L'inactivation de protéines pro-apoptotiques tel que Bax et Bad a également été reportée dans des cellules de cancer ovarien, et semble diminuer leur sensibilité à différentes drogues (MEIJERINK et al., 1998; GIL et al., 1999; ZHA et al., 1996), tandis que l'inactivation de Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, dans des cellules exprimant des niveaux variables de ces deux protéines, entraîne l'induction de l'apoptose (ZANGEMEISTER-WITTKE et al., 2000). D'autres évidences laissant croire que les protéines de la famille Bcl-2 pourraient être

impliquées dans le phénomène de chimiorésistance proviennent d'études des mécanismes du gène suppresseur de tumeur p53. Tel que mentionné précédemment, il a été démontré dans de nombreuses études que la protéine p53 est un inducteur potentiel de l'apoptose lorsque l'ADN est endommagé par des agents anticancéreux. Bien que p53 peut utiliser différents mécanismes pour induire l'apoptose, un lien direct avec la famille Bcl-2 a été établi lorsqu'il a été montré que les promoteurs de Bax et Bcl-2 sont des cibles transcriptionnelles de p53 (WANG and HARRIS, 1997).

Des perturbations de la voie apoptotique mitochondriale sont très communes chez les cellules cancéreuses. Étant donné l'importance des membres de la famille Bcl-2 dans la régulation de la voie apoptotique mitochondriale, il n'est pas surprenant que ces gènes soient modifiés dans les tumeurs. En fait, tel que mentionné précédemment, Bcl-2 a initialement été identifié à cause de sa translocation dans des lymphomes folliculaires, et est surexprimé dans toute une variété de cancers (REED, 1999). En plus des lymphomes folliculaires, les niveaux de Bcl-2 sont élevés dans plusieurs autres cancers humains, incluant des carcinomes de sein, de prostate, de colon, de poumon et d'ovaire (ZORNIG et al. 2001). D'autre part, la surexpression de Bcl-2 peut accélérer la tumorigénèse chez des souris transgéniques (ADAMS et al., 1999). Réciproquement, les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont inactivées dans certains cancers, et la perturbation de ces gènes entraîne également la tumorigénèse chez les souris. De plus, des mutations ou des modifications de l'expression de régulateurs de Bcl-2 ont été associées avec le développement de cancers (JOHNSTONE et al., 2002). Un bon nombre d'études a permis d'analyser les effets d'antisens (AS) dirigés contre la protéine Bcl-2 dans divers types de cellules tumorales. Il a été démontré qu'un AS dirigé



contre la protéine Bcl-2 inhibe la croissance de cellules de carcinome de Merkel (SCHLAGBAUER et al., 2000) et de cellules de mélanome humain (JANSEN et al., 1998) dans des souris SCID. Aussi, un AS dirigé contre la protéine Bcl-X<sub>L</sub>, un autre membre de la famille de protéines Bcl-2, dans des cellules de prostates cancéreuses, sensibilise ces cellules à divers agents chimiothérapeutiques (LEVEDEVA et al., 2000). De plus, un autre AS dirigé contre Bcl-X<sub>L</sub> induit l'anoïkose, une forme d'apoptose causée par la perturbation ou la perte d'adhésion cellulaire, et la suppression de la croissance de cellules d'ovaire tumorales (FRANKEL et al., 2001). D'autre part, le groupe de Piché et al. a réussi à moduler les niveaux de protéines Bcl-2 à l'aide d'un anticorps monovalent modifié dans les cellules de cancer du sein MCF-7, et ainsi à augmenter la sensibilité de ces cellules à différentes drogues (PICHÉ et al., 1998a), suggérant fortement le rôle de la protéine Bcl-2 dans le phénomène de résistance.

La plupart des analyses effectuées pour déterminer l'importance d'une protéine de la famille Bcl-2 dans le phénomène de résistance découlent de la surexpression de la protéine en question dans une lignée cellulaire apparentée au type de cancer étudié. Cependant, la surexpression de protéines a pour effet de surcharger la cellule, et bien que cette surexpression permette l'identification du rôle de la protéine en question dans le contrôle d'une voie, il demeure impossible de préciser à quel niveau cette dernière agit. La production d'inhibiteurs permettant d'empêcher une protéine de jouer son rôle dans la cellule est, d'après nous, une meilleure approche pour étudier le rôle de la protéine Bcl-2 dans le phénomène de résistance clinique observé dans de nombreux cas de cancer ovarien.

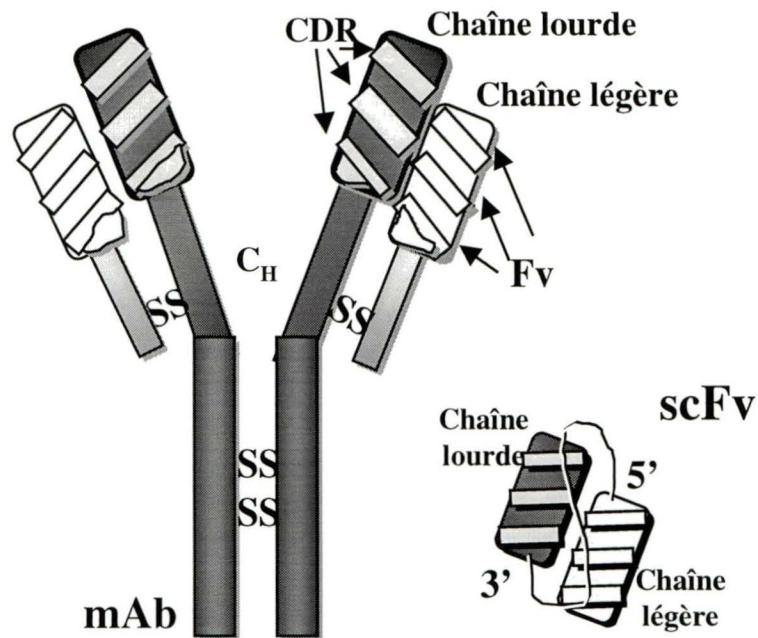
#### 4. Stratégies pour inhiber un ARNm ou une protéine

Une variété de stratégies ont été développées pour abroger l'expression et la fonction d'une protéine, chacune possédant ses avantages et désavantages. Ces approches incluent les oligonucléotides antisens (AS), les ribozymes, les mutants transdominants négatifs (TDNs), et les anticorps monovalents modifiés (scFvs) (PICHÉ et RANCOURT, 2001).

Les ribozymes sont des molécules d'ARN possédant une activité catalytique. Ils fonctionnent en liant un ARN cible spécifique par l'intermédiaire d'une séquence AS et inactivent la molécule cible en clivant le squelette phosphodiester à un site spécifique (JAMES et GIBSON, 1997). Les molécules AS, pour leur part, s'hybrident avec un ARNm cible pour empêcher sa traduction ou induit la dégradation de duplexes d'ARN (ASLARO et MCDONNELL, 1995). La technologie des AS est cependant limitée. L'assimilation des AS par les cellules est plutôt difficile, et la rencontre entre les AS et leurs ARNm cibles dans la cellule n'est pas toujours assurée. Cependant, de nombreuses études cliniques utilisant des AS comme thérapie ont obtenues des résultats prometteurs. Les scFv et les TDNs inhibent plutôt leurs cibles au niveau protéique (MARASCO, 1997; CHEN et MARASCO, 1996). À cause de leur affinité et leur spécificité pour leurs cibles, les scFvs sont des molécules intéressantes, et de nombreuses données démontrant leur efficacité *in vitro* et *in vivo* s'accumulent dans la littérature (MARASCO, 1997; MARASCO et al., 1993; MHASHILKAR et al., 1995; PICHÉ et al., 1998a).

#### 4.1. Qu'est-ce qu'un anticorps monovalent modifié ou scFv?

Un scFv est le plus petit dérivé d'anticorps qui conserve la spécificité et l'affinité de l'anticorps parental à partir duquel il a été construit. Les scFvs sont composés des gènes des chaînes lourde et légère d'un hybridome produisant un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine cible. Cet hybridome est alors utilisé pour générer un ADN complémentaire (ADNc) à partir de son ARNm purifié. Brièvement, les chaînes lourde et légère sont ensuite amplifiées à partir de l'ADNc par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour les régions variables de l'anticorps. Ces deux chaînes sont reliées entre elles à l'aide d'un segment peptidique flexible nommé espaceur ou « linker », généralement  $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3$  par la méthode de « overlap extension PCR », générant un scFv d'environ 750 paires de bases (Figure 5) (BUNNEL et MORGAN, 1998; PUMPHREY et MARASCO, 1998). La haute spécificité de liaison et la diversité des molécules d'immunoglobulines peuvent être utilisées pour manipuler certains processus cellulaires. En principe, les effets des anticorps intracellulaires peuvent être nombreux. Les scFvs peuvent être utilisés pour bloquer ou stabiliser des interactions entre diverses macromolécules (protéine-protéine, protéine-ADN). Les scFvs peuvent également moduler des interactions enzymatiques en bloquant un site actif, en stabilisant une enzyme dans une conformation active ou inactive, ou en séquestrant un substrat. Par ailleurs, les scFvs peuvent être utilisés pour détourner ou pour retenir des molécules dans des compartiments cellulaires sélectionnés, interférant ainsi avec le cheminement normal des molécules cibles; par exemple, en séquestrant des facteurs de transcription dans le cytoplasme, ou par la rétention dans le RE de protéines qui sont destinées à rejoindre la surface cellulaire ou à être sécrétées (PUMPHREY et MARASCO, 1998; MARASCO, 1997). Les signaux de



**Figure 5. Structure d'un scFv**

Le scFv est assemblé en reliant les chaînes lourde et légère de la région variable de l'anticorps parental (mAb) duquel il est dérivé à l'aide d'un peptide flexible nommé « linker ». Abréviations utilisées : CDR, régions déterminantes complémentaires; Fv, région de charpente (« framework »); mAb; anticorps monoclonal; C<sub>H</sub>, région constante des chaînes lourdes; SS, liens disulphides.

localisation qui peuvent être ajoutés sont choisis en fonction du compartiment intracellulaire où se trouve la molécule cible et de l'objectif recherché (stabilisation, rétention, neutralisation ou modulation de l'activité fonctionnelle de la molécule cible). Par exemple, la localisation d'un scFv au niveau du RE requiert l'ajout d'un signal permettant d'envoyer le scFv dans la voie de sécrétion (« IgK leader »), ainsi qu'une séquence de rétention (KDEL) pour entraîner la séquestration dans cette organelle du scFv et de sa cible (TEILLAUD, 1999). Les scFvs retenus au RE le sont probablement par leur interaction avec Bip, une protéine résidente du RE (BUNNEL et MORGAN, 1998). Aucune séquence de localisation n'est nécessaire pour diriger un scFv au niveau du cytoplasme, cependant, il risque d'être moins stable qu'à l'intérieur d'une organelle comme le RE. En effet, l'environnement réducteur du cytoplasme et l'absence dans ce dernier des disulfides isomérases, indispensables à la formation des ponts disulfures, sont préjudiciables à la stabilité des scFvs. Ces scFvs synthétisés et séquestrés dans le cytosol sont néanmoins fonctionnels, mais avec une demi-vie parfois plus courte (TEILLAUD, 1999).

#### **4.2. Avantages de l'approche des scFvs**

La technologie des scFvs offre différents avantages comparativement à d'autres approches utilisées dans la littérature (antisens, ribozymes, dominants négatifs) pour empêcher une cible quelconque d'accomplir son rôle dans la cellule. Tout d'abord, la sélection de scFvs efficaces se fait à l'aide de techniques puissantes comme le « phage display », qui permet de réaliser le criblage rapide de millions de scFvs basé sur leur affinité pour la protéine ciblée.

En second lieu, les scFvs peuvent être exprimés dans la cellule cible et localisés dans des compartiments cellulaires spécifiques à l'aide des séquences appropriées. Finalement, ces scFvs intracellulaires peuvent reconnaître et lier leur cible à l'intérieur de la cellule. Les scFvs possèdent donc des caractéristiques avantageuses comparativement à l'utilisation d'antisens (AS) par exemple, qui eux entraînent d'importantes limites, incluant leur instabilité dans la cellule, leur localisation intracellulaire plutôt difficile, l'apparition d'effets idiosyncratiques et non spécifiques lors de leur utilisation, et la nécessité d'utiliser de fortes doses pour observer un effet biologique significatif (BUNNEL et MORGAN, 1998).

Nous retrouvons dans la littérature de nombreux exemples de l'utilisation efficace de cet outil révolutionnaire. Marasco *et al.* ont montré que des scFvs dirigés contre le VIH peuvent abolir la production de virions de cellules infectées (MARASCO, 1997; MHASHILKAR et al., 1995; MARASCO et al., 1993). L'inhibition de erbB-2, un récepteur de protéine kinase transmembranaire, médiée par un scFv abolit l'expression à la surface cellulaire de erbB-2 en le séquestrant dans le RE (DESHANES et al., 1995a; 1995b). De plus, ce scFv augmente la chimiosensibilité de cellules ovariennes tumorales (BARNES et al., 1996). Piché *et al.* ont également généré et démontré l'efficacité de scFvs dirigés contre diverses protéines. Ils ont démontré l'efficacité des scFvs pour inhiber la protéine Bcl-2, ce qui a entraîné une augmentation de la cytotoxicité du cisplatine, accroissant le taux d'apoptose dans la lignée de cancer du sein MCF-7 (PICHÉ et al., 1998a); ainsi que pour un scFv dirigé contre LMP1, protéine retrouvée chez le virus Epstein-Barr (PICHÉ et al., 1998b).

## **5. Nos buts et objectifs**

Notre principal but est donc d'évaluer l'importance relative de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans le phénomène de résistance à la chimiothérapie dans le cancer ovarien. Pour ce faire, nous avons d'abord évalué l'expression de la protéine Bcl-2 et la sensibilité au cisplatine *in vitro* de cellules d'ovaire normales et cancéreuses; déterminé ensuite la relation entre la sensibilité au cisplatine et les niveaux d'expression de la protéine Bcl-2 dans les cellules étudiées; et finalement développé des inhibiteurs spécifiques de Bcl-2 et analysé leurs effets dans des cellules de cancer ovarien.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 6. Lignées cellulaires et réactifs

Les lignées cellulaires de cancer ovarien OVCAR-3 et SKOV-3, et la lignée de cancer du col de l'utérus HeLa ont été obtenues de l'ATCC (American Type Culture Collection; Rockville, MD, États-Unis). La lignée de cancer ovarien épithéliale SKOV-3ip1 nous a été gracieusement fourni par J. Price (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX). Les lignées de cancer ovarien OV4 et UCI-101 ont été obtenues par l'entremise de D.T. Curiel (Gene Therapy Center, University of Alabama at Birmingham, AL). Les COV-2 sont des cellules de cancer ovarien primaires isolées dans le laboratoire de C. Rancourt (Université de Sherbrooke, Québec, Canada) à partir d'ascite d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome séreux de l'ovaire de stade III, et ont été mises en culture dans du milieu DMEM/F12 (Biomedica, Québec, Canada) additionné de 20% de sérum fœtal bovin (FBS) (Biomedica, Québec, Canada). Les cellules SKOV-3, SKOV-3ip1, OV4 et UCI-101 ont été maintenues dans du DMEM/F12 additionné de 10% de FBS et les cellules OVCAR-3 dans du RPMI 1640 additionné de 20% de FBS et d'insuline (10 µg/ml) (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). Les cellules HeLa ont été maintenues dans du DMEM supplémenté avec 10% de FBS. Tous les milieux contiennent également de la L-glutamine (1%), de la pénicilline (100 U/ml), de la streptomycine (100 µg/ml) et de la fongizone (2,5 µg/ml). Le *cis*-diamminedichloroplatinum (cisplatine, CDDP), la staurosporine, la blasticidine et la doxycycline ont été obtenus chez Sigma (Oakville, Ontario, Canada).



## 7. Plasmides

Le phagemide pCANTAB 5E/scFv contient l'ADNc du scFv anti-Bcl-2 sous le contrôle du promoteur inductible *lac*. Le scFv a été introduit dans le vecteur pCANTAB 5E au niveau des sites *SfiI* et *NotI* dans le site de clonage multiple (PICHÉ et al., 1998a). Le scFv anti-Bcl-2 a été extrait du phagemide pCANTAB 5E et cloné dans le vecteur d'expression eucaryotique pSTCF (KDEL ou CYTO) à l'aide des sites *SfiI/NotI* présents dans ces vecteurs. Le vecteur pSTCF.KDEL contient un promoteur CMV, une séquence « IgK leader » en amont du scFv permettant de diriger ce dernier dans la voie de sécrétion ainsi qu'un signal de rétention au réticulum endoplasmique (KDEL) en C-terminal entraînant la séquestration du scFv à l'intérieur du réticulum et finalement une étiquette peptidique *c-myc* pour permettre la détection immunologique du scFv. Le vecteur pSTCF.CYTO est dérivé du vecteur pSTCF.KDEL; cependant il ne comprend pas la séquence « IgK leader » et le signal de rétention KDEL, ceci permettant l'expression du scFv dans le cytoplasme. Le scFv anti-Bcl-2 a également été cloné dans le vecteur pLTR à l'aide des sites *SfiI/NotI*. Le vecteur d'expression eucaryotique pLTR est issu du vecteur rétroviral pLXSN dérivé du virus « Moloney murine leukemia » (WATSUJI et al., 1997). Il contient un promoteur inductible à la doxycycline permettant l'expression du scFv en présence de doxycycline, des régions LTR à ses deux extrémités permettant l'intégration stable du gène d'intérêt et un gène de résistance à la blasticidine permettant la sélection des cellules qui ont intégré le transgène. Il y a également deux versions de ce plasmide, pLTR.KDEL et pLTR.CYTO, comportant les mêmes caractéristiques que les vecteurs pSTCF décrits précédemment, permettant la localisation du gène d'intérêt dans le compartiment cellulaire désiré. Le vecteur pLTR.KDEL encodant la

protéine GFP a été utilisé comme contrôle. Le plasmide d'expression pRC.CMV/hBcl-2, contenant l'ADNc de la protéine Bcl-2 humaine sous le contrôle du promoteur CMV, nous a été fourni par J.C. Reed (The Burham Institute, La Jolla, CA). Le vecteur pCDNA3/BAX-HA contenant la protéine BAX humaine fusionnée à une étiquette peptidique HA nous a été gracieusement fourni par L. Bouchard (Télogène, Sherbrooke, Québec, Canada).

## **8. Transfections**

Toutes les transfections ont été effectuées avec du FuGENE 6 (Roche, Laval, Québec, Canada) selon les instructions du manufacturier. Brièvement, les cellules ont été mises en culture 24 heures avant la transfection pour leur permettre d'adhérer et d'atteindre entre 50 et 80% de confluence. Généralement, un ratio FuGENE 6 : ADN de 3 : 1 a été utilisé dans un volume final de 100 µl, puis le mélange a été incubé à température ambiante pendant 1h30, et déposé sur les cellules en présence de milieu complet.

### **8.1. Transfections transitoires**

Les transfections transitoires ont été faites en plaques six puits. Selon les expériences, des transfections simples, doubles ou triples ont été réalisées en utilisant les proportions de réactifs indiquées au Tableau 1.

**Tableau 1. Composantes des mélanges FuGENE : ADN pour les transfections simple, double et triple.**

	Milieu de culture ( $\mu$ l) *	FuGENE 6 ( $\mu$ l)	ADN ( $\mu$ g)
<b>Simple</b>	~ 96	3	1
<b>Double</b>	~ 94	3	2
<b>Triple</b>	~ 90	6	3

\* Le volume de milieu est à déterminer selon le volume d'ADN ajouté

## 8.2. Clones stables

Pour l'établissement des clones stables, les cellules ont été mises en culture dans des Pétris de 6 cm, 24 heures avant la transfection des différents ADN pour obtenir de 50 à 80% de confluence au moment de la transfection. Tous les vecteurs pLTR ont d'abord été linéarisés avec l'enzyme de restriction *ScaI*. Les transfections ont été faites avec du FuGENE 6 en utilisant 2  $\mu$ g d'ADN linéarisé. Quarante-huit heures post-transfection, les cellules ont été trypsinisées et divisées dans 3 autres Pétris de 6 cm. La blasticidine (2  $\mu$ g/ml) a été ajoutée deux jours suite à la division. Par la suite, le milieu de sélection a été changé à tous les 3 jours. Lorsque les cellules dans le Pétri contrôle (sans ADN) ont été pratiquement toutes mortes, nous avons diminué la concentration de blasticidine à 1  $\mu$ g/ml. Il a ensuite fallu attendre la formation d'îlots de cellules que nous avons prélevés puis mis en culture dans des plaques 96 puits, toujours en présence du milieu de sélection. Nous avons ensuite procédé à l'amplification de ces clones en les transférant dans des contenants de plus en plus grands (24 puits, 12 puits, 6 puits, T-25, T-75). Nous finalement procédé à l'analyse des clones amplifiés

par immunobuvardage (Section 9), après avoir induit ou non l'expression du scFv Bcl-2 avec de la doxycycline (à 1 µg/ml).

### **8.3. Antisens Bcl-2**

#### **8.3.1. Analyse de l'effet de l'antisens Bcl-2 sur l'expression de la protéine Bcl-2**

L'antisens Bcl-2 (AS Bcl-2) utilisé pour cette expérience, est un AS commercial dont la séquence nucléotidique est la suivante : 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3' (BIOMOL Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA). Pour analyser l'effet de l'AS Bcl-2 sur l'expression de la protéine Bcl-2, nous avons utilisé la lignée de cancer ovarien SKOV-3ip1. Environ 24 heures avant la transfection des différents ADN, les cellules ont été mises en culture dans des plaques 6 puits pour obtenir 50 à 80% de confluence au moment des transfusions. Des concentrations croissantes d'AS Bcl-2 ont été transfectées dans les cellules SKOV-3ip1 dans les proportions indiquées au Tableau 2. Vingt-quatre heures plus tard, nous avons procédé à la lyse cellulaire suivi d'une analyse de l'expression de la protéine Bcl-2 par immunobuvardage (Section 9).

**Tableau 2. Composantes des mélanges FuGENE : AS pour l'analyse de l'effet de l'AS Bcl-2 sur l'expression de la protéine Bcl-2 dans les cellules SKOV-3ip1**

Concentration d'AS ( $\mu\text{M}$ )	Milieu de culture ( $\mu\text{l}$ )	FuGENE 6 ( $\mu\text{l}$ )	AS Bcl-2 ( $\mu\text{g}$ )
0	200	30	0
0,05	100	1,5	0,54
0,2	100	6	2,16
1,0	200	30	10,8

### 8.3.2. Analyse de l'effet de l'antisens Bcl-2 sur la survie cellulaire

Nous avons utilisé les cellules préparées et transfectées tel que décrit à la Section 8.3.1. Une seule concentration d'AS a été utilisée, soit 1  $\mu\text{M}$ . Huit heures suite à la transfection, nous avons trypsinisé les cellules et les avons mis en culture dans une plaque 96 puits, à raison de 15 000 cellules par puits, nous avons prévu 3 puits par condition. Nous avons également préparé des cellules non transfectées avec l'AS Bcl-2. Nous avons ajouté par la suite des concentrations croissantes de cisplatine (0, 0,5, 1,5 10 et 25  $\mu\text{g/ml}$ ) aux cellules transfectées ou non avec l'AS. Soixante-douze heures suite à l'ajout de la drogue, nous avons effectué un essai de cytotoxicité (Section 12).

## **9. Analyse par immunobuvardage**

### **9.1. Préparation des échantillons protéiques**

Nous avons d'abord procédé à la lyse cellulaire. Pour ce faire, nous avons enlevé le milieu des plaques 6 puits, rincé 2 fois avec du PBS pH 6,8, et ajouté 150 µl de tampon NP-40 1X (tampon NP-40 2X : 283 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Hepes pH 7,5, 4 mM EGTA pH 8, 0,6% NP-40) avec inhibiteurs de protéases (aprotinin, Roche; AEBSF, leupeptin et pepstatin, Sigma) par puits. Nous avons laissé les plaques sur glace un minimum de 20 minutes en agitant de temps à autre. Nous avons ensuite récolté les cellules dans des eppendorfs à l'aide de grattoirs, centrifugé à 5000 rpm 10 minutes à 4°C, et récupéré les surnageants dans de nouveaux eppendorfs. Il est important d'utiliser les échantillons immédiatement ou de les conserver à -20°C. Pour la préparation des échantillons pour l'immunobuvardage, nous avons d'abord dosé les échantillons avec le réactif de Bradford (BioRad, Mississauga, Ontario, Canada) selon les instructions du manufacturier. Avant de charger le gel, nous avons chauffé les échantillons à 100°C pendant 5 minutes. Nous avons utilisé le marqueur de poids moléculaire Kaleidoscope de BioRad.

### **9.2. Transfert sur membrane de PVDF**

Après avoir effectué l'électrophorèse de nos échantillons sur un gel de polyacrylamide de 12%, nous avons effectué le transfert des protéines sur une membrane de PVDF (Hybond-P; Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Nous avons préalablement trempé la membrane dans du méthanol, puis toutes les composantes du sandwich ont été imbibées de tampon de transfert 1X froid (pour 1 litre de tampon de transfert 1X : 3,03 g Tris, 14,4 g

glycine, 200 ml méthanol). Le transfert a été effectué à 300 mA à 4°C pendant environ 1h30. Suite au transfert des protéines, nous avons procédé au blocage de la membrane.

### **9.3. Blocage, anticorps et lavages**

Nous avons bloqué la membrane, les protéines vers le haut, pendant 1h00 avec agitation dans le milieu de blocage. Le milieu de blocage contient 3% de BSA ou 4% de lait en poudre, l'un ou l'autre dissout dans du PBS 1X pH 7,4 contenant 0,01% de Tween 20 (BioRad) dépendant des anticorps utilisés (Tableau 3). Ensuite, nous avons dilué l'anticorps primaire dans la solution de blocage appropriée (Tableau 3) et nous l'avons laissé s'hybrider sur la membrane pendant 1h00 à température ambiante ou toute une nuit à 4°C avec agitation. La solution contenant l'anticorps primaire a ensuite été enlevée, trois lavages de 15 à 20 minutes dans la solution de PBS Tween ont été effectués, et l'anticorps secondaire approprié (Tableau 3) a été incubé avec la membrane de 45 minutes à 1h00 à température ambiante. Trois derniers lavages d'une quinzaine de minutes dans la solution de PBS Tween ont précédé l'étape de révélation.

**Tableau 3. Anticorps primaires et secondaires employés pour les immunobuvardages.**

Anticorps primaire	Compagnie	Type d'anticorps	Dilution de l'anticorps	Solution de blocage	Anticorps* Secondaire
$\alpha$ -Bcl-2	Dako	Souris	1 : 1000	BSA	$\alpha$ -souris-HRP
$\alpha$ -c-myc	Invitrogen	Souris	1 : 10000	Lait	$\alpha$ -souris-HRP
$\alpha$ -c-myc	SantaCruz	Lapin	1 : 1000	BSA	$\alpha$ -lapin-HRP
$\alpha$ -HA	SantaCruz	Lapin	1 : 250	BSA	$\alpha$ -lapin-HRP
$\alpha$ -p53	SantaCruz	Souris	1 : 500	BSA	$\alpha$ -souris-HRP
$\alpha$ -Tubuline	Sigma	Souris	1 : 10000	Lait	$\alpha$ -souris-HRP

\* Les anticorps secondaires de chèvre couplés à la « horseradish peroxidase » ( $\alpha$ -souris-HRP et  $\alpha$ -lapin-HRP) sont utilisés 1 : 10000 dans la même solution que l'anticorps primaire utilisé (Jackson Immuno Research Laboratories INC, West Grove, Pennsylvania, USA)

#### 9.4. Révélation au ECL+

Les membranes ont été révélées par chemiluminescence à l'aide du « ECL Plus Western Blotting Reagent Pack » (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Tout d'abord, nous avons fait le mélange approprié avec les solutions fournies dans la trousse ECL Plus et laissé agir les réactifs tel que suggéré par le manufacturier. Nous avons ensuite placé la membrane dans une pellicule d'emballage en plastique et l'avons placée dans une cassette d'exposition (Amersham Biosciences). Dans une chambre noire, nous avons placé un film sur la membrane enveloppée, le temps nécessaire pour voir apparaître les bandes de l'intensité désirée suite au développement du film dans un appareil « Kodak RP X-Omat processor ».



## 10. Immunoprécipitation

Les lysats cellulaires utilisés pour l'immunoprécipitation ont été effectués tel que décrit dans la Section 9.1. Habituellement, les lysats de 2 puits d'une plaque 6 puits sont suffisants pour un échantillon d'immunoprécipitation. Toutes les étapes suivantes ont été effectuées sur glace ou à 4°C. Nous avons incubé de 200 à 300 µg de lysat cellulaire avec 5 µl de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine cible, sans agitation pendant 1h00. Nous avons ensuite ajouté 30 µl de protéine A (si anticorps primaire de lapin) ou de protéine G (si anticorps primaire de souris) agarose (Roche) et agité lentement pendant 1h00. Nous avons alors centrifugé à 5000 rpm pendant 5 minutes. Nous avons enlevé le surnageant, puis nous avons effectué trois lavages (5000 rpm, 5 minutes) avec la solution tampon NP-40 1X (recette Section 9.1) sans inhibiteurs de protéases. Après le dernier lavage, nous avons resuspendu les complexes dans environ 30 µl de tampon NP-40 1X et chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Nous avons centrifugé pour culotter les protéines A ou G et conservé le surnageant dans lequel se trouvent les protéines immunoprécipitées. Les échantillons ont alors pu être analysés par immunobuvardage (Section 9).

## 11. Immunofluorescence

Les cellules à analyser ont été trypsinisées, diluées dans du milieu complet et déposées (environ 1 ml) sur des lames (VWR Canlab, Ville Mont-Royal, Québec, Canada) à bout dépoli dans des Pétris de culture bactérienne (Phoenix Biomedical, Mississauga, Ontario). Nous avons laissé les cellules adhérer pendant plusieurs heures et lorsqu'elles ont été collées sur les lames, nous avons ajouté 10 ml de milieu complet dans les Pétris. Nous avons incubé les

cellules toute une nuit à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. À 50% de confluence les lames ont été lavées dans du PBS 1X froid. Les cellules ont été fixées 10 minutes dans du méthanol 100% refroidi à – 20°C. Nous avons vérifié l'aspect des cellules au microscope puis choisi et identifié des zones à 50% de confluence. Nous avons ensuite lavé les lames dans du PBS 1X pendant 5 minutes sur glace. Les lames ont été égouttées et traitées au triton 0,1% dans du PBS 1X pendant 5 minutes sur glace. Nous avons ensuite fait 2 lavages dans du PBS 1X pendant 5 minutes sur glace, puis bloqué les lames 45 minutes dans une solution de BSA 2%/PBS 1X. Après avoir égoutté et asséché les lames, nous avons déposé une goutte d'anticorps primaire dilué dans du BSA 2%/PBS 1X (Tableau 4 pour les dilutions des anticorps utilisés). Nous avons laissé les anticorps agir 1h00 à température ambiante dans un contenant bien fermé dont le fond était tapissé d'un papier absorbant mouillé. Les lames ont ensuite été lavées 3 fois dans du PBS 1X sur glace, égouttées et nous avons déposé une goutte par zone de l'anticorps secondaire marqué à la fluorescence désiré (Tableau 4) dilué dans du BSA 2%/PBS 1X pendant 30 minutes à la noirceur dans un contenant bien fermé. Nous avons effectué 3 derniers lavages au PBS 1X sur glace. Les lames ont été égouttées, et nous avons finalement déposé une goutte de milieu de montage (Sigma) sur la zone identifiée, et scellé le tout avec une lamelle. Il est important de conserver les lames à la noirceur jusqu'à leur observation au microscope à fluorescence.

**Tableau 4. Anticorps primaires et secondaires\* employés pour les immunofluorescences.**

Anticorps primaire	Compagnie	Type d'anticorps	Dilution de l'anticorps
$\alpha$ -Bcl-2	Dako	Souris	1 : 300
$\alpha$ -calréticuline	Affinity Bioregeant INC.	Lapin	1 : 300
$\alpha$ -c-myc	Invitrogen	Souris	1 : 300
$\alpha$ -c-myc	SantaCruz	Lapin	1 : 500

\* Les anticorps secondaires (Oregon Green 488 goat anti-rabbit (ou anti-mouse) IgG et Texas Red-X goat anti-rabbit (ou anti-mouse) IgG; Molecular Probe, Hornby, Ontario, Canada) sont utilisés 1 : 10000

## 12. Essai de cytotoxicité

Nous avonsensemencé, en triplicata, entre 15 000 et 18 000 cellules par puits, dans une plaques 96 puits, pour chacune des concentrations de drogues à analyser. Nous avons laissé les cellules adhérer toute une nuit à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Nous avons ensuite ajouté le cisplatine ou la staurosporine à des concentrations croissantes dans du milieu complet, et incubé les plaques de 4 à 5 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Nous avons ensuite procédé à l'essai XTT. Pour ce faire, nous avons dissout 10 mg de réactif XTT (Sigma) dans 10 ml de PBS 1X, chauffé à 60°C pendant 30 minutes à la noiceur et filtré avec un filtre 0.2  $\mu$ . Nous avons ensuite ajouté à cette solution, 10 ml de milieu DMEM/F12 sans phénol (Biomedica) et 15  $\mu$ l de phenazine methosulfate (PMS) (Sigma) à 5 mg/ml. Après avoir aspiré le liquide contenu dans la plaque, nous avons ajouté 100  $\mu$ l par puits de cette solution et incubé 30 minutes dans le noir à température ambiante. Nous avons ensuite mesuré l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur

de micro-plaques (TECAN, San Jose, CA, USA). Nous avons finalement tracé la courbe de l'absorbance à 450 nm ou le pourcentage de survie en fonction de la concentration croissante de la drogue utilisée pour pouvoir déterminer le IC<sub>50</sub> (concentration de drogue utilisée pour entraîner 50% de mort cellulaire).

### **13. Essais d'apoptose**

#### **13.1. Coloration de Hoechst**

Les cellules à analyser ont été trypsinisées, diluées dans du milieu complet et déposées (environ 1 ml) sur des lames (VWR, Canlab, Ville Mont-Royal, Québec, Canada) à bout dépoli dans des Pétris de culture bactérienne (Phoenix Biomedical, Mississauga, Ontario). Nous avons laissé adhérer les cellules pendant plusieurs heures et lorsqu'elles ont été collées, nous avons ajouté 10 ml de milieu complet dans le Pétri. Les cellules ont été incubées toute une nuit à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. À environ 50% de confluence, nous avons ajouté la drogue à la concentration désirée dans 10 ml de milieu complet et laissé agir de 12 à 24 heures. Nous avons rincé les lames 2 fois au PBS 1X et fixées les cellules sur les lames 5 minutes dans du méthanol 100% froid. Nous avons rincé les lames 2 fois au PBS 1X et ajouté le colorant de Hoechst 33258 (Sigma) dilué dans du PBS 1X à une concentration de 0,01 mg/ml. Nous avons laissé agir le colorant de Hoechst 5 minutes à température ambiante et rincé 2 fois dans du PBS 1X. Une fois les lames bien égouttées, nous avons déposé une goutte de milieu de montage (Sigma) au centre de la lame, et scellé le tout avec une lamelle. Il est important de conserver les lames à la noirceur jusqu'à leur observation au microscope à fluorescence.

### 13.2. Essais de caspase-3

Pour cet essai, le « Caspase-3 Fluorometric Assay kit » de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) a été utilisé. Nous avonsensemencé les cellules à analyser dans des contenants de culture cellulaire T-75 pour avoir environ 80% de confluence le jour suivant. Nous avons ensuite ajouté la drogue désirée pour entraîner le déclenchement de la cascade apoptotique pendant une douzaine d'heures. Nous avons trypsinisé et compté les cellules, recentrifugé et resuspendu les cellules dans le « Lysis Buffer » compris dans la trousse pour avoir  $4 \times 10^4$  cellules par  $\mu\text{l}$ . Nous avons incubé les lysats sur glace pendant 10 minutes. Les réactions enzymatiques pour mesurer l'activité de la caspase-3 ont été effectuées dans des eppendorfs. Chaque réaction contenait 75  $\mu\text{l}$  de lysat cellulaire, 75  $\mu\text{l}$  de « 2X Reaction Buffer 3 » (avant d'utiliser le 2X Reaction Buffer 3, ajouter 10  $\mu\text{l}$  du DTT stock par ml de 2X Reaction Buffer 3) et 7,5  $\mu\text{l}$  de substrat (Caspase-3 fluorogenic substrate; DEVD-AFC). Nous avons incubé chaque tube à 37°C pendant deux heures. Nous avons ensuite transféré chacune des réactions dans des micro-cuvettes (BioRad) et pris des lectures avec le fluorimètre Versi-Fluor de BioRad; nous avons utilisé un filtre pour l'excitation à 360 nm et un filtre pour l'émission à 510 nm. Des contrôles additionnels ont été nécessaires pour cet essai, soit un échantillon sans lysat cellulaire, et un autre sans substrat.

## RÉSULTATS

### 14. Caractérisation des cellules d'ovaire normales et cancéreuses

#### 14.1. Expression de la protéine Bcl-2 dans les cellules normales et cancéreuses

Les niveaux d'expression de la protéine Bcl-2 ont été évalués dans diverses cellules d'ovaires cancéreuses (OVCAR-3, SKOV-3, SKOV-3ip1, UCI-101, OV4 et COV-2) et normales (OVN 22T et OVN 13T). Les statuts cliniques des patientes chez lesquelles ces différentes cellules ont été prélevées initialement sont décrites dans le Tableau 5. Des lysats provenant de différents échantillons de cellules ont été analysés par immunobuvardage afin de déterminer l'expression de la protéine Bcl-2. Ainsi, les résultats observés à la Figure 6A démontrent une expression généralement beaucoup plus importante de la protéine Bcl-2 dans les cellules cancéreuses comparativement aux cellules normales. Bien que la protéine Bcl-2 ne soit pas visible par immunobuvardage dans les lignées OVCAR-3 et SKOV-3ip1 de la présente figure, une exposition plus longue du gel permet de visualiser la protéine Bcl-2 (résultat non montré). L'expression de la tubuline, un contrôle interne, permet de confirmer que la quantité de protéines chargées sur le gel pour chaque lignée est sensiblement la même.

#### 14.2. Sensibilité des cellules d'ovaires normales et cancéreuses au cisplatine

Dans les cas de cancer ovarien, le cisplatine est l'agent de première ligne utilisé pour le traitement de ce type de cancer. Nous avons donc comparé la sensibilité de cellules cancéreuses au CDDP avec des cellules d'ovaires normales. Pour évaluer la sensibilité au

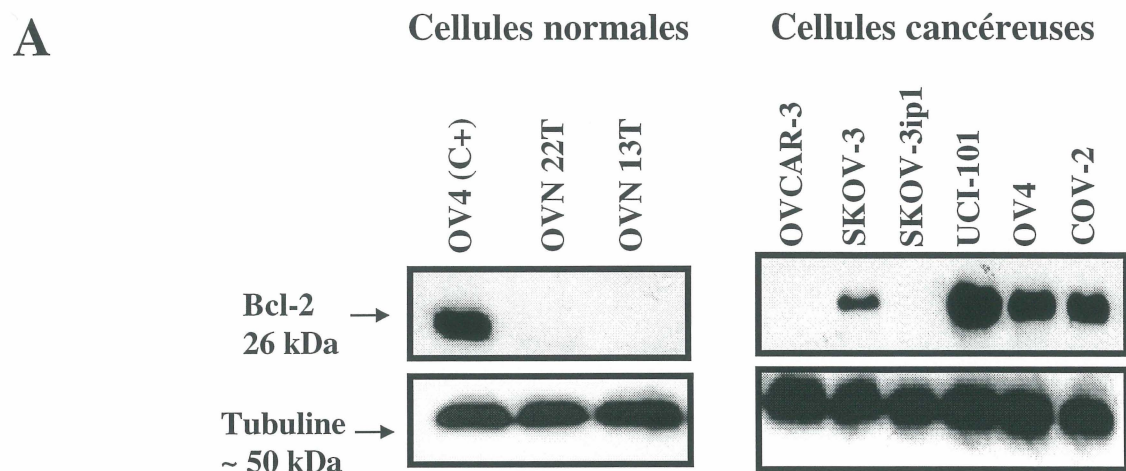
**Tableau 5. Statut clinique des patientes chez qui les cellules d’ovaire normales ou cancéreuses ont été prélevées pour développer les lignées correspondantes**

Cellules d’ovaires		Description
Normales	OVN 22T	Cellules primaires normales d’ovaire humain
	OVN 13T	Cellules primaires normales d’ovaire humain
Cancéreuses	OVCAR-3	Lignée cellulaire d’ovaire cancéreuse, adénocarcinome d’une patiente résistante au cisplatine
	UCI-101	Lignée cellulaire d’ovaire cancéreuse, adénocarcinome séreux d’une patiente résistante au cisplatine
	SKOV-3	Lignée cellulaire d’ovaire cancéreuse, adénocarcinome d’une patiente répondant cliniquement au cisplatine
	SKOV-3ip1	Déviées des SKOV-3, phénotype plus agressif dans le modèle animal
	COV-2	Échantillon primaire, adénocarcinome séreux disséminé, stage IIIc d’une patiente répondant cliniquement au cisplatine
	OV4	Lignée cellulaire d’ovaire cancéreuse, aucune données cliniques disponibles

**Figure 6. Expression de la protéine Bcl-2 et sensibilité au cisplatine de cellules ovariennes normales et cancéreuses**

(A) Expression de la protéine Bcl-2 endogène dans des lignées ovariennes normales et cancéreuses. Les protéines des lysats cellulaires de ces lignées ont été analysées par immunobuvardage avec un anticorps  $\alpha$ -Bcl-2. La quantité de protéines chargées sur le gel a été vérifiée à l'aide d'un anticorps  $\alpha$ -tubuline. (C+) : contrôle positif, lysat de cellules de cancer ovarien OV4 exprimant la protéine Bcl-2. (B) La sensibilité des cellules au cisplatine est mesurée à l'aide d'un essai de prolifération cellulaire de type XTT et exprimée sous forme de  $IC_{50}$  pour chacune des lignées étudiées.





**B**

Statut de la lignée	Résistantes au CDDP		Sensibles au CDDP		?		Cellules normales	
Lignée cellulaire	OVCAR-3	UCI-101	SKOV-3	COV-2	SKOV-3ip1	OV4	OVN 22T	OVN 13T
Ic50 (µM) Cisplatine	6,7	10	2,8	3,3	16,7	10	5,7	7,0

**Figure 6.** Expression de la protéine Bcl-2 et sensibilité au cisplatine de cellules ovariennes normales et cancéreuses

cisplatine des cellules d'ovaires normales et cancéreuses, nous avons déterminé la viabilité cellulaire à l'aide d'un essai de prolifération cellulaire de type XTT. Les résultats présentés à la Figure 6B représentent les  $IC_{50}$  de chacune des lignées, le  $IC_{50}$  étant la concentration de drogue utilisée pour causer une réduction d'absorbance de 50% à 450 nm relativement aux cellules non traitées. Le  $IC_{50}$  est donc une mesure qui permet de comparer la sensibilité de différentes cellules à une drogue. Les  $IC_{50}$  des cellules d'ovaires normales varient entre 5,7 et 7,0, les  $IC_{50}$  des cellules prélevées chez des patientes sensibles au CDDP varient entre 2,8 et 3,3, tandis que ceux des cellules provenant de patientes résistantes au traitement se retrouvent entre 6,7 et 10. Le  $IC_{50}$  des cellules OV4, dont on ne connaît pas le statut clinique de la patiente chez qui elles ont été prélevées est de 10, puis celui des SKOV-3ip1, dérivées de la lignée SKOV-3, est de 16,7. Les SKOV-3ip1 sont d'ailleurs des cellules très agressives lorsqu'elles sont injectées chez les souris. De manière générale, nous pouvons affirmer que les  $IC_{50}$  des cellules analysées correspondent au statut clinique des patientes chez qui elles ont été prélevées. Les cellules cancéreuses sensibles au CDDP étant en prolifération active incorporent plus rapidement le CDDP que les cellules d'ovaire normales, ce qui explique leurs valeurs de  $IC_{50}$  plus faibles que les cellules normales. Toutefois, la lignée OVCAR-3, une lignée résistante, a un  $IC_{50}$  semblable à ceux des cellules normales. Cependant, il est plus difficile d'associer la sensibilité des cellules au cisplatine (Figure 6B) avec l'expression de la protéine Bcl-2 dans les différentes lignées (Figure 6A). Des cellules avec de faibles  $IC_{50}$ , comme les SKOV-3 et les COV-2, expriment plus fortement la protéine Bcl-2 comparativement aux OVCAR-3 et SKOV-3ip1, qui ont des valeurs de  $IC_{50}$  beaucoup plus élevées et des niveaux de protéines Bcl-2 beaucoup plus faibles. Il ne semble donc y avoir

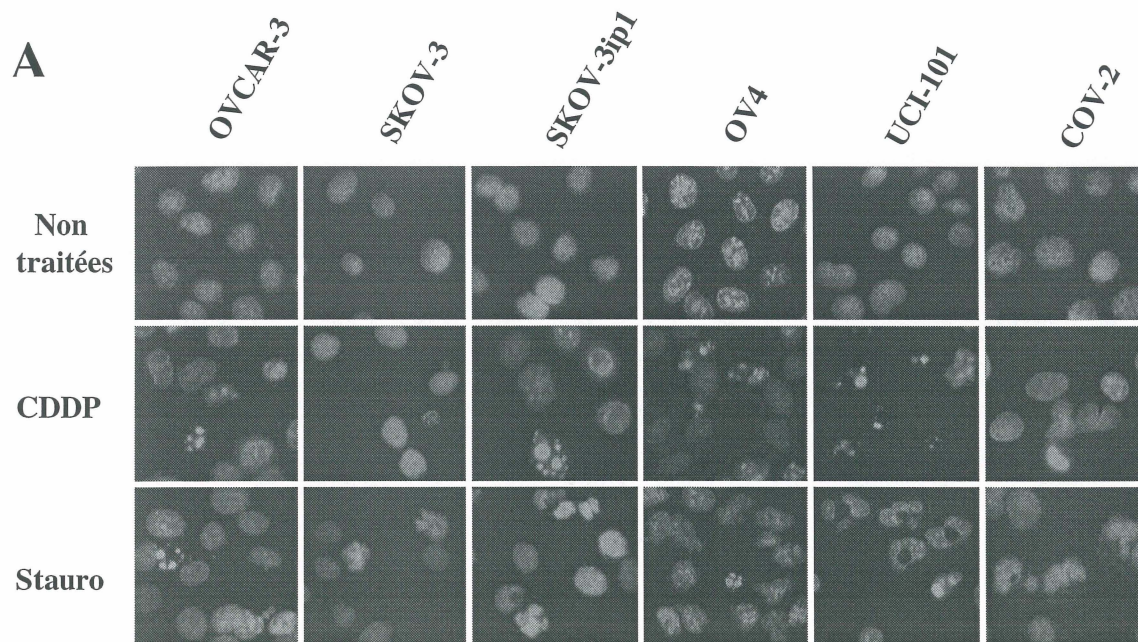
aucune corrélation entre la sensibilité des cellules au cisplatine et l'expression de la protéine Bcl-2.

### **14.3. Activation de la cascade apoptotique par le cisplatine dans les différentes lignées de cancer ovarien**

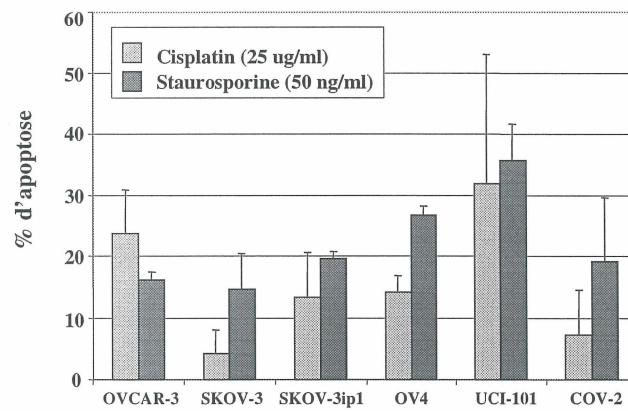
Pour vérifier que le cisplatine induit la mort cellulaire indépendamment de la sensibilité des cellules à cette drogue, nous avons mesuré l'effet du cisplatine sur les cellules cancéreuses et celui de la staurosporine, un inhibiteur de protéines kinases, reconnu pour entraîner la mort cellulaire par l'activation de la voie apoptotique mitochondriale (BERTRAND et al., 1994; JACOBSON et al., 1994; RAFF et al., 1993). Tout d'abord, pour pouvoir analyser l'effet de ces deux drogues sur l'activation de la cascade apoptotique des différentes lignées cancéreuses, nous avons examiné les noyaux apoptotiques à l'aide d'une coloration nucléaire (Figure 7A). En effet, une des caractéristiques morphologiques typiques des cellules en apoptose est la fragmentation et la condensation du noyau. Après avoir compté les noyaux apoptotiques dans 5 champs différents et estimé le pourcentage d'apoptose (Figure 7B), nous observons que bien qu'il y ait des variations au niveau du pourcentage d'apoptose entre les différentes lignées cellulaires, il existe une bonne corrélation entre les niveaux d'apoptose induit par le cisplatine et la staurosporine pour chacune des lignées analysées individuellement, ce qui suggère que le cisplatine induit la mort cellulaire principalement par l'activation de la voie mitochondriale de la cascade apoptotique. Cependant, le fait que certaines lignées, comme les SKOV-3 et les COV-2, qui sont plus sensibles au cisplatine (Figure 6B), présentent une induction plus modeste de la cascade apoptotique suggère que la sensibilité *in vitro*

**Figure 7. Le cisplatine induit la mort cellulaire par l'activation de la cascade apoptotique indépendamment de la sensibilité des cellules au cisplatine et à la staurosporine**

(A) Colorations nucléaires au colorant de Hoechst 33258 de différentes lignées de cancer ovarien. Les noyaux apoptotiques ont été analysés et pris en photo à l'aide d'un microscope à fluorescence. (B) Estimation du pourcentage d'apoptose pour chacune des lignées. Le pourcentage des noyaux en apoptose est exprimé relativement aux cellules non traitées pour les deux drogues utilisées.



**B**



**Figure 7.** Le cisplatine induit la mort cellulaire par l'activation de la cascade apoptotique indépendamment de la sensibilité des cellules au cisplatine et à la staurosporine

au cisplatine n'est probablement pas uniquement reliée à sa capacité d'activer la cascade apoptotique.

#### **14.4. Statut de p53 dans les lignées cellulaires ovariennes cancéreuses**

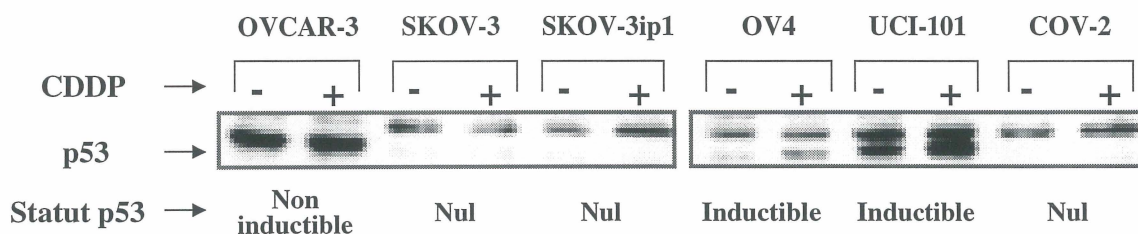
Étant donné le rôle important que joue p53 dans le phénomène de chimiosensibilité, nous avons voulu évaluer son statut dans nos différentes lignées de cancer ovarien. Si la voie de p53 est intacte, le cisplatine aura pour effet d'activer cette dernière et une augmentation de l'expression de p53 sera observée chez les cellules traitées. Les cellules ont donc été traitées ou non au cisplatine à des concentrations correspondant au IC<sub>50</sub> de chacune des lignées (Figure 6B), et des lysats de ces cellules ont été analysés par immunobuvardage. L'anticorps p53 utilisé reconnaît aussi bien la forme mutante de la protéine que la forme de type sauvage sur gel dénaturant. D'après les résultats observés dans la Figure 8, la protéine p53 semble avoir un comportement différent dans les cellules OVCAR-3, probablement attribuable à une mutation; nous observons une forte expression de la protéine sans cisplatine, et l'expression reste la même suite à l'ajout de la drogue. Les cellules SKOV-3, SKOV-3ip1 et les COV-2 sont nulles pour p53, tel que démontré par l'absence d'expression de p53 en présence de cisplatine. Une augmentation évidente de l'expression de la protéine p53 suite à l'ajout de la drogue chez les cellules OV4 et UCI-101 nous indique que la protéine pourrait être de type sauvage dans ces lignées. Le statut de p53 dans les lignées OVCAR-3 et SKOV-3 a été déterminé par d'autres groupes et correspond à ce que nous avons observé (CUELLO et al., 2001; DEBERNARDIS et al., 1997). Si nous analysons les présents résultats et les comparons avec la sensibilité au cisplatine de chacune des lignées (Figure 6B), nous nous apercevons qu'il

n'y a aucune corrélation entre le statut de p53 dans ces lignées et leur sensibilité respective au cisplatine. Le cisplatine activant l'expression de p53, induisant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire ou l'entrée en apoptose des cellules traitées, des cellules comme les COV-2 et les SKOV-3 par exemple, qui sont nulles pour p53, devraient être plus résistantes à la drogue, alors qu'elles sont sensibles et possèdent des  $IC_{50}$  respectifs de 3,3 et 2,8. Il n'y a donc aucune corrélation entre le statut de p53 et la sensibilité des cellules au cisplatine.

Bien que la protéine Bcl-2 soit exprimée plus fortement dans les cellules de cancer ovarien que dans les cellules d'ovaires normales, il n'existe aucune corrélation entre cette surexpression et la résistance de ces cellules au cisplatine. De plus, il ne semble pas y avoir de lien entre le statut de p53 et la sensibilité au cisplatine de ces mêmes cellules. La sensibilité des cellules de cancer ovarien étudiées étant indépendante des protéines p53 et Bcl-2, nous avons développé et utilisé un scFv dirigé contre la protéine Bcl-2 pour étudier plus spécifiquement le rôle de la protéine Bcl-2 dans le phénomène de résistance au cisplatine.

## **15. Validation du scFv Bcl-2 dans les vecteurs d'expression eucaryotiques pSTCF et pLTR**

La construction du scFv Bcl-2 et le clonage de l'ADNc dans le système d'expression procaryote pCANTAB 5E ont déjà été décrits et sont publiés (PICHÉ et al., 1998a). L'ADNc a été sous-cloné dans différents vecteurs d'expression eucaryotique, soit les vecteurs pSTCF.KDEL et CYTO, qui expriment le scFv de manière constitutive, ainsi que dans les vecteurs pLTR.KDEL et CYTO qui contiennent un promoteur inductible à la doxycycline (Figure 9). La protéine Bcl-2 étant localisée au niveau des membranes du noyau, du RE et de



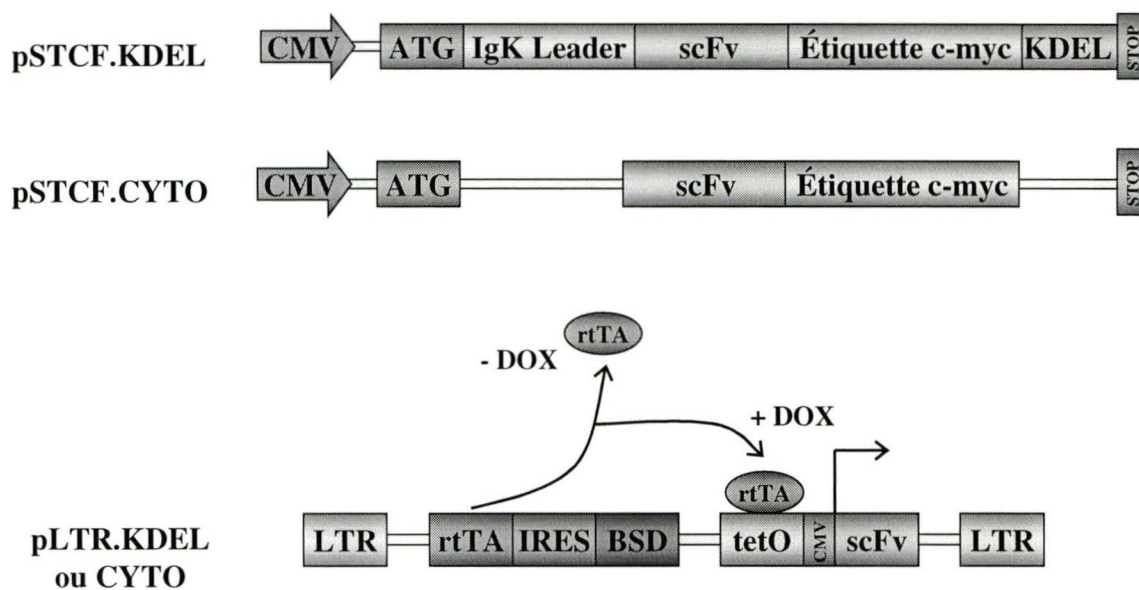
**Figure 8. Analyse du statut de p53 dans différentes lignées de cancer ovarien**

Les lignées de cancer ovarien ont été traitées ou non au cisplatine à des concentrations correspondant à leur  $IC_{50}$  respectif (Figure 6B). Les lysats de ces cellules ont été analysés par immunobuvardage avec un anticorps  $\alpha$ -p53 qui reconnaît aussi bien la protéine de type sauvage (« Wild type »; WT) que la forme mutante de la protéine. Le statut de p53 est indiqué pour chacune des lignées.



**Figure 9. Représentation schématique des vecteurs pSTCF.KDEL et CYTO et du vecteur pLTR**

Le vecteur d'expression eucaryotique pSTCF.KDEL contient le gène encodant le scFv Bcl-2. L'expression du scFv est sous le contrôle du promoteur CMV. La séquence « IgK leader » dirige le scFv vers le RE, et la séquence KDEL entraîne sa rétention dans ce compartiment cellulaire. Une étiquette peptidique c-myc est également fusionnée au scFv pour permettre sa détection. Le vecteur pSTCF.CYTO est pourvu des mêmes composantes que le vecteur pSTCF.KDEL, à l'exception des séquences « IgK leader » et KDEL qui ne lui sont pas nécessaires pour se rendre au niveau du cytoplasme. Le vecteur pLTR est composé des unités suivantes : deux régions LTR (« long terminal repeat » du « Moloney murine leukemia virus »), le « reverse tetracycline controlled transactivator » (rtTA), un site d'entrée interne des ribosomes (IRES), le gène de la blasticidine S déaminase (BSD), une séquence tet opératrice heptamérique (tetO) et un promoteur CMV. Le vecteur pLTR contient également le scFv Bcl-2, muni ou non des séquences le dirigeant dans le bon compartiment cellulaire. Les régions LTR à chacune de ses extrémités permet l'intégration de la section du vecteur située entre ces deux dernières dans le génome cellulaire. Le gène de résistance à la blasticidine permet de sélectionner les cellules qui ont intégré ou non la section se retrouvant entre les deux régions LTR. L'ajout de doxycycline entraîne la liaison de rtTA sur tetO, ce qui permet l'activation de l'expression du scFv.

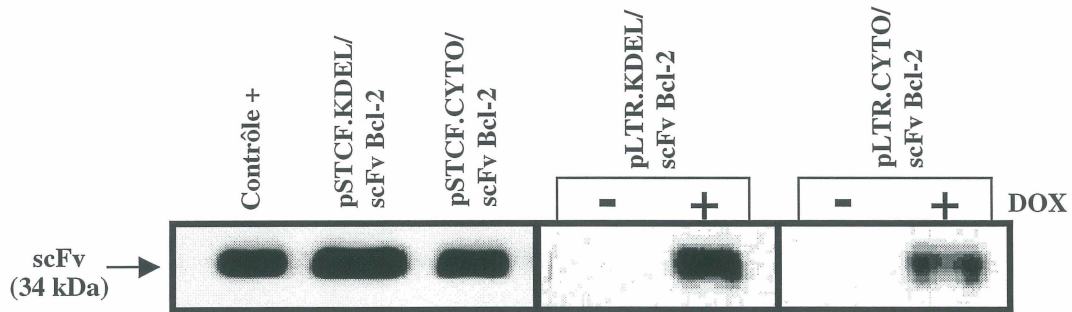


**Figure 9.** Représentation schématique des vecteurs pSTCF.KDEL et CYTO et du vecteur pLTR

la mitochondrie, le scFv se trouvant dans le cytoplasme devrait interagir à un moment ou à un autre avec la protéine et ainsi l'empêcher d'interagir avec d'autres membres de la famille de protéines Bcl-2, prévenant son rôle anti-apoptotique dans la cellule. Afin de vérifier l'intégrité de ces vecteurs, l'expression du scFv Bcl-2 a été analysée dans les cellules HeLa par immunobuvardage. Comme le démontre la Figure 10, nous détectons le scFv Bcl-2 dans toutes les constructions avec un poids moléculaire correspondant à celui attendu, soit environ 34 kDa. De plus, les résultats démontrent également que l'expression du scFv est bien inductible par la doxycycline.

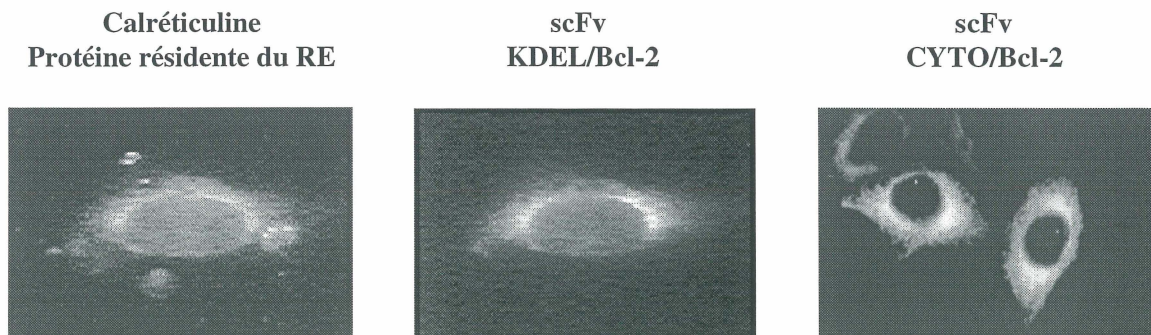
### **15.1. Localisation intracellulaire du scFv Bcl-2**

Pour vérifier que les signaux de localisation intracellulaire ajoutés au scFv Bcl-2 dirige ce dernier dans le bon compartiment cellulaire, nous avons procédé à des expériences d'immunofluorescence. Les constructions pSTCF.KDEL/scFv Bcl-2 et pSTCF.CYTO/scFv Bcl-2 ont été analysées dans la lignée de cancer ovarien SKOV-3ip1. Les cellules ont été marquées avec un anticorps  $\alpha$ -c-myc, reconnaissant l'étiquette peptidique c-myc fusionnée aux scFvs, ou avec un anticorps  $\alpha$ -calréticuline, une protéine résidente du RE, pour montrer le patron correspondant à la localisation intracellulaire des protéines situées au RE. Nous observons dans la Figure 11 que la construction pSTCF.KDEL/scFv Bcl-2, devant diriger le scFv au niveau du RE, a un patron de fluorescence réticulaire et périnucléaire correspondant à celui de la calréticuline, une protéine résidente du RE. Par contre, la construction pSTCF.CYTO/Bcl-2 démontre un patron de fluorescence plus diffus et limité au cytoplasme



**Figure 10. Expression du scFv Bcl-2 dans des cellules eucaryotes**

Vérification de l'expression du scFv Bcl-2 dans les vecteurs pSTCF et pLTR dans les cellules HeLa par immunobuvardage. Le scFv Bcl-2 a été cloné dans les vecteurs pSTCF.KDEL, pSTCF.CYTO, pLTR.KDEL et pLTR.CYTO. L'expression du scFv Bcl-2 se fait de manière constitutive dans les vecteur pSTCF, tandis que les vecteurs pLTR possèdent un promoteur inductible à la doxycycline. Le contrôle positif est un lysat cellulaire contenant le scFv Bcl-2 d'une expérience précédente.



**Figure 11. Les scFvs peuvent être ciblés dans différents compartiments intracellulaires**

Localisation intracellulaire des scFvs KDEL/Bcl-2 et CYTO/Bcl-2 et de la calréticuline, une protéine résidente du RE, dans les cellules SKOV-3ip1 par immunofluorescence. Nous observons que le scFv KDEL/Bcl-2 a un patron de fluorescence réticulaire et périnucléaire correspondant à celui de la calréticuline, tandis que le scFv CYTO/Bcl-2 démontre un patron plus diffus et limité au cytoplasme.

concordant avec celui des protéines cytoplasmiques. Les constructions, dotées des signaux appropriés, semblent donc diriger le scFv Bcl-2 dans les compartiments cellulaires désirés.

### **15.2. Vérification de la séquence du scFv Bcl-2**

Étant donné l'homologie de domaine existant entre les membres de la famille de protéines Bcl-2, il était important de vérifier que les régions déterminant la complémentarité (CDRs) de notre scFv Bcl-2 sont uniques et différentes. Nous avons donc séquencé l'ADNc encodant notre scFv dans le plasmide pCANTAB 5E et l'avons comparé avec la séquence d'un autre scFv, ce dernier étant dirigé contre la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub>, protéine faisant partie de la même sous-classe de la famille que la protéine Bcl-2. Dans les séquences présentées à la Figure 12, les régions CDRs des chaînes lourde et légère dans les encadrés, sont les régions impliquées dans l'interaction avec la protéine ciblée, contrairement aux régions de charpentes (FRs) qui présentent une homologie de séquence en acides aminés importante. Comme nous pouvions nous y attendre, les régions CDRs présentées sont à toute fin pratique distinctes d'un scFv à l'autre, suggérant que le scFv Bcl-2 ait une spécificité et une affinité uniques pour sa cible.

### **15.3. Interaction du scFv Bcl-2 avec la protéine Bcl-2**

Pour confirmer l'interaction directe entre le scFv Bcl-2 et la protéine Bcl-2 (Figure 13), nous avons procédé à des expérimentations d'immunoprécipitation dans les cellules HeLa. Comme les transfections dans les cellules de cancer ovarien sont peu efficaces, nous avons

### Chaîne lourde

scFv	FR 1	CDR 1	FR 2	CDR 2
Bcl-2	<i>QVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFT</i>	<b>SYWMH</b>	<i>WVKQRPQGGLVWIG</i>	<b>A/YPGNSDTSYNGKFRG</b>
Bcl-X1	<i>QVQLQESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFN</i>	<b>DAWMD</b>	<i>WVRQSPEKGLEWVA</i>	<b>G/TNKANNHATYYAESVKG</b>
	FR 3	CDR3	FR 4	
Bcl-2	<i>KAKLTAVTSTSTAYMELSSLTIEDSAVYYCTR</i>	<b>SYDWYFDV</b>	<i>WQGTTVTVSS</i>	
Bcl-X1	<i>RFTISRDESKSSVYLQMNSLRAEDTGIIYCR</i>	<b>TGRWFTY</b>	<i>WQGTSVTVSS</i>	

### Chaîne légère

scFv	FR1	CDR 1	FR 2	CDR 2
Bcl-2	<i>DIELTQSPALLSVSPGERVFSFC</i>	<b>RASQSIGTDMH</b>	<i>WYQQRINGSPRLLIK</i>	<b>YASESIS</b>
Bcl-X1	<i>DIELTQSPASLTVSLGQRATISC</i>	<b>RASKSVSTSGYSYMH</b>	<i>WYQQKPGQPPELLIY</i>	<b>LASNLES</b>
	FR 3	CDR 3	FR 4	
Bcl-2	<i>GIPSRFDGSGSGTDFTLNSVSEEDIADYYC</i>	<b>QQSYSWPLT</b>	<i>FGAGTKLEIKR</i>	
Bcl-X1	<i>GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC</i>	<b>QHNRDLPRT</b>	<i>FGGGTKLEIKR</i>	

**Figure 12. Analyse de la séquence du scFv Bcl-2**

Comparaison de la séquence du scFv Bcl-2 avec celle du scFv Bcl-X<sub>L</sub>, dirigé contre la protéine Bcl-X<sub>L</sub>, un autre membre de la même famille de protéines Bcl-2. Les acides aminés inscrits en italique indiquent une similarité de séquence entre les deux scFvs. Les régions variables composant les scFvs comprennent des régions hypervariables (CDRs), encadrées sur la figure, correspondant au site de liaison de l'antigène cible, et des régions de charpente (FRs), qui sont relativement bien conservées à l'intérieur des régions variables, assurant ainsi la bonne conformation de l'anticorps. Nous remarquons que les régions CDRs, importantes pour la liaison des scFvs avec leurs cibles, sont très différentes dans les deux scFvs analysés.

**Figure 13. Les domaines fonctionnels de la protéine Bcl-2**

Description de la localisation des différents domaines de la protéine Bcl-2 : position des domaines BH1 à BH4, le domaine d'ancrage aux membranes (TM). Une longue « loop » flexible se retrouve entre les domaines BH4 et BH3 et semble être requise pour la phosphorylation de la protéine. C'est également au niveau de cette région qu'interagit notre scFv Bcl-2. Le domaine BH3 (domaine ligand) joue le rôle de ligand lors de la dimérisation de la protéine Bcl-2 avec d'autres membres de la famille Bcl-2, tandis que la combinaison des domaines BH1, BH2 et BH3 semble être requise pour la formation du sillon dans lequel s'insère le domaine BH3. Les hélices 5 et 6 participeraient à la formation d'un pore, probablement en pénétrant dans les lipides des membranes.



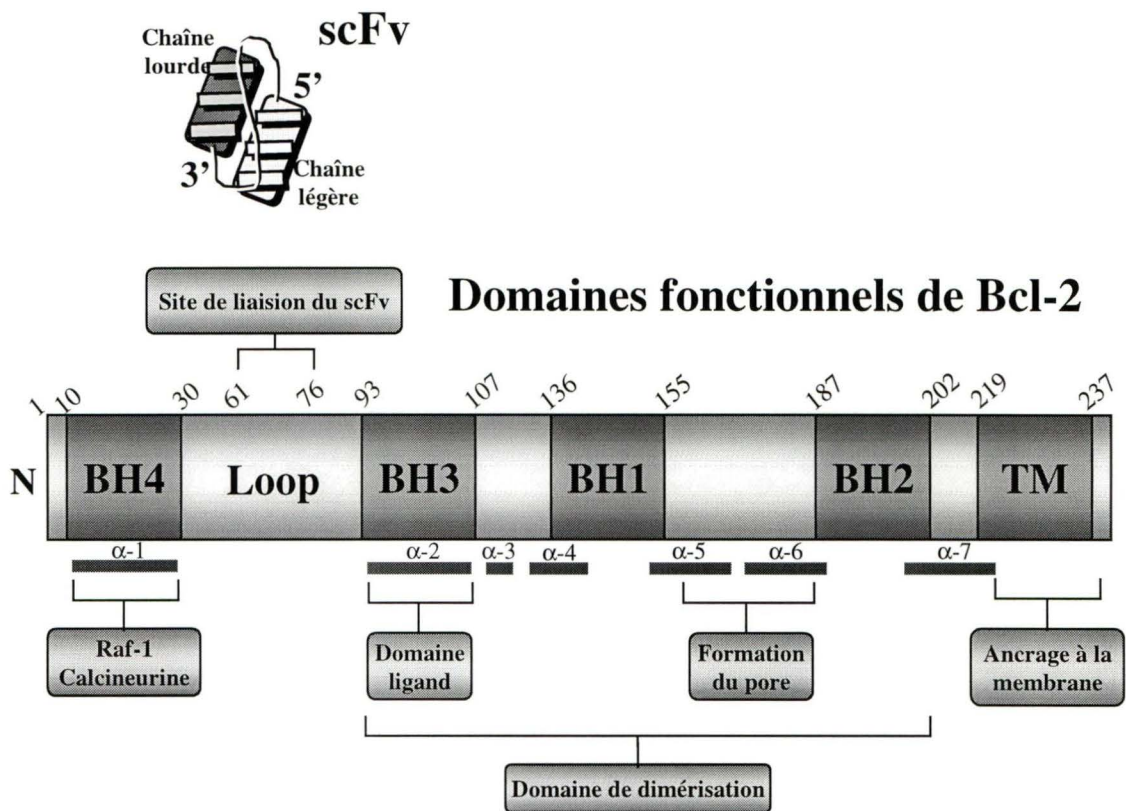
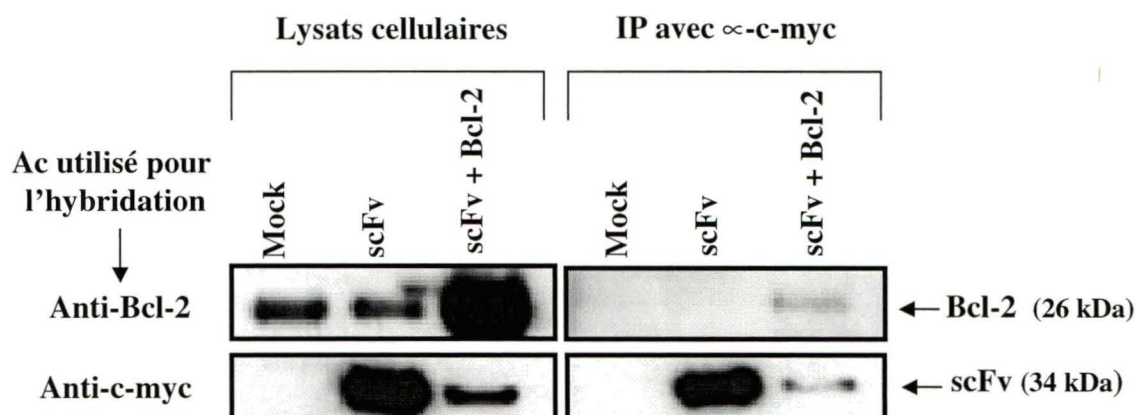


Figure 13. Les domaines fonctionnels de la protéine Bcl-2

choisi la lignée cellulaire HeLa pour valider rapidement l'interaction entre le scFv et la protéine cible. Tel que montré dans la partie gauche de la Figure 14, la protéine Bcl-2 endogène est détectée dans les lysats de cellules transfectées avec le vecteur pSTCF.KDEL vide et le vecteur contenant le scFv. Cependant, nous observons une forte augmentation de l'expression de la protéine Bcl-2 suite à la co-transfection du vecteur pRC.CMV/hBcl-2 avec le scFv. Dans les mêmes lysats cellulaires, nous détectons le scFv Bcl-2 dans les puits où il a été transfecté, mais bien que nous ayons ajusté la quantité d'ADN avec le vecteur pSTCF.KDEL, le scFv est exprimé plus fortement lorsqu'il est transfecté seul. Les vecteurs pSTCF.KDEL/scFv Bcl-2 et pRC.CMV/hBcl-2 ont environ la même taille, il est donc peu probable que la diminution de l'expression du scFv lors de la co-transfection soit causée par l'entrée préférentielle du vecteur pRC.CMV/hBcl-2 dans les cellules. Une hypothèse retrouvée dans la littérature énonce la possibilité de la dégradation du complexe protéine/scFv, en raison de la localisation « anormale » de la protéine ciblée par le scFv dans la cellule (PICHÉ et al. 1998a). Il est donc possible qu'en introduisant la protéine Bcl-2 en grande quantité en même temps que le scFv Bcl-2, nous ayons favorisé l'interaction entre ces deux derniers, ainsi que la dégradation du scFv. Ceci expliquerait les faibles niveaux de scFv observés suite à la co-transfection Bcl-2/scFv Bcl-2. Du côté droit de la Figure 14, nous observons que le scFv a été immunoprécipité dans les deux puits où il a été transfecté. Bien que l'immunoprécipitation, techniquement, doit enrichir les protéines ciblées, nous détectons que faiblement la protéine Bcl-2 malgré sa forte expression dans les lysats cellulaires. Il est possible que les conditions utilisées pour les immunoprécipitations ne soient pas favorables à l'interaction entre le scFv et la protéine, expliquant ainsi les faibles niveaux



**Figure 14.** Le scFv Bcl-2 interagit avec la protéine Bcl-2 *in vitro*

Des cellules HeLa ont été transfectées avec les vecteurs pSTCF.KDEL/scFv Bcl-2 et pRC.CMV/hBcl-2, puis des lysats de ces cellules ont été immunoprécipités avec un anticorps reconnaissant l'étiquette peptidique c-myc fusionnée au scFv Bcl-2, suivie d'une analyse des complexes protéiques par immunobuvardage. Suite à l'immunoprécipitation du scFv Bcl-2, nous observons la co-immunoprécipitation de la protéine Bcl-2 indiquant leur interaction l'une avec l'autre *in vitro*.

de protéines Bcl-2 détectés par immunobuvardage suite aux immunoprécipitations. La co-immunoprécipitation de la protéine par le scFv Bcl-2, bien qu'en faible quantité, nous suggère tout de même que les deux molécules interagissent ensemble, du moins *in vitro*.

#### **15.4. Le scFv Bcl-2 inhibe l'interaction entre Bcl-2 et Bax, une protéine qui hétérodimérise naturellement avec Bcl-2**

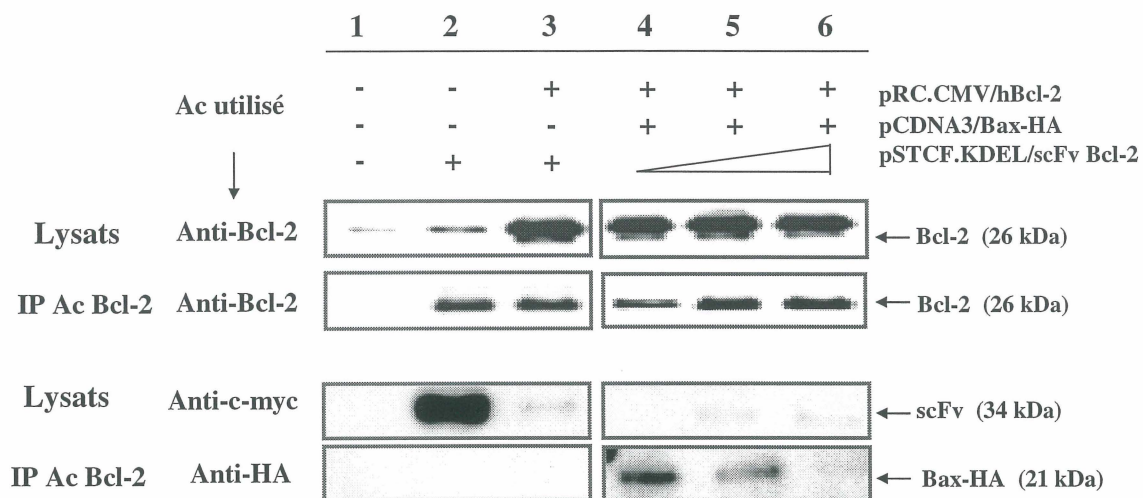
La dimérisation de certains membres des protéines de la famille Bcl-2 joue un rôle très important dans le contrôle de l'activation de la cascade apoptotique. La protéine Bax, une protéine pro-apoptotique, homodimérise ou interagit avec d'autres membres pro-apoptotiques (SUN et al., 1999; ZIMMERMANN et al., 2001; JOHNSTONE et al., 2002; MARTINOU et GREEN, 2001), ceci entraînant la relâche de cytochrome c de la mitochondrie et éventuellement l'activation des caspases effectrices de la voie (STRASSER et al., 2000; THORNBERRY et LAZEBNIK, 1998). La protéine Bcl-2, ainsi que d'autres membres anti-apoptotiques de la famille, interagit avec Bax pour l'empêcher de dimériser avec un membre pro-apoptotique, et de cette manière fait pencher la balance vers la survie cellulaire. Comme nous voulons inhiber la protéine Bcl-2 avec le scFv Bcl-2 pour empêcher cette dernière de jouer son rôle anti-apoptotique dans la cellule, il est important de vérifier que le scFv peut déplacer les partenaires de Bcl-2, particulièrement la protéine Bax.

Nous avons donc effectué un essai de compétition pour déterminer si le scFv Bcl-2 permet de bloquer *in vitro* l'hétérodimérisation de Bcl-2 et Bax. Des cellules HeLa ont été transfectées avec les vecteurs pCDNA3/Bax-HA, pRC.CMV/hBcl-2 et avec des concentrations croissantes (0,1 µg, 0,5 µg et 1,0 µg) du plasmide pSTCF.KDEL/scFv Bcl-2.

Le plasmide pCDNA3 a été utilisé pour normaliser la quantité d'ADN total transfecté. Les lysats de ces cellules ont ensuite été immunoprécipités avec un anticorps  $\alpha$ -Bcl-2, puis les lysats cellulaires et les précipités ont été séparés sur gel de polyacrylamide et analysés par immunobuvardage. Nous voyons dans la Figure 15, l'expression de la protéine Bcl-2 dans les lysats cellulaires utilisés pour les immunoprécipitations. Nous observons dans les puits 1 et 2 la protéine Bcl-2 endogène, puis une augmentation des niveaux de la protéine dans les puits 3 à 6 correspondant au Bcl-2 exogène transfecté. Nous remarquons également que les niveaux de protéines Bcl-2 immunoprécipités sont sensiblement les mêmes dans tous les puits, qu'il s'agisse de Bcl-2 endogène ou exogène, à l'exception de la piste 1 où la protéine n'est que très faiblement détectée sur le gel original. Le scFv Bcl-2 est aussi présent dans les lysats cellulaires, surexprimé dans le deuxième puits (tout comme dans la Figure 14), et de façon croissante dans les puits 4 à 5, où des quantités croissantes de scFv ont été transfectées, tandis que les niveaux de protéines Bax-HA décroissent dans les complexes protéiques immunoprécipités. Cependant, il faut remarquer que la piste 6 n'indique pas une augmentation significative de l'expression du scFv par rapport à la piste 5, et pourtant, il y a une réduction considérable de l'interaction Bcl-2/Bax. Il est possible que les concentrations relatives de chacune des protéines influencent la formation des complexes protéiques immunoprécipités. Comme nous n'avons pas regardé l'expression de la tubuline pour vérifier la quantité de protéines chargées sur le gel, ni l'expression de Bax-HA dans les lysats cellulaires, ni l'expression du scFv Bcl-2 dans les précipités, nous ne pouvons expliquer avec assurance les résultats montrés dans la piste 6 de la Figure 15. Tout de même, de façon générale, pour des quantités semblables de Bcl-2 immunoprécipitées, et des quantités

**Figure 15. L'interaction entre la protéine Bcl-2 et son partenaire naturel Bax est modulée par le scFv Bcl-2**

Des cellules HeLa ont été transfectées avec les vecteurs pCDNA3/Bax-HA, pRC.CMV/hBcl-2 et avec des concentrations croissantes (0,1 µg, 0,5 µg et 1,0 µg) du plasmide pSTCF.KDEL/scFv Bcl-2. Les lysats de ces cellules ont ensuite été immunoprécipités avec un anticorps  $\alpha$ -Bcl-2, puis les précipités ont été séparés sur gel de polyacrylamide et analysés par immunobuvardage. Les niveaux de protéines Bcl-2 immunoprécipités sont sensiblement les mêmes dans tous les puits, qu'il s'agisse de Bcl-2 endogène ou exogène. Pour une augmentation de l'expression du scFv dans les lysats cellulaires, nous observons une diminution de Bax-Ha immunoprécipité par l'intermédiaire de la protéine Bcl-2. Ces résultats suggèrent que la liaison du scFv Bcl-2 avec la protéine Bcl-2 empêche cette dernière d'hétérodimériser avec la protéine pro-apoptotique Bax.



**Figure 15.** L'interaction entre la protéine Bcl-2 et son partenaire naturel Bax est modulée par le scFv Bcl-2

croissantes de plasmide encodant le scFv transfectées, nous observons une diminution de Bax-Ha immunoprécipité par l'intermédiaire de la protéine Bcl-2. Ceci suggère que la protéine Bax est déplacée par le scFv, suggérant que le scFv, à une certaine concentration dans la cellule, a une plus grande affinité pour Bcl-2 que Bax.

## **16. Établissement de clones stables exprimant le scFv Bcl-2 dans les lignées de cancer ovarien SKOV-3 et SKOV-3ip1**

Les transfections transitoires étant peu efficaces et rendant la reproduction des résultats difficile, il est intéressant d'établir des clones stables dans des cellules de cancer ovarien. La production de clones stables permet l'obtention de populations homogènes dont l'ensemble des cellules expriment un gène d'intérêt, dans notre cas le scFv Bcl-2. De plus, la possibilité d'utiliser un système réguleable de façon positive avec de la doxycycline, nous permet d'induire l'expression du scFv au moment désiré dans la population de cellules, facilitant l'étude du rôle inhibiteur de ce scFv. Comme nous voulons utiliser cet inhibiteur spécifique pour étudier l'importance de la protéine Bcl-2 dans le phénomène de résistance, induire l'expression du scFv dans une population de cellules cancéreuses devient très intéressant. Pour l'établissement de nos clones stables, nous avons d'abord choisi d'utiliser la lignée de cancer ovarien SKOV-3ip1 à cause de son importante résistance au cisplatine, de ses niveaux considérables d'expression de la protéine Bcl-2 et de son agressivité chez les souris *in vivo*. Nous avons également établi des clones stables dans la lignée SKOV-3. Les cellules SKOV-3 ont permis de dériver la lignée SKOV-3ip1, possèdent des niveaux plus élevés de Bcl-2 et sont beaucoup plus sensibles que les SKOV-3ip1 au cisplatine (Figure 6). Le vecteur pLTR



contenant le scFv Bcl-2 KDEL ou CYTO (Figure 9) a été utilisé pour la production de clones stables dans les lignées SKOV-3 et SKOV-3ip1. Comme il est difficile de déterminer à quel endroit dans la cellule le scFv et la protéine Bcl-2 ont le plus de chance de se rencontrer et d'interagir l'un avec l'autre, nous avons produit des clones exprimant les deux types de scFv. La protéine Bcl-2 se retrouvant au niveau des membranes du RE, de la mitochondrie et du noyau, devrait traverser la voie de sécrétion. Nous considérons la possibilité que la protéine puisse interagir avec le scFv au niveau du RE avant qu'elle ne soit relocalisée au niveau des membranes des organelles habituelles, mais ne pouvons la confirmer. Advenant que le scFv ne puisse jouer son rôle inhibiteur au niveau du RE, le scFv localisé au niveau du cytoplasme aura peut-être plus de chances d'interagir avec la protéine Bcl-2, dont la région ciblée se retrouve au niveau du cytoplasme.

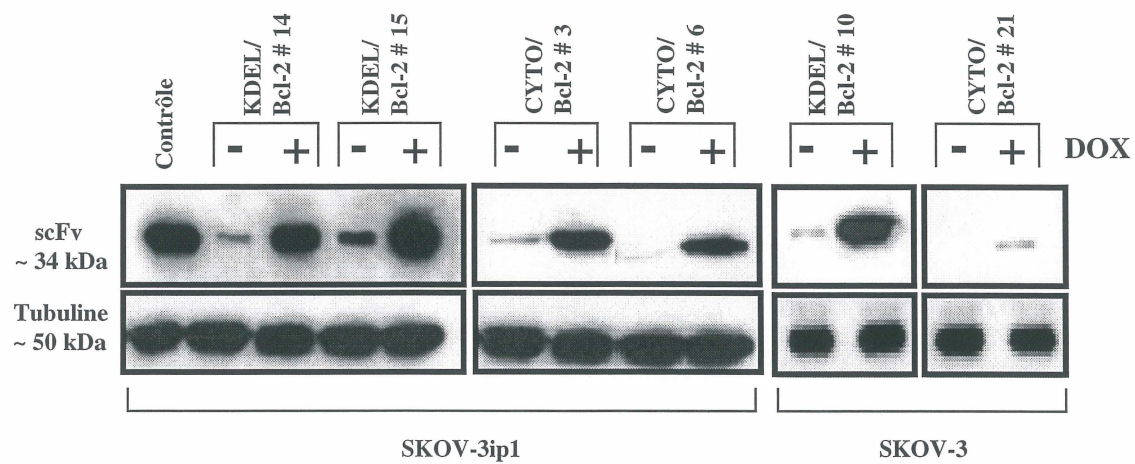
### **16.1. Analyse de l'expression du scFv Bcl-2 dans les clones stables**

Afin de vérifier l'expression du scFv Bcl-2, les clones ont été induits ou non avec de la doxycycline, puis les protéines des lysats cellulaire ont été soumises à une migration sur gel de polyacrylamide, et analysées par immunobuvardage. Tel que démontré dans la Figure 16A, plusieurs clones indépendants dans les SKOV-3 et les SKOV-3ip1 expriment le scFv Bcl-2. L'expression du scFv Bcl-2 est beaucoup plus forte lorsqu'il y a induction de l'expression avec la doxycycline, tel qu'escompté. Pour démontrer l'induction de l'expression du scFv dans le temps, des lysats cellulaires ont été effectués à 0, 12, 24, 36, 48 et 72 heures post-induction. Comme le montre la Figure 16B, en présence de doxycycline, l'expression du scFv Bcl-2 augmente rapidement pour atteindre un plateau après 48 heures.

**Figure 16. Expression des scFvs Bcl-2 KDEL et CYTO dans les clones stables établis dans les cellules SKOV-3 et SKOV-3ip1**

(A) L'expression des scFvs dans les clones stables a été analysée par immunobuvardage en présence ou non de la doxycycline. Le contrôle positif est un lysat cellulaire contenant le scFv Bcl-2 d'une expérience précédente. (B) Démonstration de l'induction de l'expression du scFv en fonction du temps du clone KDEL/scFv Bcl-2 #14 dans les SKOV-3ip1. Les cellules ont été soumises au même traitement qu'en (A), mais on été récoltées à 0, 12, 24, 36, 48 et 72 heures après l'ajout de la doxycycline, puis les lysats protéiques ont été effectués.

A



B

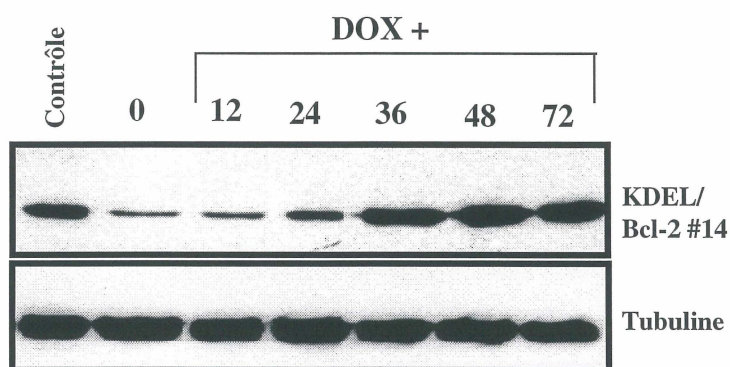


Figure 16. Expression des scFvs Bcl-2 KDEL et CYTO dans les clones stables établis dans les cellules SKOV-3 et SKOV-3ip1

## **17. Effets biologiques de l'inhibition de la protéine Bcl-2**

### **17.1. L'inhibition de Bcl-2 par le scFv CYTO/Bcl-2 semble sensibiliser les cellules au cisplatine dans les SKOV-3 mais non dans les SKOV-3ip1**

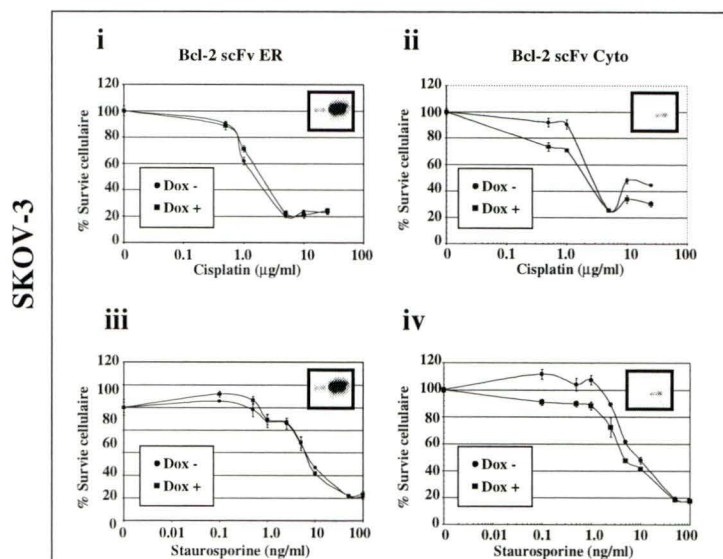
Nous voulons évaluer l'importance de la protéine Bcl-2 dans le phénomène de résistance au cisplatine en utilisant un inhibiteur, le scFv Bcl-2, capable d'empêcher la protéine Bcl-2 de jouer son rôle dans la cellule. En inhibant la protéine Bcl-2 avec notre scFv, si ce dernier est spécifique et exprimé en quantités suffisantes pour être efficace, nous devrions être en mesure d'observer une augmentation de la sensibilité au cisplatine des clones exprimant le scFv. Nous utilisons le cisplatine dans ces essais puisqu'il est utilisé dans les traitements de première ligne dans les cas de cancer ovarien, et que de nombreuses femmes développent une résistance clinique à cet agent chimiothérapeutique. Le cisplatine cause des dommages dans l'ADN, puis initie une séquence d'événements menant à l'activation de la cascade apoptotique en passant par la voie mitochondriale. Nous évaluons également la sensibilité des cellules avec la staurosporine, une drogue reconnue pour entraîner la mort cellulaire via l'activation de la voie mitochondriale de la cascade apoptotique.

Pour évaluer l'effet de ces deux drogues chimiothérapeutiques dans les clones stables exprimant le scFv Bcl-2, la viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide d'un essai de prolifération cellulaire de type XTT. Les résultats présentés à la Figure 17 nous indiquent que la mort cellulaire, induite aussi bien par le cisplatine que la staurosporine, est augmentée d'environ 20 % dans le clone CYTO/scFv Bcl-2 induit à la doxycycline dans les cellules SKOV-3. Cependant, aucune différence significative n'a été observée pour ce clone dans les cellules SKOV-3ip1, ni pour le clone KDEL/scFv Bcl-2 dans les deux types de cellules.

**Figure 17. L'inhibition de Bcl-2 par le scFv CYTO/Bcl-2 semble sensibiliser les cellules au cisplatine dans les SKOV-3 et non dans les SKOV-3ip1**

Des clones stables (dans les lignées SKOV-3 (A) et SKOV-3ip1(B)) exprimant le scFv Bcl-2 KDEL (i et iii) ou CYTO (ii et iv) sous un promoteur inductible à la doxycycline ont été traités avec des concentrations croissantes de cisplatine (i et ii) ou de staurosporine (iii et iv). Le pourcentage de survie a été déterminé suite à l'ajout des drogues par un essai de prolifération cellulaire de type XTT. Les données ont été exprimées en pourcentage de survie cellulaire en fonction de la concentration de drogue utilisée. Nous observons une augmentation de la sensibilité des cellules au cisplatine et à la staurosporine seulement pour le clone CYTO dans les cellules SKOV-3, à de faibles concentrations de drogues.

A



B

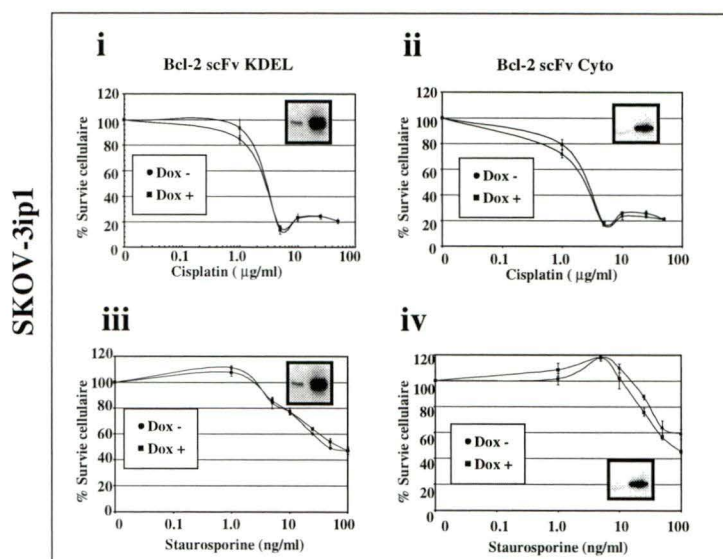


Figure 17. L'inhibition de Bcl-2 par le scFv CYTO/Bcl-2 semble sensibiliser les cellules au cisplatine dans les SKOV-3 et non dans les SKOV-3ip1

L'augmentation du pourcentage de mort cellulaire n'est observé cependant qu'à de faibles concentrations de drogues. Il semble qu'à des concentrations plus élevées, la toxicité de ces drogues surpasse l'effet induit par la présence du scFv dans ce clone.

### **17.2. L'inhibition par un antisens dirigé contre la protéine Bcl-2 ne sensibilise pas les cellules au cisplatine dans les SKOV-3ip1, bien qu'une diminution de l'expression de la protéine soit observée**

Une autre façon d'inhiber la protéine Bcl-2 dans nos lignées cancéreuses, est d'utiliser un antisens pour entraîner la destruction de l'ARNm de Bcl-2. Ainsi, la protéine ne peut jouer son rôle, et nous permet de regarder l'effet que provoque cette inhibition. Comme un antisens Bcl-2 est disponible commercialement (BIOMOL Research Laboratories), nous nous le sommes procuré, et l'avons utilisé dans la lignée SKOV-3ip1. Les cellules SKOV-3ip1 ont été transfectées avec des concentrations croissantes d'AS (0, 0,05, 0,2 et 1,0  $\mu\text{M}$ ), puis des lysats cellulaires ont été effectués et analysés par immunobuvardage. Les membranes ont été mises en présence de l'anticorps  $\alpha$ -Bcl-2 pour la détection de la protéine Bcl-2, ainsi qu'avec les anticorps  $\alpha$ -Bax et  $\alpha$ -Bcl-X<sub>L</sub>, pour nous assurer que seulement la protéine Bcl-2 est ciblée et non les autres membres de la famille de protéines Bcl-2. Nous avons également procédé à une évaluation de la sensibilité au cisplatine des cellules SKOV-3ip1 traitées avec l'AS Bcl-2. Les cellules SKOV-3ip1 ont été transfectées avec l'AS Bcl-2 à une concentration de 1,0  $\mu\text{M}$  et des concentrations croissantes de cisplatine ont été ajoutées aux cellules. Le pourcentage relatif des cellules vivantes a été déterminé à l'aide d'un essai de prolifération cellulaire de type XTT.

Comme le montre la Figure 18A, nous observons une diminution de l'expression de la protéine Bcl-2 d'environ 50% suite à la transfection de l'AS Bcl-2 à une concentration de 1  $\mu$ M, comparativement aux cellules transfectées avec l'agent de transfection FuGENE 6 seul. Nous n'avons observé aucun changement des niveaux d'expression des protéines Bax et Bcl-X<sub>L</sub>, deux protéines de la famille de protéines Bcl-2. Ce résultat suggère que l'AS utilisé semble spécifique pour la protéine Bcl-2. Cependant, malgré la diminution d'expression de la protéine Bcl-2 détectée par immunobuvardage suite à la transfection de l'AS Bcl-2 à une concentration de 1  $\mu$ M, nous n'observons aucune diminution du pourcentage de survie des cellules traitées avec le cisplatine (Figure 18B).

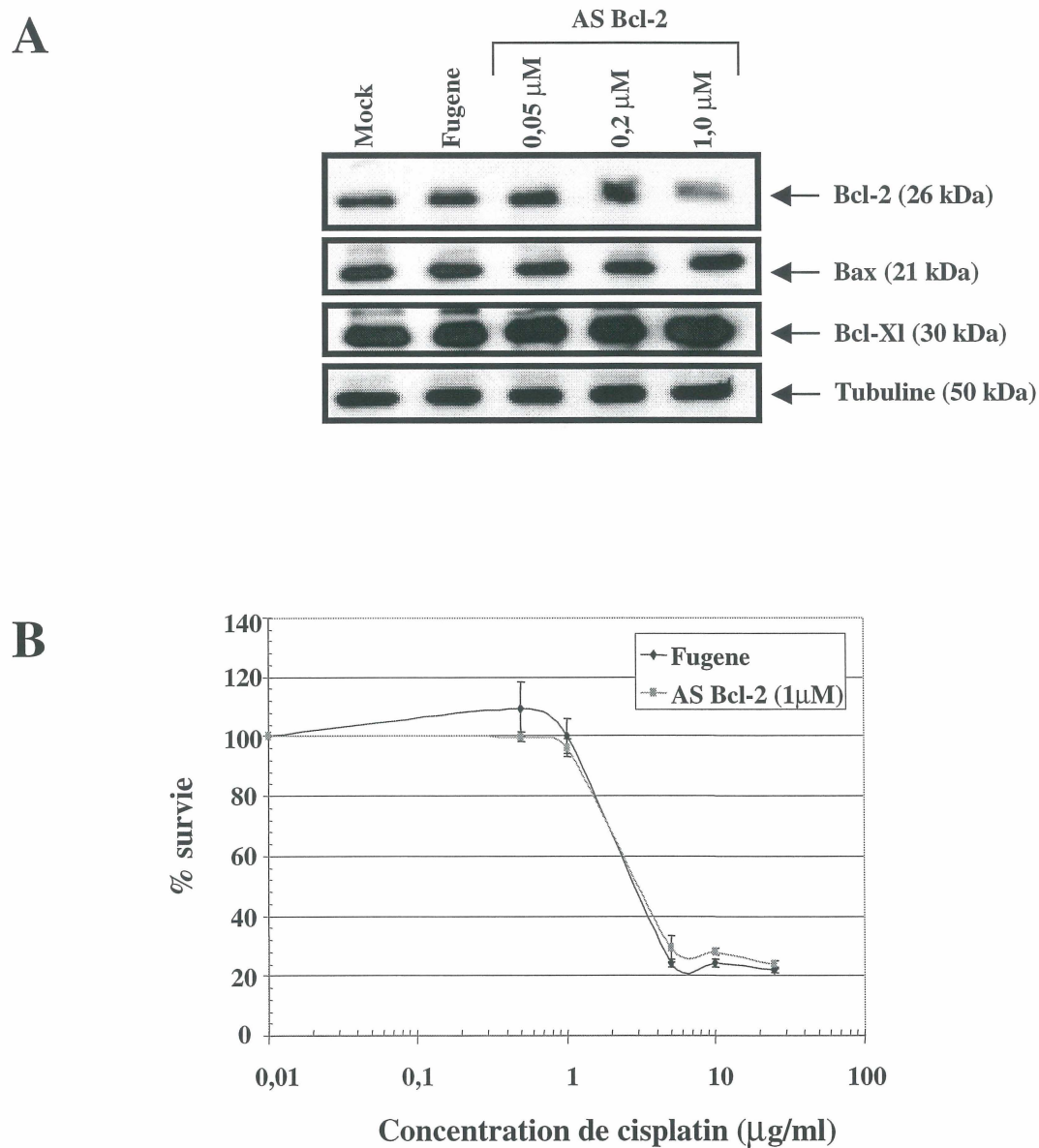
### **17.3. L'expression du scFv Bcl-2 n'influence pas les niveaux d'apoptose dans les clones stables KDEL et CYTO dans la lignée SKOV-3**

Afin d'analyser l'effet du scFv Bcl-2 sur l'activation de la cascade apoptotique en présence de drogue, le niveau d'activité de la caspase-3 a été mesuré suite au traitement des clones KDEL/scFv Bcl-2 et CYTO/scFv Bcl-2 dans les SKOV-3 avec du cisplatine ou de la staurosporine. La caspase-3 est une cystéine protéase du groupe des caspases effectrices de la cascade apoptotique. Lorsque la caspase-3 est activée suite à un stimulus apoptotique, la cellule affectée vient de passer un point de non retour, et est vouée à entrer en apoptose. Mesurer l'activité de la caspase-3 pour évaluer les niveaux d'apoptose dans des cellules est une approche couramment utilisée.



**Figure 18. L'inhibition par un antisens dirigé contre la protéine Bcl-2 ne sensibilise pas les cellules au cisplatine**

(A) Diminution de l'expression de la protéine Bcl-2 à l'aide d'un antisens (AS) commercial dirigé contre la protéine Bcl-2 dans la lignée de cancer ovarien SKOV-3ip1. Les cellules SKOV-3ip1 ont été transfectées avec des concentrations croissantes d'AS (0, 0,05, 0,2 et 1,0  $\mu\text{M}$ ), des lysats cellulaires ont été effectués puis analysés par immunobuvardage. Les membranes ont été hybridées avec des anticorps  $\alpha$ -Bcl-2,  $\alpha$ -Bax,  $\alpha$ -Bcl-X<sub>L</sub> et  $\alpha$ -tubuline. (B) Évaluation de la sensibilité au cisplatine des cellules SKOV-3ip1 traitées avec l'AS Bcl-2. Les cellules SKOV-3ip1 ont été transfectées avec l'AS Bcl-2 à une concentration de 1,0  $\mu\text{M}$ , puis ont été traitées avec des concentrations croissantes de cisplatine. Le pourcentage relatif de cellules vivantes a été déterminé à l'aide d'un essai de prolifération cellulaire de type XTT. Bien qu'une diminution de l'expression de la protéine Bcl-2 d'environ 50% ait été observée avec une concentration d'AS de 1  $\mu\text{M}$ , nous n'observons aucune sensibilisation des cellules traitées avec la même concentration d'AS.



**Figure 18.** L'inhibition par un antisens dirigé contre la protéine Bcl-2 ne sensibilise pas les cellules au cisplatine

L'activité de la caspase-3 est mesurée suite à l'ajout d'un substrat fluorogénique dans le lysat cellulaire à analyser. Si la caspase-3 a été activée suite à un stimulus apoptotique, elle clivera le substrat qui émettra de la fluorescence détectable à l'aide d'un fluorimètre. Comme le démontre les résultats de la Figure 19, nous observons une augmentation de l'activité de la caspase-3 lorsqu'il y a ajout de cisplatine ou de staurosporine, aussi bien dans le clone KDEL que CYTO. Cependant, les différences d'activité de la caspase-3 dans les cellules où le scFv KDEL ou CYTO est exprimé ne sont pas significatives. Ceci indique que les niveaux d'apoptose restent les mêmes qu'il y ait ou non expression du scFv Bcl-2 dans les clones étudiés. Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas d'augmentation de l'activité de la cascade apoptotique reliée à l'effet du scFv Bcl-2 CYTO (Figure 17A).

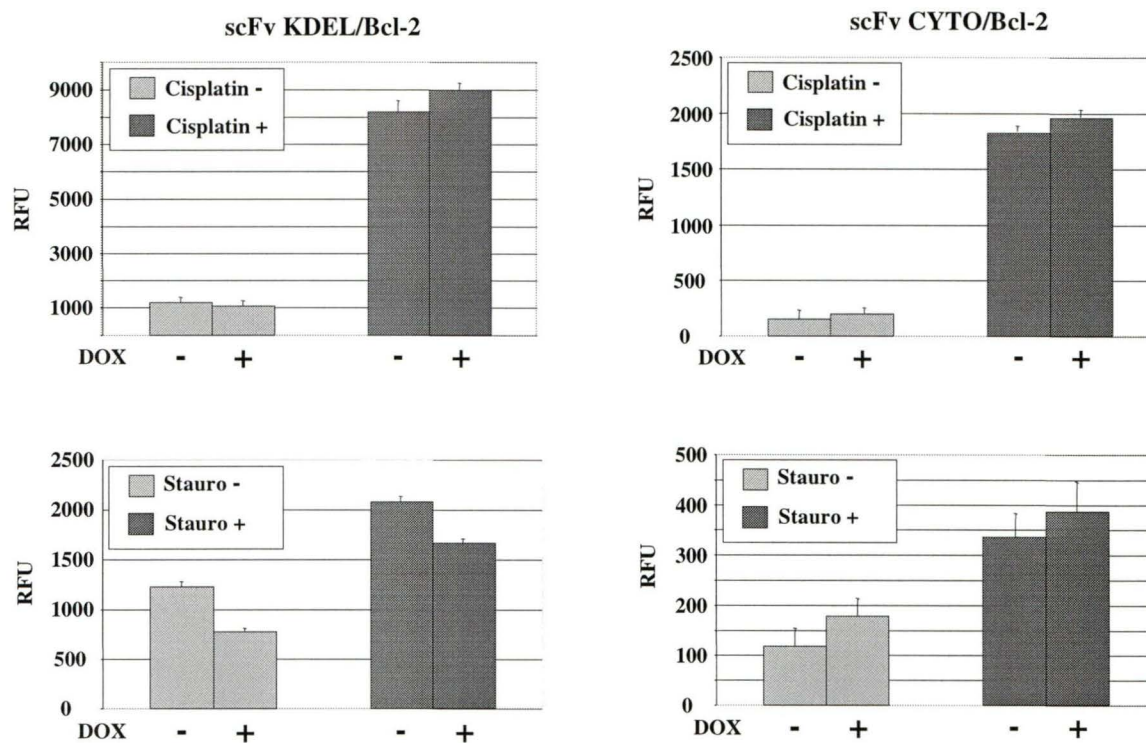
#### **17.4. Courbes de croissance dans les clones KDEL et CYTO dans les cellules SKOV-3 en absence de drogue**

Comme l'augmentation de sensibilité aux drogues observée en présence du scFv pour le clone CYTO dans les cellules SKOV-3 ne semble pas être reliée à une modification de l'activation de la cascade apoptotique, ni au statut de p53 dans la lignée SKOV-3, nous avons procédé à des essais de prolifération cellulaire en absence de drogue.

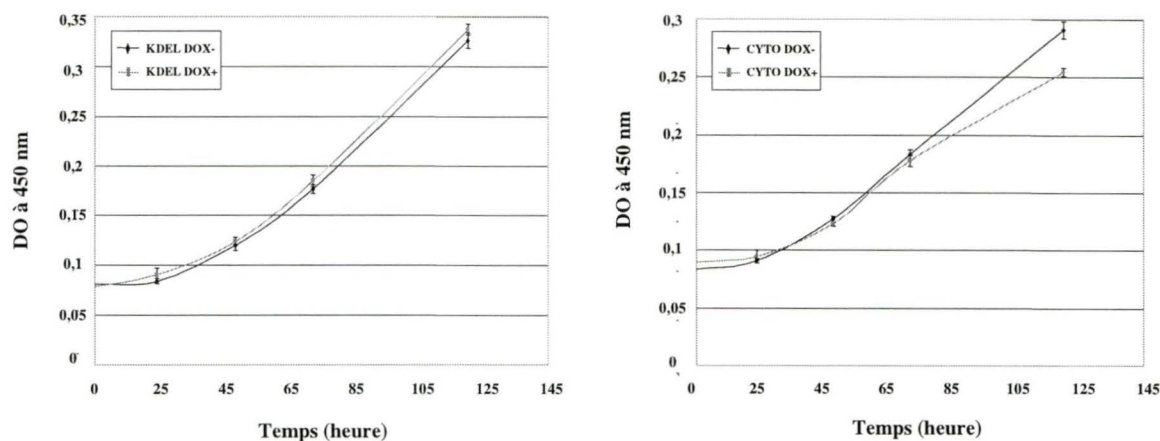
Les clones KDEL et CYTO dans la lignée SKOV-3 ont donc été mis en culture avec ou sans doxycycline et des essais XTT ont été effectués à 5, 24, 48, 72 et 120 heures pour mesurer la prolifération cellulaire. Des courbes de la densité optique à 450 nm en fonction du temps en heures ont été tracées pour chaque clone et chaque condition (Figure 20). Comme le montre les courbes du clone KDEL, la présence du scFv dans les cellules n'a aucun effet sur la

**Figure 19. L'expression du scFv Bcl-2 n'influence pas les niveaux d'apoptose dans les clones stables KDEL et CYTO dans la lignée SKOV-3**

Les niveaux d'apoptose ont été évalués par l'activation de la caspase-3. L'activité de la caspase-3 est mesurée à l'aide d'un fluorimètre, qui détecte la fluorescence émise par le clivage d'un substrat fluorogénique par les enzymes actives. Les données, exprimées en RFU, sont ensuite utilisées pour tracer des graphiques permettant la comparaison de l'activité de la caspase-3 dans les divers échantillons. Bien que les drogues entraînent l'activation de la caspase-3 dans tous les échantillons traités, nous n'observons aucune augmentation de l'activation de la cascade apoptotique en présence du scFv KDEL ou CYTO dans les cellules SKOV-3, que les cellules aient été traitées avec cisplatine ou de la staurosporine.



**Figure 19.** L'expression du scFv Bcl-2 n'influence pas les niveaux d'apoptose dans les clones stables KDEL et CYTO dans la lignée SKOV-3



**Figure 20. Courbes de croissance dans les clones KDEL et CYTO dans les cellules SKOV-3 en absence de drogue**

Les clones stables KDEL et CYTO dans les cellules SKOV-3 ont été mis en culture avec ou sans doxycycline. Des essais XTT ont été effectués à 5, 24, 48, 72 et 120 heures après avoir mis les cellules en culture. Des courbes du pourcentage de prolifération cellulaire en fonction du temps en heures ont été tracées et la croissance des cellules avec ou sans doxycycline comparée. Bien qu'aucune différence de prolifération cellulaire ne soit observée pour le clone KDEL, nous observons une diminution de la prolifération cellulaire en présence du scFv CYTO dans les cellules SKOV-3 après 5 jours.

prolifération cellulaire. Les densités optiques obtenues à chaque temps suite à l'ajout ou non de la doxycycline sont sensiblement les mêmes pour tous les temps des deux courbes. Dans le cas du clone CYTO, on observe une légère diminution de prolifération cellulaire après 5 jours. Cette diminution de prolifération en présence du scFv CYTO dans les cellules SKOV-3 pourrait être reliée à un arrêt ou un ralentissement dans la progression du cycle cellulaire. Cette hypothèse devra être vérifiée subséquemment.

## DISCUSSION

Le but de notre étude était d'évaluer l'importance relative de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans le phénomène de résistance à la chimiothérapie dans le cancer ovarien. Nous avons d'abord déterminé l'expression de la protéine Bcl-2 et la sensibilité au cisplatine *in vitro* de cellules d'ovaires normales et cancéreuses. Bien que la protéine Bcl-2 soit surexprimée dans les cellules d'ovaire cancéreuses, il n'y a aucune corrélation entre les niveaux d'expression de la protéine Bcl-2 et la sensibilité de ces cellules au cisplatine (Figure 6). De plus, le cisplatine entraîne la mort cellulaire en partie via l'activation de la voie mitochondriale de la cascade apoptotique, et cela indépendamment de la sensibilité des cellules au cisplatine (Figure 7). Pour mieux évaluer le rôle de la protéine Bcl-2 dans le phénomène de résistance, nous avons utilisé un scFv dirigé contre la protéine Bcl-2 afin d'empêcher cette dernière de jouer son rôle habituel dans la cellule. Ce scFv a été construit et validé par le groupe de Piché *et al.* (PICHÉ et al., 1998a). Nous avons tout de même analysé la séquence du scFv Bcl-2 (Figure 12), vérifié la localisation intracellulaire de nos scFvs ciblés au RE ou au cytoplasme (Figure 11), et confirmé l'interaction existant entre le scFv et la protéine Bcl-2 *in vitro* par immunoprécipitation (Figure 14). De plus, étant donné l'importance de la dimérisation des protéines de la famille Bcl-2 dans le contrôle de l'activation de la voie mitochondriale de la cascade apoptotique, nous nous sommes assurés que le scFv Bcl-2 interfère avec l'hétérodimérisation de la protéine Bcl-2 avec la protéine pro-apoptotique Bax (Figure 15). Ensuite, pour évaluer l'effet du scFv Bcl-2 dans des cellules de cancer ovarien, nous avons établi des clones stables dans les cellules SKOV-3 et SKOV-3ip1.



Nous avons choisi d'utiliser le système inductible pLTR pour établir nos clones stables, ce système permettant l'induction de l'expression de nos scFvs suite à l'ajout de doxycycline dans le milieu (Figure 16). Suite à l'expression du scFv Bcl-2 KDEL et CYTO dans les cellules SKOV-3ip1, nous n'avons observé aucune sensibilisation des cellules au cisplatine (Figure 17). Ce résultat a été confirmé avec un antisens commercial dirigé contre la protéine Bcl-2 dans la même lignée cellulaire. Suite à la transfection de l'AS, bien que nous observons une diminution d'expression de la protéine Bcl-2 d'environ 50%, il n'y a aucune sensibilisation de ces cellules au cisplatine (Figure 18). Toutefois, l'inhibition médiée par le scFv Bcl-2 CYTO dans les cellules SKOV-3 sensibilise ces dernières au cisplatine, cependant, seulement à de faibles doses de drogue (Figure 17). Cette augmentation de sensibilité observée avec ce clone ne semble pas être liée à une différence dans l'activation de la cascade apoptotique (Figure 19) ou une différence dans le statut de p53 (Figure 8). Cette différence observée à faible concentration de cisplatine dans les SKOV-3 en présence du scFv Bcl-2 CYTO pourrait être liée à un arrêt ou un ralentissement dans la progression du cycle cellulaire (Figure 20). Cependant, d'autres expériences seront nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

De nombreuses évidences retrouvées dans la littérature suggèrent un rôle important des protéines de la famille Bcl-2 dans la résistance des cancers aux agents chimiothérapeutiques (ELIOPOULOS et al., 1995; STROBEL et al., 1996; TUDOR et al., 2000). Plus précisément, dans les cas de cancer ovarien, il semble que la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> soit liée au phénomène de résistance. En effet, une surexpression de ces deux protéines a été observée dans de nombreuses lignées tumorales résistantes au cisplatine,

incluant des cellules de cancer ovarien. De plus, la surexpression exogène des protéines Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> confère aux cellules une résistance à différentes drogues (REED, 1995b; ELIOPOULOS et al., 1995). Bien que nous ayons nous-même constaté la surexpression de la protéine Bcl-2 dans les cellules d'ovaire cancéreuses comparativement aux cellules d'ovaire normales (Figure 6A), nous n'avons observé aucune corrélation entre l'expression de la protéine et la sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine (Figure 6B). Il est possible que la protéine Bcl-2 ait un rôle différent d'une lignée cellulaire à l'autre, ce qui pourrait expliquer la variation de son expression dans les lignées de cancer ovarien étudiées. L'activité de la protéine Bcl-2 pourrait également être reliée à son état de phosphorylation dans la cellule. Des évidences récentes indiquent que les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2 pourraient être régulées par sa phosphorylation (BLAGOSKLONNY, 2001). Il a également été démontré qu'il existe un lien entre l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques et la phosphorylation de Bcl-2. La phosphorylation de Bcl-2 induite par le taxol intéresse particulièrement les oncologistes; ce type de drogue inhibe la polymérisation des microtubules et mène à l'arrêt de la mitose. Haldar et ses collègues ont montré que le traitement au taxol de cellules de cancer de la prostate exprimant Bcl-2 induit la phosphorylation de Bcl-2 et également la mort cellulaire programmée, tandis que le traitement de cellules de prostates cancéreuses nulles pour Bcl-2 n'induit pas l'apoptose. De plus, il semble que la phosphorylation de Bcl-2 inhibe sa liaison avec Bax, puisqu'ils ont observé une diminution de Bax dans les immunocomplexes avec Bcl-2 dans les cellules cancéreuses traitées avec le taxol (HALDAR et al., 1996). Ainsi, dans le modèle de cancer ovarien, les niveaux d'expression de

la protéine Bcl-2 n'aurait peut-être pas l'importance que nous leur avons accordé initialement.

Nous avons ensuite déterminé si la mort cellulaire observée suite au traitement des cellules au cisplatine se fait indépendamment de la sensibilité des cellules à cette drogue. Dans la Figure 7B, nous observons que d'une manière générale les pourcentages d'apoptose entraînés par le cisplatine varient d'une lignée cellulaire à l'autre, mais sont relativement semblables pour chacune des lignées analysées individuellement. Cependant, si nous nous attardons aux valeurs obtenues pour les lignées SKOV-3 et COV-2, qui sont des cellules beaucoup plus sensibles au cisplatine que les autres cellules, nous observons qu'elles ont des pourcentages d'apoptose beaucoup plus faibles que les autres lignées. Ces résultats suggèrent que si la protéine Bcl-2 joue un rôle dans le phénomène de résistance, ce n'est pas au niveau du contrôle de la cascade apoptotique.

La plupart des groupes qui étudient le rôle des protéines de la famille Bcl-2 surexpriment ces dernières dans leurs systèmes cellulaires. La surexpression de protéines a pour effet de surcharger les cellules étudiées, ce qui ne représente pas tout à fait ce qui se produit en réalité dans les cellules tumorales. Bien que cela permette de confirmer le rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans le contrôle de l'activation de la cascade apoptotique, il reste tout de même difficile de confirmer à quel niveau de la voie elles agissent, et quel est leur rôle précis dans la voie étudiée. Une approche permettant d'inhiber une protéine dans la cellule afin qu'elle ne puisse jouer son rôle habituel serait plus appropriée pour évaluer le rôle de la protéine d'intérêt. En inhibant la protéine Bcl-2 dans les cellules cancéreuses, nous espérons

être en mesure de sensibiliser ces cellules au cisplatine. De nombreux groupes ont utilisé les scFvs pour abroger l'expression d'oncoprotéines (PICHÉ et al., 1998a; DESHANES et al., 1995b). Ainsi, les scFvs peuvent entraîner une invalidation fonctionnelle effective de protéines cibles. Plusieurs expérimentations utilisant des antisens ont permis de démontrer qu'il est possible de sensibiliser des cellules résistantes à la chimiothérapie en modulant l'expression de la protéine Bcl-2 (ZANGEMEISTER-WITTKE et al., 2000; SCHLAGBAUER-WADL et al., 2000, JANSEN et al., 1998). Toutefois, aucune évidence de l'effet d'un antisens dirigé contre la protéine Bcl-2 sur la sensibilisation de cellules de cancer ovarien n'a encore été publiée. Dans le même ordre d'idée, nous avons choisi d'utiliser un scFv dirigé contre la protéine Bcl-2 pour évaluer le rôle de cette protéine dans des lignées de cancer ovarien, nous permettant ainsi d'éviter les études de surexpression. Plusieurs groupes ont réussi à démontrer l'efficacité de la technologie des scFvs, dont le groupe de Marasco *et al.* qui a publié des résultats attestant que des scFvs dirigés contre certaines composantes du VIH peuvent abolir la production de virions de cellules infectées (MARASCO, 1997; MARASCO et al., 1993; MHASHILKAR et al., 1995). Le scFv dirigé contre la protéine Bcl-2 que nous utilisons dans la présente étude a été construit, validé et utilisé antérieurement. Piché *et al.* ont réussi à moduler les niveaux de protéines Bcl-2 dans la lignée de cancer du sein MCF-7 à l'aide de ce scFv Bcl-2, cet effet causant une augmentation de la cytotoxicité induite par le cisplatine, démontrant ainsi l'efficacité de cette méthode (PICHÉ et al., 1998a). Ce scFv nous semblait donc être un bon outil pour évaluer l'importance de la protéine Bcl-2 dans le phénomène de résistance observé dans de nombreux cas de cancer ovarien.

Bien que le scFv Bcl-2 ait été validé par le groupe de Piché *et al.*, nous avons procédé à la vérification de certaines des propriétés associées aux scFvs pour confirmer l'intégrité et l'efficacité du scFv Bcl-2 utilisé pour notre étude. Pour qu'un scFv soit efficace, il doit nécessairement interagir avec sa cible. Le scFv Bcl-2 interagit avec la protéine Bcl-2 au niveau de la « loop » située entre les domaines BH3 et BH4 (Figure 13). Nous avons démontré cette interaction *in vitro* entre le scFv et la protéine Bcl-2 par immunoprécipitation dans les cellules HeLa, qui sont des cellules de col de l'utérus (Figure 14). Comme il est possible que la protéine Bcl-2 ait un rôle différent dépendant des lignées cellulaires, il serait approprié de vérifier l'interaction entre le scFv et la protéine dans des cellules de cancer ovarien. Ensuite, étant donné l'importance de la dimérisation des membres de la famille de protéines Bcl-2, plus précisément la capacité de la protéine Bcl-2 d'hétérodimériser avec d'autres membres de la famille comme Bax, et d'opposer leurs effets, menant ainsi à une prolongation de la survie cellulaire (ELIOPOULOS *et al.*, 1995; REED, 1995a; TUDOR *et al.*, 2000), nous avons vérifié que le scFv Bcl-2 est capable de bloquer l'interaction entre les protéines Bcl-2 et Bax (Figure 15). En se liant tout près du domaine BH3, impliqué dans la dimérisation de Bcl-2 avec ses partenaires, le scFv empêche la liaison d'autres protéines avec Bcl-2, prévenant ainsi l'effet anti-apoptotique entraîné par cette dernière. Ces interactions entre le scFv et la protéine Bcl-2 ont été démontrées seulement *in vitro*. Il serait donc intéressant et important de démontrer éventuellement la liaison du scFv avec la protéine Bcl-2 *in vivo*; le système de « Bioluminescence Resonance Energy Transfer » (BRET) permettant d'examiner l'interaction entre deux protéines serait tout à fait approprié. Cependant, certaines évidences suggèrent fortement que le scFv Bcl-2 est fonctionnel *in vivo* dans la cellule. Tel

que mentionné précédemment, le groupe de Piché *et al.* a observé une augmentation de la toxicité induite par le cisplatine dans des cellules tumorales exprimant le scFv Bcl-2 (PICHÉ *et al.*, 1998a). De plus, dans la présente étude, nous observons une diminution de la survie cellulaire dans les cellules SKOV-3 chez lesquelles le scFv Bcl-2 CYTO est exprimé (Figure 17).

Il est possible de cibler les scFvs dans des compartiments cellulaires précis où ils peuvent interagir avec leurs cibles et empêcher ces dernières de jouer leur rôle dans la cellule (TEILLAUD, 1999; PUMPHREY *et* MARASCO, 1998; MARASCO, 1997). Des signaux de localisation intracellulaire sont ajoutés aux scFvs pour les diriger dans les bons compartiments cellulaires (Figure 9). Dans notre cas, nous voulons que notre scFv empêche la protéine Bcl-2 de jouer son rôle habituel dans la cellule. Nous devons donc déterminer à quel endroit dans la cellule le scFv et la protéine Bcl-2 avaient le plus de chance de se rencontrer. La protéine Bcl-2 est retrouvée dans la cellule au niveau des membranes du RE, de la mitochondrie et du noyau (ZIMMERMANN *et al.*, 2001; JOHNSTONE *et al.*, 2002; MARTINOU *et* GREEN, 2001). Étant donné le rôle important de la protéine Bcl-2 dans le contrôle de l'activation de la voie mitochondriale de la cascade apoptotique, et comme le domaine avec lequel le scFv interagit avec la protéine se retrouve au niveau du cytoplasme, nous avons supposé que le cytoplasme est un endroit favorable à la rencontre du scFv et de la protéine. Aucune séquence de localisation n'est nécessaire pour diriger un scFv au niveau du cytoplasme, cependant, il risque d'être moins stable qu'à l'intérieur d'une organelle comme le RE. Toutefois, il semble que notre scFv localisé au niveau du cytoplasme soit relativement stable. Suite à l'analyse de lysats cellulaires de clones stables exprimant les scFv Bcl-2 CYTO, nous détectons des

niveaux de scFvs considérables (Figure 16). De plus, l'effet sensibilisateur entraîné par le scFv CYTO sur les cellules SKOV-3 (Figure 17) nous indique clairement que le scFv localisé au cytoplasme, dans notre cas, est efficace. Nous avons également utilisé un scFv ciblé au niveau du RE. Il est possible que la protéine Bcl-2 se rende jusqu'au niveau du RE avant d'être relocalisée aux membranes des différentes organelles mentionnées ci-dessus. Cependant, rien ne nous assure que la protéine Bcl-2 sera séquestrée par le scFv à l'intérieur du RE en quantité suffisante pour qu'il y ait un effet sensibilisateur dans les cellules où il est exprimé. Les localisations des scFv Bcl-2 ciblés au RE et au niveau du cytoplasme ont néanmoins été confirmées par immunofluorescence, et démontrent des patrons correspondants aux localisations de protéines résidentes de ces organelles (Figure 11).

Afin de mieux évaluer l'effet des scFvs dans des cellules de cancer ovarien, nous avons procédé à l'établissement de clones stables dans les lignées de cancer ovarien SKOV-3 et SKOV-3ip1 (Figure 16). Contrairement aux transfections transitoires qui sont peu efficaces et difficilement reproductibles, l'établissement de clones stables permet d'obtenir des populations de cellules homogènes exprimant toutes le scFv Bcl-2. De plus, le système que nous avons choisi est un système inductible (Figure 9). Pour l'établissement de nos clones stables, nous avons d'abord choisi la lignée SKOV-3ip1 puisqu'elle est très agressive, résistante au cisplatine et exprime des niveaux plutôt considérables de Bcl-2. La lignée SKOV-3 quant à elle est beaucoup plus sensible au cisplatine et exprime des niveaux de Bcl-2 plus élevés que la lignée SKOV-3ip1. Des clones stables établis dans les SKOV-3 et dans les SKOV-3ip1 ont donc été analysés afin de vérifier l'expression inductible des scFv Bcl-2 KDEL et CYTO (Figure 16).

Dans les cellules SKOV-3ip1, l'inhibition de la protéine Bcl-2 par le scFv Bcl-2 n'a entraîné aucun effet sensibilisant sur ces cellules traitées au cisplatine (Figure 17). L'inhibition de la protéine Bcl-2 par un antisens commercial ciblant l'ARNm de la protéine dans la même lignée cellulaire n'a également eu aucun effet de sensibilisation au cisplatine, bien qu'une diminution du niveau d'expression de Bcl-2 d'environ 50% ait été observée à une concentration d'antisens de 1  $\mu$ M (Figure 18). Avec le même antisens commercial, à une concentration équivalente à celle que nous avons utilisée, le groupe de Jansen et al. a obtenu un effet sensibilisateur sur des cellules de mélanome avec une réduction du niveau d'expression de la protéine Bcl-2 de 47% (JANSEN et al., 1998); ces résultats suggérant que la diminution d'expression de la protéine Bcl-2 observée serait suffisante pour entraîner un effet sensibilisateur si la protéine Bcl-2 avait un rôle dans le phénomène de résistance. La surexpression de la protéine Bcl-2 n'aurait donc pas de rôle significatif dans le phénomène de résistance dans la lignée de cancer ovarien SKOV-3ip1. Le manque d'abrogation complète de la protéine Bcl-2 est une autre explication possible de l'effet limité entraîné par le scFv Bcl-2. Il est possible que les niveaux d'expression des scFvs dans les clones stables analysés ne soient pas assez élevés pour cibler complètement les niveaux de protéines Bcl-2 (PICHÉ et al., 1998c). Cependant, l'inhibition de la protéine Bcl-2 par le scFv Bcl-2 CYTO dans la lignée SKOV-3 sensibilise les cellules au cisplatine et à la staurosporine. Une diminution de survie cellulaire d'environ 20% est observée à de faibles concentrations avec les deux drogues (Figure 17).

L'augmentation de sensibilité observée dans le clone CYTO dans les SKOV-3 peut être causée par différents mécanismes dans la cellule. De nombreuses études ont montré que



Bcl-2 prolonge la survie cellulaire en empêchant l'entrée en apoptose, et que les drogues anti-cancéreuses entraînent la mort cellulaire en induisant la mort cellulaire programmée (HOCKENBERY et al., 1993; REED, 1994; YANG et al., 1996). Nous avons donc regardé si une différence dans l'activation de la cascade apoptotique pouvait être la cause de cette augmentation de sensibilité. Nous avons donc procédé à un essai de caspase-3 pour déterminer s'il y a une augmentation de l'activation de l'apoptose dans les cellules sensibilisées (Figure 19). Toutefois, nous n'avons observé aucune augmentation significative de l'activation de la caspase-3 suite au traitement du clone SKOV-3 CYTO avec des drogues, que le scFv soit exprimé ou non dans ces cellules. Ce résultat suggère que la sensibilisation observée avec le clone CYTO dans les cellules SKOV-3 n'est pas due à une différence de l'activation de la cascade apoptotique.

Étant donné l'importance de la protéine p53 dans des cellules dont l'ADN est endommagé, nous avons analysé le statut de p53 dans nos lignées cancéreuses (Figure 8). La voie de p53 étant activée suite au traitement de cellules avec le cisplatine, si la voie de p53 est intacte, une augmentation de l'expression de la protéine p53 devrait être observée dans les cellules traitées avec la drogue. En accord avec les données retrouvées dans la littérature, les cellules SKOV-3 sont nulles pour p53 (CUELLO et al., 2001; COUKOS et RUBIN, 1998; DEBERNARDIS et al., 1997; DEMPKE et al., 2000). Les SKOV-3ip1 sont également nulles pour p53, résultat plutôt prévisible puisque cette lignée a été dérivée à partir des SKOV-3. Alors, la protéine p53 étant absente dans ces deux lignées, la diminution de survie cellulaire observée ne peut être entraînée par cette dernière. Une autre possibilité pouvant expliquer la différence observée dans le clone CYTO serait un changement au niveau de la prolifération

cellulaire. Des courbes de prolifération cellulaire ont donc été tracées pour déterminer si l'inhibition entraînée par l'expression du scFv dans le clone CYTO dans les cellules SKOV-3 affecte le cycle cellulaire (Figure 20). Nous observons en effet une diminution de la prolifération cellulaire en présence du scFv dans le clone CYTO en absence de drogue dans les cellules SKOV-3, ceci indiquant que le scFv entraîne possiblement un ralentissement ou l'arrêt du cycle cellulaire dans ces cellules. Cependant, nous ne pouvons négliger la possibilité que le scFv Bcl-2 induise des perturbations cellulaires indépendamment de son interaction avec la protéine Bcl-2. Il serait donc approprié de regarder la prolifération cellulaire d'un clone stable exprimant un scFv contrôle, par exemple ciblé contre une protéine autre que celles de la famille Bcl-2, pour vérifier que l'effet observé avec le clone CYTO n'est pas non spécifique.

Il est peu probable que la surexpression de Bcl-2 soit le seul facteur responsable du phénotype de résistance dans les cellules de cancer ovarien. Des études précédentes ont montré que l'acquisition du phénotype de résistance peut se produire via plusieurs mécanismes distincts, incluant une modification du métabolisme du glutathion (COUKOS et RUBIN, 1998; HAMILTON et JONHSON, 2000), l'augmentation de l'activité des mécanismes de réparation de l'ADN, ainsi qu'une augmentation de l'expression du produit du gène MDR1 (HAMILTON et JOHNSON, 2000; SOOD et BULLER, 1998). De plus, de nombreuses protéines sont impliquées dans la régulation de la cascade apoptotique. Il est possible que certaines d'entre elles jouent un rôle dans le phénomène de résistance à la chimiothérapie. Il est également possible que la contribution de chacune de ces protéines dans la résistance au cisplatine varie dépendamment du type cellulaire. D'autres membres de la famille Bcl-2, mis à

part Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, sont importants dans l'activation de la cascade apoptotique. Il a été montré que des cellules leucémiques déficientes en Bak, une protéine pro-apoptotique de la même sous-famille que Bax, sont résistantes à l'apoptose induite par le cisplatine, et que la sensibilité de ces cellules à cette drogue anti-cancéreuse ne peut être rétablie par l'ajout exogène de Bax recombinant (WANG et al., 2001), suggérant un rôle pour Bak dans le phénomène de résistance, du moins dans les cellules leucémiques. D'autre part, la voie mitochondriale menant à l'apoptose requiert la relâche de cytochrome c dans le cytoplasme de la cellule pour initier la formation de l'apoptosome, composé du cytochrome c, d'Apaf-1 et de la procaspase-9. L'apoptosome recrute et active la procaspase-9, qui à son tour active les caspases-3 et -7, qui elles entraînent la mort cellulaire par protéolyse. Comme l'inactivation de cette voie promouvoit l'oncogenèse, le groupe de Wolf et al. a analysé dix lignées cellulaires de cancer ovarien (WOOLF et al., 2001). Ils ont montré que bien que les lignées cellulaires expriment toutes Apaf-1 ainsi que les caspases-9, -3, et -7; chacune démontrait une activité d'Apaf-1 plus faible en comparaison avec les cellules normales. Un inhibiteur compétiteur d'Apaf-1 pourrait expliquer la diminution d'activité de ce dernier, ainsi que l'expression d'un isoforme d'Apaf-1 modifié, délété ou muté. Bien qu'il ne s'agisse pour le moment que d'hypothèses, il semble que la régulation de l'activité d'Apaf-1 soit importante pour la régulation de l'apoptose et possiblement pour le phénomène de résistance dans certaines lignées de cancer ovarien. Aussi, il a été montré que la surexpression d'Akt est impliquée dans la résistance aux drogues, et que le traitement avec des drogues anti-cancéreuses et la privation des cellules de facteurs de croissance supprime l'activité d'Akt menant ainsi à l'apoptose (PAGE et al., 2000). L'activation d'Akt inhibe aussi directement la

caspas-9 impliquée dans l'apoptose (ZHOU et al., 2000). L'activité d'Akt est régulée par les niveaux protéiques de XIAP, un membre des IAPs, des inhibiteurs de l'apoptose. Une diminution de XIAP, une induction du clivage d'Akt et l'induction de l'apoptose ont été observé dans des cellules de cancer ovarien sensibles au cisplatine, mais non dans les cellules résistantes suite au traitement avec la drogue (ASSELIN et al., 2001), suggérant l'implication de ces protéines dans le phénomène de résistance.

Toutefois, de plus en plus d'évidences dans la littérature suggèrent un rôle possible pour les protéines Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub> dans le contrôle du cycle cellulaire (HUANG et al., 1997; VILENCHIK et al., 2002). Récemment, le groupe de Stein (VILENCHIK et al., 2002) a montré une diminution de l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> par un antisens, entraînant également une diminution des taux de prolifération cellulaire et de résistance à différents agents chimiothérapeutiques. De plus, selon Huang et al. (HUANG et al., 1997), Bcl-2 non seulement inhibe l'apoptose, mais empêche également l'entrée dans le cycle cellulaire. Ils ont démontré que l'action inhibitrice de Bcl-2 sur le cycle cellulaire peut être génétiquement séparée de son habileté à promouvoir la survie cellulaire. L'effet de Bcl-2 sur le cycle cellulaire semble tout de même être étroitement relié à son activité anti-apoptotique; d'ailleurs trois mutations au niveau du domaine BH4 inactivant Bcl-2 abrogent les deux activités. Il semble donc que la fonction de contrôle du cycle cellulaire de Bcl-2 soit distincte, mais dépendante de sa fonction anti-apoptotique. Aussi, plusieurs ont remarqué que la surexpression de Bcl-2 ainsi que de ses homologues fonctionnels, n'affectent pas le taux de croissance de lignées cellulaires cultivées dans des conditions optimales, mais seulement le taux auquel les cellules transitent de la phase de quiescence G<sub>0</sub> à la phase S (HUANG et al.,

1997; FANIDI et al. 1992, O'REILLY et al., 1996). Mais comment la région C-terminale du domaine BH4 de la protéine Bcl-2 et de ses homologues modulent l'activité du cycle cellulaire? Des modifications post-traductionnelles de ces résidus pourraient être essentielles à Bcl-2 pour interagir avec une protéine qui régule la transition  $G_0/G_1$ . L'incapacité de former ce complexe pourrait permettre aux cellules quiescentes d'entrer dans le cycle cellulaire plus rapidement (HUANG et al., 1997).

Étant donné l'implication possible d'un grand nombre de molécules dans le phénomène de résistance dans le cancer, la modulation médiée par un scFv dirigé contre un seul facteur impliqué dans la résistance, comme Bcl-2, a peu de chance de réussir à entraîner une réversion du phénotype observé. Une analyse plus approfondie des mécanismes de résistance mentionnés ci-dessus dans les cellules de cancer ovarien utilisées, ainsi que l'utilisation de scFvs dirigés contre d'autres protéines de la famille de Bcl-2, telles que Bcl-X<sub>L</sub> et Bax, seuls ou en combinaison permettront d'évaluer la résistance dans le modèle de cancer ovarien. Contrairement à notre hypothèse de départ selon laquelle nous suggérons un rôle pour la protéine Bcl-2 dans l'augmentation de l'activation de la cascade apoptotique, il semble possible, d'après nos résultats et de récentes découvertes, qu'il puisse exister un rôle pour la protéine Bcl-2 dans le contrôle du cycle cellulaire dans des cellules de cancer ovarien.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Différentes évidences retrouvées dans la littérature, démontrant l'importance des protéines de la famille Bcl-2 dans le phénomène résistance, nous ont amené à vouloir déterminer l'importance relative de la protéine Bcl-2 dans le phénomène de résistance clinique à la chimiothérapie dans le cancer ovarien.

Bien que nous ayons observé une surexpression de la protéine Bcl-2 dans nos cellules de cancer ovarien, nous n'avons observé aucune corrélation entre les niveaux d'expression de la protéine Bcl-2 et la sensibilisation au cisplatine des cellules d'ovaire cancéreuses humaines. D'autre part, bien que le cisplatine induise la mort cellulaire en activant la voie mitochondriale de la cascade apoptotique, il n'y a aucune corrélation entre le degré d'activation de la cascade apoptotique et la sensibilité des cellules au cisplatine.

Plutôt que de procéder à l'analyse du rôle de la protéine Bcl-2 à l'aide d'études de surexpression protéique, nous avons préféré utiliser un inhibiteur dirigé contre la protéine Bcl-2 pour l'empêcher de jouer son rôle habituel dans la cellule. Nous avons utilisé un scFv dirigé contre la protéine Bcl-2 ciblé au RE ou au cytoplasme. Nous avons montré que les scFvs utilisés pour évaluer le rôle de la protéine Bcl-2 peuvent être exprimés et localisés dans les compartiments cellulaires appropriés à l'aide de signaux de localisation. De plus, le scFv Bcl-2 que nous utilisons interagit avec la protéine Bcl-2 et réduit l'hétérodimérisation de cette protéine avec Bax *in vitro*. L'inhibition de Bcl-2 médiée par le scFv Bcl-2 ou un antisens ne

sensibilise pas les cellules SKOV-3ip1 au cisplatine. Toutefois, l'inhibition de la protéine Bcl-2 médiée par le scFv Bcl-2 dirigé au cytoplasme sensibilise les cellules SKOV-3 à de faibles concentrations de cisplatine. Cette différence n'est pas reliée à une différence dans l'activation de la cascade apoptotique ou une différence dans le statut de p53. Cette différence observée à de faibles concentrations de drogue dans les cellules SKOV-3 semble plutôt reliée à un arrêt ou un ralentissement dans la progression du cycle cellulaire.

Dans un avenir rapproché, nous devrions d'abord évaluer la possibilité d'un effet non spécifique entraîné par le scFv ainsi que les liens possibles entre la protéine Bcl-2 et la régulation du cycle cellulaire. Il serait intéressant aussi de valider l'interaction entre la protéine Bcl-2 et le scFv Bcl-2, ainsi que le déplacement de partenaires tel que Bax par le scFv *in vivo* dans des cellules de cancer ovarien. Finalement, il serait également intéressant d'étudier le rôle de la protéine Bcl-2 dans des cellules primaires de cancer ovarien, représentant probablement plus fidèlement le phénomène de résistance se produisant chez les patientes que les lignées de cancer ovarien établies, ayant subi de nombreux passages au fil du temps.

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Alain Piché, et ma co-directrice, Claudine Rancourt, qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires. Alain est un excellent enseignant trouvant à tout coup le mot ou l'expression appropriée, j'ai retiré beaucoup de nos discussions. Il m'a appris à découvrir mon esprit critique et analytique, et surtout à développer mon autonomie et ma confiance en moi-même. Merci pour tout.

Je tiens également à remercier sincèrement mes collègues de laboratoire avec qui j'ai partagé de nombreux moments mémorables. Un merci particulier aux assistants de recherche : Carole Bergeron, Denis Lane et Lise Imbeault avec qui j'ai eu d'agréables discussions aussi bien scientifiques que divertissantes. Je tiens à souligner plus spécialement Carole Bergeron et Mélanie Simoneau, qui sont devenues de bonnes amies et de précieuses confidentes, et qui m'ont aidé à traverser les moments plus difficiles.

En terminant, je voudrais remercier affectueusement les membres de ma famille qui m'ont supporté moralement et financièrement tout au long de mes études, mes amis (es) qui m'ont écouté, encouragé et aidé à me changer les idées, et un merci tout particulier à Laurence, mon copain, avec qui j'ai passé ces deux belles années de ma vie.



## RÉFÉRENCES

**Adams J.M., Harris A.W., Strasser A., Ogilvy S. et Cory S.** 1999. Transgenic models of lymphoid neoplasia and development of a pan-hematopoietic vector. *Oncogene*, 18 : 5268-5277.

**Aslaro F.K., et McDonnell, W.M.** 1995. Antisense-oligonucleotide therapy. *New Engl. J. Med.*, 334 : 316-318.

**Asselin E., Mills G.B., and Tsang B.K.** 2001. XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res.*, 61 : 1862-1868.

**Barnes M.N., Coolidge C.J., Hemminki A., Alvarez R.D. et Curiel D.T.** 2002. Conditionally replicative adenoviruses for ovarian cancer therapy. *Mol. Cancer. Ther.*, 1 : 435-439.

**Barnes M.N., Deshane J.S., Siegal G.P., Alvarez R.D., Curiel D.T.** 1996. Novel gene therapy strategy to accomplish growth factor modulation induces enhanced tumor cell chemosensitivity. *Clin. Cancer Res.*, 2 (7) : 1089-1095.

**Bertrand R., Solary E., O'Connor P., Kohn K.W. et Pommier Y.** 1994. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp. Cell Res.*, 211 (2) : 314-321.

**Blagosklonny M.V.** 2001. Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia*, 15 (6) : 869-874.

**Bunnell B.A. et Morgan R.A.** 1998. Gene therapy for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11 (1) : 42-56.

**Chen S-Y. et Marasco W.A.** 1996. Novel genetic immunotoxins and intracellular antibodies for cancer therapy. *Semin. Oncol.*, 23 (1) : 148-153.

**Coukos G. et Rubin S.C.** 1998. Chemotherapy resistance in ovarian cancer : new molecular perspectives. *Obstet. Gynecol.*, 91 : 783-792.

**Cuello M., Ettenberg S.A., Nau M.M. et Lipkowitz S.** 2001. Synergistic induction of apoptosis by the combination of TRAIL and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.*, 81 : 380-390.

**Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., and Greenberg M.E.** 1997. Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91 : 231-241.

**Debernardis D., Graniela Sire E., De Feudis P., Vikhanskaya F., Valenti M., Russo P., Parodi S., D'Incalci M. et Brogгинi M.** 1997. p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel. *Cancer Res.*, 57 (5) : 870-874.

**De Feudis P., Debernardis D., Beccaglia P., Valenti M., Graniela Sire E., Arzani D., Stanzione S., Parodi S., D'Incalci M., Russo P. et Brogгинi M.** 1997. DDP-induced cytotoxicity is not influenced by p53 in nine human ovarian cancer cell lines with different p53 status. *Br. J. Cancer*, 76 (4) : 474-479.

**Delpeso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R., and Nunez G.** 1996. Interleukin-3-induced phosphorylation of Bad through the protein kinase Akt. *Science*, 278 : 687-689.

**Dempke W., Voigt W., Grothey A., Hill B.T., et Schmoll H-J.** 2000. Cisplatin resistance and oncogenes – a review. *Anticancer Drugs*, 11 (4) : 225-236.

**Deshane J., Cabrera G., Grim J.E., Siegal G.P., Pike J., Alvarez R.D. et Curiel D.T.** 1995a. Targeted eradication of ovarian cancer mediated by intracellular expression of anti-erbB-2 single-chain antibody. *Gynecol. Oncol.*, 59 (1) : 8-14.

**Deshane J., Siegal G.P., Alvarez R.D., Wang M.H., Feng M., Cabrera G., Liu T., Kay M. et Curiel D.T.** 1995b. Targeted tumor killing via an intracellular antibody against erbB-2. *J. Clin. Invest.*, 96 (6) : 2980-2989.

**Douglas J.T., Rogers B.E., Rosenfeld M.E., Michael S.I., Feng M., and Curiel D.T.** 1996. Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat. Biotechnol.*, 14 (11) : 1574-1578.

**El-Deiry W.S.** 1999. The role of p53 in chemosensitivity. Dans : *Apoptosis and chemotherapy*. Humana Press Inc., 37-52.

**Eliopoulos A.G., Kerr D.J., Herod J., Hodgkins L., Krajewski S., Reed J.C. et Young L.S.** 1995. The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer : influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene*, 11 (7) : 1217-1228.

**Fanidi A., Harrington E.A. and Evan G.I.** 1992. Cooperative interaction between c-myc and Bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*, 359 : 554-556.

**Fox S.B., Smith K., Hollyer J., Greenall M., Hastrich D., and Harris A.L.** 1994. The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker : results of 370 patients and review of 3009 patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 29 : 41-49.

**Frankel A., Rosen K., Filmus J. et Kerbel R.S.** 2001. Induction of anoikis and suppression of human ovarian tumor growth in vivo by down-regulation of Bcl-X<sub>L</sub>. *Cancer Res.*, 61 : 4837-4841.

**Gil J., Yamamoto H., Zapata J.M., Reed J.C. et Perucho M.** 1999. Impairment of the proapoptotic activity of Bax by missense mutations found in gastrointestinal cancers. *Cancer Res.*, 59 (9) : 2034-2037.

**Gonzalez V.M., Fuertes M.A., Alonso C. et Perez J.M.** 2001. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol. Pharmacol.*, 59 (4) : 657-663.

**Gottesman M.M.** 2002. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.*, 53 : 615-627.

**Green D.R. et Reed J.C.** 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381) : 1309-1312.

**Greenlee R.T., Hill-Harmon M.B., Murray T. et Thun M.** 2001. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J. Clin.*, 51 (1) : 15-36.

**Gupta S.** 2001. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.*, 69 (25-26) : 2957-2964.

**Haldar S., Chintapalli J., and Croce C.M.** 1996. Taxol induces Bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 56 : 1253-1255.

**Hamaguchi K., Godwin A.K., Yakushiji M., O'Dwyer P.J., Ozols R.F. et Hamilton T.C.** 1993. Cross-resistance to diverse drugs is associated with primary cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.*, 53 : 5225-5232.

**Hamilton T.C. et Johnson S.W.** 2000. Recent insights into drug resistance in ovarian cancer. Dans : *Methods in molecular medicine*. Humana Press Inc., 39 : 89-106.

**Herr I. et Debatin K-M.** 2001. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 98 (9) : 2603-2614.

**Hockenbery D.M., Oltval Z.N., Yin X., Milliman C.L. and Korsmeyer S.J.** 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75 : 241-251.

**Huang D.C.S., O'Reilly L.A., Strasser A. et Cory S.** 1997. The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J.*, 16 (15) : 4628-4638.

**Jacobson M.D., Burne J.F., Raff M.C.** 1994. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.*, 13 (8) : 1899-1910.

**James H.A., et Gibson I.** 1997. The therapeutic potential of ribozymes. *Blood*, 91 : 371-382.

**Jansen B., Schlagbauer-Wadl H., Brown B.D., Bryan R.N., Van Elsas A., Müller M., Wolff K., Eichler H-G. et Pehamberger H.** 1998. Bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat. Med.*, 4 (2) : 232-234.

**Johnstone R.W., Ruefli A.A. et Lowe S.W.** 2002. Apoptosis : a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108 (2) : 153-164.

**Jordan P. et Carmo-Fonseca M.** 2000. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57 (8-9) : 1229-1235.

**Kartalou M. et Essigmann J.M.** 2001. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.*, 478 (1-2) : 23-43.

**Kolata G.** 1987. Oncogenes give breast cancer prognosis. *Science*, 235 : 160-161.

**Korsmeyer S.J., Wei M.C., Saito M., Weiler S. Oh K.J. et Schlesinger P.H.** 2000. Pro-apoptotic cascade activates Bid, which oligomerizes Bak or Bax into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.*, 7 (12) : 1166-1173.

**Lanni J.S., Lowe S.W., Licitra E.J., Liu J.O. et Jacks T.** 1997. p53-independent apoptosis induced by paclitaxel through an indirect mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (18) : 9679-9683.

**Lebedeva I., Rando R., Ojwang J., Cossum P. et Stein C.A.** 2000. Bcl-X<sub>L</sub> in prostate cancer cells : effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Res.*, 60 : 6052-6060.

**Liu J.R., Fletcher B., Page C., Hu C., Nunez G. et Baker V.** 1998. Bcl-X<sub>L</sub> is expressed in ovarian carcinoma and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Gynecol. Oncol.*, 70 : 398-403.

**Marasco W.A.** 1997. Intrabodies : turning the humoral immune system outside in for intracellular immunization. *Gene Ther.*, 4 (1) : 11-15.

**Marasco W.A., Haseltine W.A. et Chen S-Y.** 1993. Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 7889-7893.

**Marone M., Scambia G., Mozzetti S., Ferrandina G., Iacovella S., De Pasqua A., Benedetti-Panici P. et Mancuso S.** 1998. Bcl-2, Bax, Bcl-X<sub>L</sub>, and Bcl-X<sub>s</sub> expression in normal and neoplastic ovarian tissues. *Clin. Cancer Res.*, 4 (2) : 517-524.

**Martinou J-C. et Green D.R.** 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2 (1) : 63-67.



**Meijerink J.P.P., Mensink E., Wang K., Sedlak T.W., Slöetjes A.W., de Witte T., Waksman G. et Korsmeyer S.J.** 1998. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of Bax. *Blood*, 91 (8) : 2991-2997.

**Mhashilkar A.M., Bagley J., Chen S.Y., Szilvay A.M., Helland D.G., Marasco W.A.** 1995. Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *EMBO J.*, 14 (7) : 1542-1551.

**Núñez G., Benedict M.A., Hu Y. et Inohara N.** 1998. Caspases : the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17 (25) : 3237-3245.

**O'Reilly L., Huang D.C.S. and Strasser A.** 1996. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J.*, 15 : 6979-6990.

**Page C., Lin H.J., Jin Y., Castle V.P., Nunez G., Huang M., and Lin J.** 2000. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res.*, 20 : 407-446.

**Perego P., Giarola M., Righetti S.C., Supino R., Caserini C., Delia D., Pierotti M.A., Miyashita T., Reed J.C., Zunino F.** 1996. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res.*, 56 (3) : 556-562.

**Piché A., Grim J., Rancourt C., Gómez-Navarro J., Reed J.C. et Curiel D.T.** 1998a. Modulation of Bcl-2 protein levels by an intracellular anti-Bcl-2 single-chain antibody increases drug-induced cytotoxicity in the breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res.*, 58 (10) : 2134-2140.

**Piché A., Kasono K., Johanning F., Curiel T.J. et Curiel D.T.** 1998b. Phenotypic knock-out of the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus by an intracellular single-chain antibody. *Gene Ther.*, 5 (9) : 1171-1179.

**Piché A. et Rancourt C.** 2001. Gene therapy to overcome drug resistance in cancer : targeting key regulators of the apoptotic pathways. *Curr. Gene Ther.*, 1 (4) : 317-324.

**Piché A., Rancourt C., Xiang J., Siegal G.P. Alvarez R.D., Reed J.C. et Curiel D.T.** 1998c. Modulation of drug-induced apoptosis by an anti-Bcl-2 single-chain antibody in ovarian cancer cells. *Tumor Targeting*, 3 : 147-155.

**Pumphrey C.Y. et Marasco W.A.** 1998. The therapeutic potential of intracellular antibodies. *BioDrugs*, 9 (3) : 179-185.

**Pusztai L., Siddik Z.H., Mills G.B., Bast R.C. Jr.** 1998. Physiologic and pathologic drug resistance in ovarian carcinoma - a hypothesis based on a clonal progression model. *Acta Oncol.*, 37 (7-8) : 629-640.

**Raff M.C., Barres B.A., Burne J.F., Coles H.S., Ishizaki Y., Jacobson M.D.** 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, 262 (5134) : 695-700.

**Rancourt C., Rogers B.E., Sosnowski B.A., Wang M., Piché A., Pierce G.F., Alvarez R.D., Siegal G.P., Douglas J.T., and Curiel D.T.** 1998. Basic fibroblast growth factor enhancement of adenovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene results in augmented therapeutic benefit in a murine model of ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, 4 : 2455-2461.

**Reed J.C.** 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.*, 12 : 1-6.

**Reed J.C.** 1995a. Bcl-2 : Prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 9 (2) : 451-473

**Reed J.C.** 1995b. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr. Opin. Oncol.*, 7 (6) : 541-546.

**Reed J.C.** 1999. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.*, 17 (9) : 2941-2953.

**Reles A., Wen W.H., Schmider A., Gee C., Runnebaum I.B., Kilian U., Jones L.A., El-Naggar A., Minguillon C., Schönborn I., Reich O., Kreienberg R., Lichtenegger W. et Press M.F.** 2001. Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, (10) : 2984-2997.

**Rudner J., Lepple-Wienhues A., Budach W., Berschauer J., Friedrich B., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K. et Belka C.** 2001. Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. *J. Cell Sci.*, 114 : 4161-4172.

**Ryan P.D., and Chabner B.A.** 2000. On receptor inhibitors and chemotherapy. *Clin. Cancer Rec.*, 6 : 4607-4609.

**Schlagbauer-Wadl H., Klosner G., Heere-Ress E., Waltering S., Moll I., Wolff K., Pehamberger H. et Jansen B.** 2000. Bcl-2 antisense oligonucleotide (G3139) inhibit merkel cell carcinoma in SCID mice. *J. Invest. Dermatol.*, 114 (4) : 725-730.

**Shah M.A. et Schwartz G.K.** 2001. Cell cycle-mediated drug resistance : an emerging concept in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 7 (8) : 2168-2181.

**Sood A.K. et Buller R.E.** 1998. Drug resistance in ovarian cancer : from the laboratory to the clinic. *Obstet. Gynecol.*, 92 : 312-319.

**Strasser A., O'Connor L. et Dixit V.M.** 2000. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, 69 : 217-245.

**Strobel T., Kraeft S.K., Chen L.B. et Cannistra S.A.** 1998a. Bax expression is associated with enhanced intracellular accumulation of paclitaxel : a novel role for Bax during chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res.*, 58 (21) : 4776-4781.

**Strobel T., Swanson L., Korsmeyer S. et Cannistra S.A.** 1996. Bax enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 14094-14099.

**Strobel T., Tai Y-T., Korsmeyer S. et Cannistra S.A.** 1998b. Bad partly reverses paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Oncogene*, 17 (19) : 2419-2427.

**Sun X-M., MacFarlane M., Zhuang J., Wolf B.B., Green D.R. et Cohen G.M.** 1999. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 274 (8) : 5053-5060.

**Teillaud J.L.** 1999. Un cheval de troie thérapeutique : les anticorps intracellulaires. *Pathol. Biol.*, 47 (8) : 771-775.

**Thornberry N.A. et Lazebnik Y.** 1998. Caspases : enemies within. *Science*, 281 (5381) : 1312-1316.

**Tilly J.L. et Johnson A.L.** 1999. Chemotherapy and apoptosis in the ovary. Dans : *Apoptosis and chemotherapy*. Humana Press Inc., 257-273.

**Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., and Croce C.** 1985. Involvement of the Bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228 : 1440-1443.

**Tudor G., Aguilera A., Halverson D.O., Laing N.D. et Sausville E.A.** 2000. Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> protein levels. *Cell Death Differ.*, 7 (6) : 574-585.

**Uhlman D.L., Nguyen P., Manivel J.C., Zhang G., Hagan K., Farley E., Aeppli D., and Niechans G.** 1995. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor  $\alpha$  expression in papillary and non papillary renal cell carcinoma : correlation with metastatic behavior and progress. *Clin. Cancer Res.*, 1 : 913-920.

**Velculescu V.E. et El-Deiry W.S.** 1996. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin. Chem.*, 42 : 858-868.

**Vilenchik M., Raffo A.J., Benimetskaya L., Shames D., Stein C.A.** 2002. Antisense RNA down-regulation of Bcl-X<sub>L</sub> expression in prostate cancer cells leads to diminished rates of cellular proliferation and resistance to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Cancer Res.*, 62 (7) : 2175-2183.

**Wang G.Q., Gastman B.R., Wieckowski E., Golstein L.A., Gambotto A., Kim T.H., Fang B., Rabinovitz A., Yin X.M. and Rabinowich H.** 2001. A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer drugs. *J. Biol. Chem.*, 276 : 34307-34317.

**Wang X.W. and Harris C.C.** 1997. p53 tumor-suppressor gene : clues to molecular carcinogenesis. *J. Cell. Physiol.*, 173(2) : 247-55.

**Watsuji T., Okamoto Y., Emi N., Katsuoka Y. et Hagiwara M.** 1997. Controlled gene expression with a reverse tetracycline-regulated retroviral vector (RTRV) system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234 (3) : 769-773.

**Wolf B.B., Schuler M., Li W., Eggers-Sedlet B., Lee W., Tailor P., Fitzgerald P., Mills G.B. et Green D.R.** 2001. Defective cytochrome c-dependent caspase activation in ovarian cancer cell line due to diminished or absent apoptotic protease activating factor-1 activity. *J. Biol. Chem.*, 276 (36) : 34244-34251.

**Yang E. and Korsmeyer S.J.** 1996. Molecular thanatopsis : a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*, 88 : 386-401.

**Zangemeister-Wittke U., Leech S.H., Olie R.A., Simões-Wüst A.P., Gautschi O., Luedke G.H., Natt F., Häner R., Martin P., Hall J., Nalin C.M. et Stahel R.A.** 2000. A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin. Cancer Res.*, 6 (6) : 2547-2555.

**Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. et Korsmeyer S.J.** 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-X<sub>L</sub>. *Cell*, 87 : 619-628.

**Zimmermann K.C., Bonzon C. et Green D.R.** 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.*, 92 (1) : 57-70.

**Zörnig M., Hueber A-O., Baum W. et Evan G.** 2001. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1551 (2) : F1-F37.

**Zhou H., Li X.M., Meinkoth J., and Pittman R.N.** 2000. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J. Cell Biol.*, 151 : 483-494.