

Université de Sherbrooke

**Fonctions de la protéine Bcl-X_L dans les cancers ovariens et dans la
résistance à différents stimuli apoptotiques**

par
Philippe Bernier-Dodier
Département de Microbiologie et Infectiologie

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

Septembre 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-17275-9
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-17275-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	II
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VIII
Liste des abréviations	IX
Résumé	
Introduction	1
1. Le cancer ovarien	1
2. Mécanismes d'actions des composés-platinés et du taxol	4
3. L'apoptose	8
4. Les caspases	14
5. La famille des homologues Bcl-2	19
6. L'anoïkose	22
7. La protéine Bcl-X _L	27
8. L'interférence à l'ARN	30
9. But	33
Matériels et méthodes	34
10. Culture cellulaire et réactifs	34
11. Culture cellulaire en suspension pour les essais d'anoïkose	35
12. Analyse protéique par immunobuvardage de type Western	36
13. Analyse par RT-PCR du niveau des ARNm encodant Bcl-X _L et Bcl-X _S	37

14. Analyse de l'expression et la localisation de Bcl-X _L par immunofluorescence indirecte sur lame	37
15. Production et transfection des siRNA	38
16. Production des clones stables	41
17. Coloration des cellules vivantes au cristal violet	42
18. Essai de prolifération et de survie par XTT	43
19. Mesure de l'apoptose	44
20. Analyse statistique	47
Résultats	48
21. Expression de Bcl-X _L dans les cellules OSE et les cellules de cancer ovarien	48
22. Sélection du siRNA	50
23. Validation du siRNA #4 dans les différentes lignées de cancer ovarien	53
24. Validation de la surexpression de Bcl-X _L	58
25. Effet de la perte de Bcl-X _L sur la prolifération	62
26. Effet de la perte de Bcl-X _L sur la survie en condition adhérente	63
27. Effet de la perte de Bcl-X _L sur la cascade apoptotique en condition adhérente	64
28. Effet de la surexpression de Bcl-X _L sur la prolifération	72
29. Effet de la perte de Bcl-X _L sur la sensibilité à l'anoïkose	72
30. Effet de la perte de Bcl-X _L sur la chimiosensibilité	76
31. Effet de la surexpression de Bcl-X _L sur la chimiosensibilité	77
Discussion	86
Conclusion	94

Remerciement	96
Bibliographie	97

LISTE DES FIGURES

1. Induction de l'apoptose par le cisplatine	5
2. Induction de l'apoptose par le taxol	6
3. Voie intrinsèque de l'apoptose	12
4. Voie extrinsèque de l'apoptose	13
5. Famille des homologues Bcl-2	22
6. Survie des cellules en condition adhérente	25
7. Induction de l'anoïkose	26
8. Étapes de l'ARNi	32
9. Expression de la protéine Bcl-X _L dans des cellules humaines d'ovaires	49
10. Cibles des différents siRNA Bcl-X _L	51
11. Validation de l'efficacité des siRNA Bcl-X _L par immunobuvardage de type Western	52
12. Validation de l'efficacité des siRNA Bcl-X _L au niveau des ARNm par RT-PCR	53
13. Effet du siRNA Bcl-X _L #4 sur l'expression de Bcl-X _L dans différentes lignées de cancer ovarien	55
14. Effet du siRNA Bcl-X _L #4 sur l'expression de Bcl-X _L dans les cellules CaOV-3 observé par immunofluorescence	56
15. Effet du siRNA Bcl-X _L #4 sur l'expression de Bcl-X _L dans les cellules SKOV3ip1 observé par immunofluorescence	57
16. Vecteur pcDNA3 / Bcl-X _L #4 utilisé pour la surexpression de Bcl-X _L	59

17. Surexpression de Bcl-X _L dans les lignées OVCAR-3 et COV-2	60
18. Surexpression et localisation de Bcl-X _L dans la lignée OVCAR-3 observées par immunofluorescence	61
19. Effet de la perte de Bcl-X _L sur la prolifération des cellules CaOV-3	66
20. Effet de la perte de Bcl-X _L sur la prolifération des cellules SKOV3ip1	67
21. Effet de la perte de Bcl-X _L sur la prolifération des cellules OVCAR-3	68
22. Induction de l'apoptose en condition normale de culture causée par la perte de Bcl-X _L	69
23. Induction de l'apoptose en fonction du temps en condition normale de culture causée par la perte de Bcl-X _L chez les cellules CaOV-3	70
24. Induction de la cascade apoptotique causée par la perte de Bcl-X _L dans les lignées SKOV3ip1 et CaOV-3	71
25. Effet de la surexpression de Bcl-X _L sur la prolifération des cellules OVCAR-3	73
26. Potentialisation de l'induction de l'anoïkose chez les cellules SKOV3ip1 causée par la perte de Bcl-X _L	74
27. Absence de sensibilisation à l'anoïkose chez les cellules OVCAR-3 causée par la perte de Bcl-X _L	75
28. Sensibilisation au cisplatine et au taxol mesurée par XTT des cellules CaOV-3 causée par la perte Bcl-X _L	79
29. Sensibilisation au cisplatine et au taxol mesurée par XTT des cellules SKOV3ip1 causée par la perte Bcl-X _L	80
30. Sensibilisation au cisplatine et au taxol mesurée par ELISA des cellules SKOV3ip1 causée par la perte Bcl-X _L	81

31. Sensibilisation au cisplatine et au taxol mesurée par XTT des cellules OVCAR-3 causée par la perte Bcl-X _L	82
32. Sensibilisation au cisplatine et au taxol mesurée par ELISA des cellules OVCAR-3 causée par la perte Bcl-X _L	83
33. Effet de la surexpression de Bcl-X _L sur la sensibilité mesurée par XTT au cisplatine et au taxol des cellules OVCAR-3	84
34. Effet de la surexpression de Bcl-X _L sur la sensibilité au cisplatine et au taxol des cellules OVCAR-3 mesurée par un essai d'iodure de propidium en cytométrie de flux	85

LISTE DES TABLEAUX

1. Liste partielle de substrats des caspases	17
2. Description des différentes cellules humaines d'ovaires analysées	48
3. Positions des séquences de l'ARNm de Bcl-X _L ciblées par les différents siRNA Bcl-X _L	51

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AEBSF	4-(2-aminoéthyl) benzènesulfonyl fluoride hydrochloride
AIF	apoptosis inducing factor
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messagé
BH	<i>Bcl-2 homology domain</i>
BSA	<i>bovin serum albumin</i>
Cyt c	cytochrome c
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	<i>dubelcco's modified eagle's medium</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FSH	<i>follicule-stimulating hormone</i>
GAPDH	glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
HRP	<i>horseradish peroxydase</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis proteins</i>
kDa	kilodalton
LH	<i>luteinizing hormone</i>
M	molaire

OSE	<i>ovarian surface epithelium</i>
PARP	poly (ADP-ribose) polymérase
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	phosphatidyl-inositol 3-kinase
PMS	phénazine méthosulfate
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RPMI	<i>roswell park memorial institute medium</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
TM	domaine d'ancrage aux membranes
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	récepteur au TNF
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>

RÉSUMÉ

Le cancer ovarien est le cancer gynécologique le plus mortel. Ce type de cancer est habituellement dérivé de la surface épithéliale des ovaires et est très difficile à diagnostiquer. Par conséquent, la maladie est bien souvent à un stade avancé lors de son diagnostic. Généralement, malgré une réponse initiale aux traitements actuels, le développement de résistances amène des rechutes et la mort des patientes.

Les protéines de la famille des homologues Bcl-2 sont d'importants régulateurs de l'apoptose. Bcl-X_L, un homologue anti-apoptotique, est surexprimé dans la plupart des cancers ovariens ce qui suggère que cette protéine pourrait être importante pour la survie de ces cellules cancéreuses. Cependant, différentes études ont obtenus des résultats contradictoires sur l'importance de Bcl-X_L dans la résistance à l'apoptose des cellules de cancers ovariens.

Notre étude a pour but de déterminer l'importance de Bcl-X_L pour la survie des cellules de cancers ovariens. L'importance de cette protéine sur la survie des cellules de cancer ovarien est évaluées dans des conditions adhérentes et non-adhérentes ainsi qu'en réponse aux principaux agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement de ce type cancer, soit le taxol et un composé-platiné, le cisplatine.

D'abord, nous avons reconfirmé que la protéine Bcl-X_L est surexprimée dans les cellules de cancer ovarien comparativement aux cellules épithéliales ovariennes normales. Ensuite, pour évaluer le rôle de Bcl-X_L dans les cancers ovariens, nous avons

modulé son expression dans différentes lignées via l'utilisation de siRNA, pour diminuer son expression, et d'un vecteur d'expression, pour la surexprimer. L'efficacité du siRNA a été validée dans les lignées OVCAR-3, SKOV3ip1 et CaOV-3 tandis que des clones surexprimant la protéine ont été produits dans les lignées OVCAR-3 et COV-2. Cependant, nous avons utilisé seulement les cellules OVCAR-3 pour les études des fonctions de Bcl-X_L par sa surexpression.

L'inhibition de l'expression de Bcl-X_L par le siRNA induit de l'apoptose dans les trois lignées utilisées. De plus, nous avons évalué l'effet de cette perte d'expression sur la sensibilité à l'anoïkose des lignées OVCAR-3 et SKOV3ip1. Les cellules OVCAR-3, qui sont totalement insensibles à l'anoïkose, ne sont pas sensibilisées à cette forme d'apoptose par la perte de Bcl-X_L contrairement aux cellules SKOV3ip1, qui sont sensibles à l'anoïkose et qui sont sensibilisées davantage par cette perte d'expression. D'autre part, nous avons observé que la surexpression de la protéine Bcl-X_L inhibe la prolifération des cellules OVCAR-3, sûrement par une inhibition du cycle cellulaire. Cette aspect devra être étudié davantage pour évaluer l'impact de Bcl-X_L sur le cycle cellulaire. Finalement, nous avons démontré que Bcl-X_L module la résistance au cisplatine et au taxol dans les lignées utilisées.

Cette étude démontre que la protéine Bcl-X_L est importante pour la survie des cellules de cancer ovarien.

Mots clés : Bcl-X_L, cancer ovarien, apoptose, anoïkose, siRNA

INTRODUCTION

1. Le cancer ovarien

Le cancer ovarien est le cancer gynécologique le plus létal (MOSS et KAYE, 2002; OZOLS *et al.*, 2004) et touche, dans les pays développés, environ 1 femme sur 75 (BAIRD et KAYE, 2003; MOSS et KAYE, 2002). Environ 90% des cancers ovariens proviennent des cellules de la surface épithéliale de l'ovaire (NESS et COTTREAU, 1999) et conséquemment, dans cet ouvrage, il sera question principalement des cancers ovariens dérivés de la surface épithéliale. Le développement de cette maladie n'est pas associé à des signes et symptômes spécifiques ce qui rend difficile sa détection à des stades précoces (BENEDET, 2000; OZOLS *et al.*, 2004). Ainsi, ce cancer est généralement diagnostiqué à des stades avancés (BENEDET, 2000; MOSS et KAYE, 2002; OZOLS *et al.*, 2004) ce qui signifie généralement que des tumeurs sont alors disséminées dans la cavité péritonéale (MOSS et KAYE, 2002; OZOLS *et al.*, 2004). D'ailleurs, dans plus de 75% des cas de cancers ovariens, des métastases sont présentes dans la cavité péritonéale lors du diagnostic (MOSS et KAYE, 2002). Les métastases sont engendrées par des cellules se libérant de la tumeur primaire et qui se retrouvent alors dans la cavité péritonéale où elles peuvent adhérer sur les différents organes présents dans la cavité et former des tumeurs secondaires (OZOLS, 2003). Le risque d'être atteint par cette maladie augmente avec l'âge (BENEDET, 2000; OZOLS *et al.*, 2004) et ce risque est plus grand chez les femmes ayant eu leur ménopause ou leur premier enfant tardivement (BENEDET, 2000).

Principalement deux théories ont été proposées pour expliquer le développement des cancers ovariens, soit l'ovulation incessante (FATHALLA, 1971) et l'hypothèse des gonadotropines (CRAMER et WELCH, 1983). Selon la théorie de l'ovulation incessante, le bris répété de la surface épithéliale de l'ovaire, lors de l'ovulation, et la prolifération cellulaire post-ovulatoire amèneraient l'accumulation de mutations dans les cellules épithéliales et, ainsi, la formation de tumeurs (FATHALLA, 1971). Plus récemment, il a été suggéré que l'ovulation favoriserait la formation et l'inclusion de kystes à partir de la surface épithéliale qui constitueraient un environnement très favorable au développement du cancer (FEELEY et WELLS, 2001). L'utilisation de contraceptifs oraux, qui inhibent l'ovulation, diminue le risque d'être atteint de cette maladie, ce qui supporte la théorie de l'ovulation incessante (BENEDET, 2000; OZOLS *et al.*, 2004). Selon l'hypothèse des gonadotropines, l'élévation des niveaux des gonadotropines (LH et FSH) lors de l'induction de l'ovulation et dans les années suivant la ménopause favoriserait la transformation des cellules de la surface épithéliale de l'ovaire (CRAMER et WELCH, 1983; OZOLS *et al.*, 2004). D'autre part, il a été suggéré que l'inflammation pourrait être un facteur important dans le développement des cancers ovariens (NESS et COTTREAU, 1999) étant donné que l'inflammation semble contribuer au développement des cancers et que l'ovulation et les gonadotropines l'induisent (NESS et COTTREAU, 1999; OZOLS *et al.*, 2004). Les différentes théories ne sont pas exclusives et possiblement d'autres facteurs contribuent au développement des cancers ovariens.

En général, le traitement des cancers ovariens est débuté par la chirurgie, pour enlever le plus de tumeurs possible, et suivi par la chimiothérapie (BENEDET, 2000;

MOSS et KAYE, 2002; OZOLS, 2003; OZOLS *et al.*, 2004; STUART, 2003). La chimiothérapie standard de première ligne est une combinaison composé-platiné/taxane (MOSS et KAYE, 2002; OZOLS, 2003; OZOLS *et al.*, 2004; STUART, 2003). En deuxième ligne, les agents utilisés sont variables et il n'y a pas de procédures standards (MOSS et KAYE, 2002). Les composés-platinés les plus utilisés sont le cisplatine et le carboplatine mais, récemment, l'utilisation du carboplatine est favorisée étant donné qu'il est mieux toléré par les patientes (MOSS et KAYE, 2002; OZOLS, 2003). Le taxol est la taxane généralement utilisée mais le docétaxel pourrait bien le remplacer étant donné qu'il est moins neurotoxique que le taxol et d'une efficacité similaire (MOSS et KAYE, 2002; STUART, 2003). La réponse initiale à la thérapie est bonne (environ 80%) mais, dans la plupart des cas, cette réponse est transitoire (MOSS et KAYE, 2002; OZOLS *et al.*, 2004; STUART, 2003) étant donné que la maladie réapparaît généralement 18 à 28 mois post-traitement (STUART, 2003). De plus, suite à la rechute, la réponse à la chimiothérapie de la majorité des patients est fortement diminuée (BENEDET, 2000) étant donné que le cancer devient résistant aux différents agents chimiothérapeutiques utilisés (MOSS et KAYE, 2002; OZOLS *et al.*, 2004). La survie à moyen et long termes est très faible, soit de seulement 30 à 50% à 5 ans (MOSS et KAYE, 2002; OZOLS *et al.*, 2004) et de 25 à 30 % à 10 ans (OZOLS, 2003). Une détection au stade précoce de la maladie, le développement de nouveaux agents anti-cancéreux plus efficaces, l'optimisation de l'utilisation des agents actuels ainsi que des traitements spécifiques aux anomalies présentes dans les tumeurs du patient permettraient d'augmenter les chances de survie des patients atteints de cancer ovarien (MOSS et KAYE, 2002; OZOLS *et al.*, 2004). Il est donc important d'approfondir nos connaissances sur la biologie des cancers

ovariens et sur les mécanismes qui régulent la mort cellulaire induite par les agents de chimiothérapie.

2. Mécanismes d'actions des composés-platinés et du taxol

Comme il a été mentionné, les composés-platinés et le taxol sont les principaux agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement des cancers ovariens. Les composés-platinés sont des molécules qui s'intercalent dans l'ADN et l'endommagent (BAIRD et KAYE, 2003; CRUL *et al.*, 2002; SIDDIK, 2003; WU *et al.*, 2005). En réponse à ces dommages, il y a soit réparation, tolérance ou induction de l'apoptose (BAIRD et KAYE, 2003). Le taxol et les autres taxanes sont des molécules qui lient les microtubules et empêchent leur dépolymérisation donc leur fonctionnement normal (AHN *et al.*, 2004; ORR *et al.*, 2003; SORGER *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2000). Les microtubules sont essentiels lors de la division cellulaire pour la ségrégation des chromosomes (SORGER *et al.*, 1997) alors l'inhibition de leur dépolymérisation amène, chez les cellules prolifératives, l'arrêt en phase M du cycle cellulaire, plus spécifiquement en métaphase, et, par la suite, l'induction de l'apoptose (AHN *et al.*, 2004; SORGER *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2000). Les mécanismes d'induction de l'apoptose par les composés-platinés et par les taxanes sont plus ou moins bien connus mais il semblerait qu'ils soient très variables selon la nature des cellules, par exemple, au niveau de leur statut de p53 (WU *et al.*, 2005), et dans le cas des taxanes, selon les doses utilisées (WANG *et al.*, 2000). La figure 1 présente le mécanisme d'induction de l'apoptose par le

cisplatine dans les petites cellules de carcinomes de poumon LX-1. En figure 2, les réponses à différentes concentrations de taxol sont présentées.

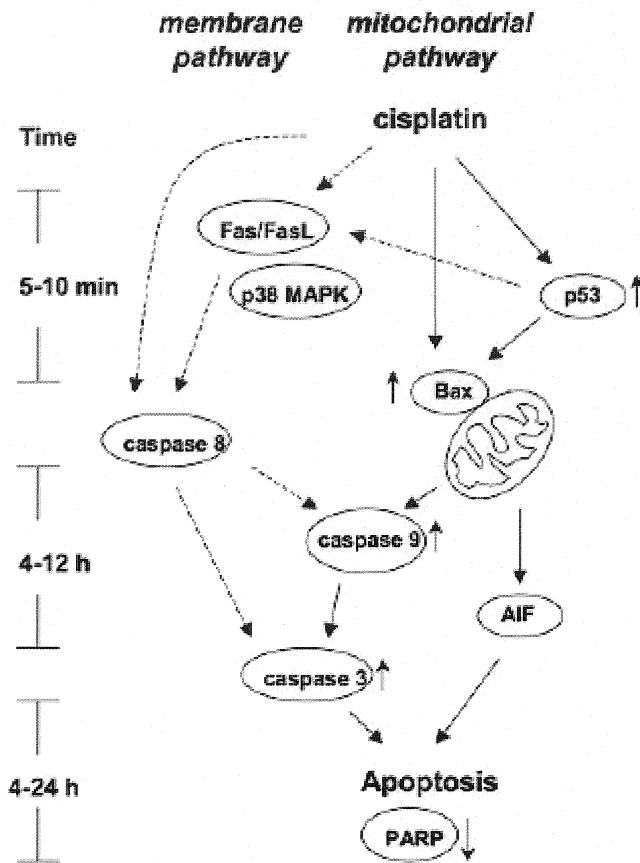
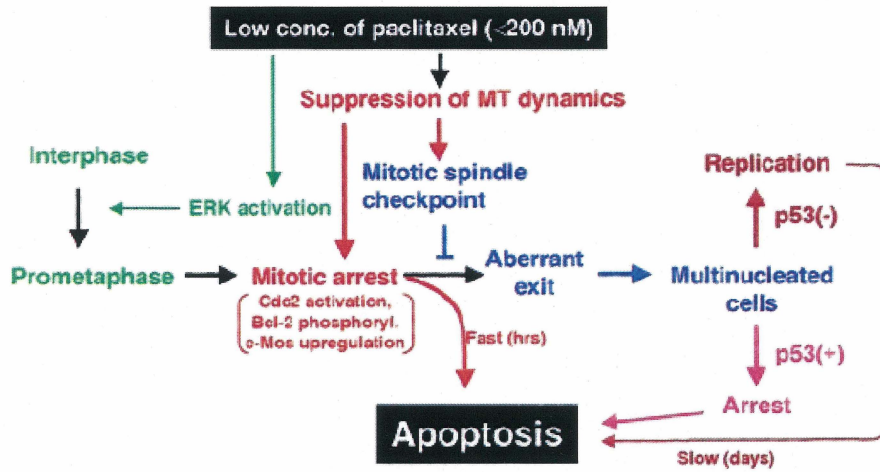


Figure 1. Induction de l'apoptose par le cisplatine

Mécanisme d'induction de l'apoptose par le cisplatine dans les petites cellules de carcinomes de poumon LX-1. Figure tirée de WU *et al.* (2005).

A



B

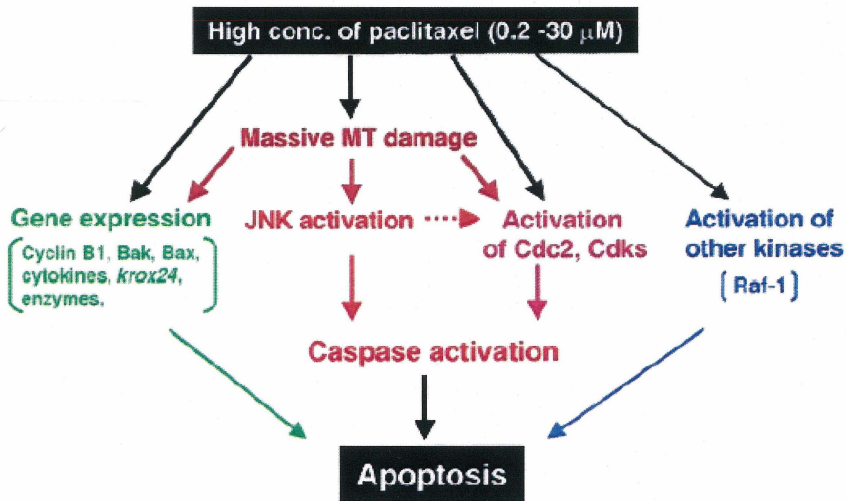


Figure 2. Induction de l'apoptose par le taxol

Mécanismes d'induction de l'apoptose par des faibles concentrations (A) et des fortes concentrations (B) de taxol. Figure tirée de WANG *et al.* (2000).

Plusieurs facteurs peuvent causer la résistance à la chimiothérapie. D'abord, les cellules cancéreuses doivent être exposées à une dose suffisante pour induire l'apoptose sinon la thérapie est inefficace (BAIRD et KAYE, 2003). D'autre part, les cellules cancéreuses peuvent posséder certaines altérations qui les rendent insensibles à la thérapie. Cette résistance peut être spécifique à un agent chimiothérapeutique ou généralisée à l'ensemble des drogues, selon l'altération causant la résistance (BAIRD et KAYE, 2003; ORR *et al.*, 2003; SIDDIK, 2003). Dans le cas d'une résistance à un seul agent, l'altération est généralement spécifique au mode d'action de la drogue. Par exemple, une mutation de la β -tubuline au niveau du site de liaison du taxol peut inhiber leur interaction et ainsi empêcher l'action de la drogue (ORR *et al.*, 2003). Certaines altérations peuvent engendrer une résistance à l'ensemble des agents chimiothérapeutiques. La diminution de la prise des drogues par la cellule, l'augmentation de l'efflux des drogues, la perte de l'expression ou de l'activité de protéines pro-apoptotiques et l'augmentation de l'expression ou de l'activité de protéines pro-survie sont les principales altérations pouvant engendrer ce type de résistance (BAIRD et KAYE, 2003; SIDDIK, 2003). Dans le cas des cancers ovariens à des stades avancés, les cellules arrivent à survivre en suspension ainsi qu'en présence de différents agents chimiothérapeutiques malgré des mécanismes bien différents d'induction d'apoptose, ce qui suggère que la cascade apoptotique de ces cellules pourrait être dérégulée. Étant donné que les cellules cancéreuses ont une très grande instabilité génomique et subissent de nombreuses mutations, il est possible que la résistance à la chimiothérapie soit due à plusieurs altérations plutôt qu'à une seule (BAIRD et KAYE, 2003).

3. L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus énergie-dépendant hautement régulé qu'on retrouve chez la plupart des organismes multicellulaires (REGULA et al., 2003; YASUHARA et al., 2003). Ce processus est essentiel au développement et à l'homéostasie de ces organismes. Par exemple, dans le développement du système immunitaire, les lymphocytes T reconnaissant les constituants du soi sont éliminés par apoptose (CHAO et KORSMEYER, 1997). D'un autre côté, un mauvais contrôle de la régulation de l'apoptose peut contribuer au développement de certaines pathologies comme le cancer et le Parkinson (THOMPSON, 1995). Dans le cas des cancers, les cellules transformées devraient être éliminées par apoptose mais elles arrivent à échapper à l'induction de l'apoptose et peuvent ainsi causer un cancer. Dans le cas du Parkinson, des cellules neuronales saines sont éliminées par apoptose ce qui cause la maladie. Une cellule apoptotique possède plusieurs caractéristiques particulières qui peuvent varier selon le type de stimuli apoptotique et son intensité. Au niveau protéique, une multitude de protéines sont clivées par des protéases activées spécifiquement lors de l'apoptose. Ensuite, la cellule apoptotique s'arrondie et sa membrane plasmique subit des déformations (appelées «blebbing») et sa perméabilité s'accroît. Au niveau nucléaire, il y a condensation et segmentation du noyau, et clivage de l'ADN par des nucléases (WILLINGHAM, 1999). Ce clivage se fait uniquement au niveau de l'ADN internucléosomal étant donné que l'ADN nucléosomal est entouré par les histones ce qui

la rend inaccessible aux nucléases (BURGOYNE *et al.*, 1974). Finalement, la cellule meurt et devient ce qu'on appelle un corpuscule apoptotique. Dans un contexte *in vivo*, le corpuscule apoptotique peut alors être phagocyté. Contrairement à la mort d'une cellule par nécrose, la mort par apoptose ne cause aucun dommage aux cellules environnantes (CORY et ADAMS, 2002; WILLINGHAM, 1999).

L'apoptose peut être induite par deux grandes voies, soit la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (LANE *et al.*, 2004; ÖZÖREN et EL-DEIRY, 2003; ZHIVOTOVSKY et ORRENIUS, 2003), qui sont présentées schématiquement en figure 3 et 4 respectivement. D'abord, dans le cas de la voie intrinsèque qui est aussi appelée la voie mitochondriale, l'induction de l'apoptose se fait par la relâche de protéines contenues dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Les protéines ainsi relâchées qui sont connues à ce jour sont AIF, l'Endonucléase G, Omi (HtrA2), Diablo (Smac) et, la plus étudiée, le cytochrome c (DONOVAN et COTTER, 2004; REGULA *et al.*, 2003). Dans le cytoplasme, le cytochrome c forme un complexe avec Apaf-1 et la pro-caspase 9. Ce complexe appelé apoptosome permet le clivage de la pro-caspase 9 en sa forme active, la caspase 9. Ensuite, la caspase 9 clive les pro-caspase 3 et 7 pour ainsi générer leur forme active, les caspase 3 et 7 (KAUFMANN et EARNSHAW, 2000; REGULA *et al.*, 2003; ZHIVOTOVSKY et ORRENIUS, 2003). Les caspases, comme nous allons le voir dans la prochaine section, sont des protéases produites sous une forme inactive et activée par leur clivage et qui sont, la plupart du temps, les molécules effectrices de l'apoptose (EARNSHAW *et al.*, 1999). D'autre part, comme nous allons le voir ultérieurement, les protéines de la famille des homologues Bcl-2 effectuent une régulation importante de

l'activation de la voie mitochondriale (CORY et ADAMS, 2002). Outre le cytochrome c, les protéines Omi, Diablo, Endonucléase G et AIF sont aussi relâchés au cytoplasme lors de l'activation de la voie mitochondriale. L'Endonucléase G et AIF transloquent alors au noyau et induisent la dégradation de l'ADN, directement dans le cas de l'Endonucléase G et indirectement dans le cas de AIF (DONOVAN et COTTER, 2004; REGULA *et al.*, 2003) tandis que Omi et DIABLO inhibent les IAP, qui sont des inhibiteurs des caspases (REGULA *et al.*, 2003). En ce qui concerne la voie extrinsèque, l'induction de l'apoptose se fait par l'activation à la surface des cellules de récepteurs de mort cellulaire (ou death receptor). Les récepteurs de mort cellulaire font partie de la superfamille des récepteurs du TNF et les mieux connus sont le DR4 et le DR5, qui ont pour ligand le TRAIL, le Fas (CD95), qui a pour ligand le FasL, et le TNFR1 qui a pour ligand le TNF- α (RUDNER *et al.*, 2005). Cette activation se fait via l'oligomérisation de ces récepteurs en présence de leur ligand ce qui permet le recrutement, au niveau de leur domaine cytoplasmique, de protéines adaptatrices, comme le FADD. Les protéines adaptatrices recrutent la pro-caspase 8 et/ou la pro-caspase 10 et amènent leur clivage en caspases 8 et 10 (BUDD, 2002; CORY *et al.*, 2003; LANE *et al.*, 2004; RUDNER *et al.*, 2005). Tout comme la caspase 9, les caspases 8 et 10 clivent les pro-caspases 3 et 7 ce qui produit les formes actives, les caspases 3 et 7. De plus, les caspases 8 et 10 peuvent cliver le Bid, une protéine pro-apoptotique de la famille des homologues Bcl-2, ce qui génère sa forme active, le t-Bid (truncated Bid); cette activation de Bid, peut amener l'activation de la voie mitochondriale (KAUFMANN et EARNSHAW, 2000; PETROS *et al.*, 2004; RUDNER *et al.*, 2005). L'activation directe des caspases 3 et 7 peut être suffisante pour induire l'apoptose dans certaines cellules tandis que dans d'autres, l'apoptose peut être

dépendante de la participation de la mitochondrie (KAUFMANN et EARNSHAW, 2000; RUDNER *et al.*, 2005). Les événements survenant lors de l'activation d'un récepteur de mort cellulaire sont variables selon l'identité du récepteur et de son ligand (BUDD, 2002).

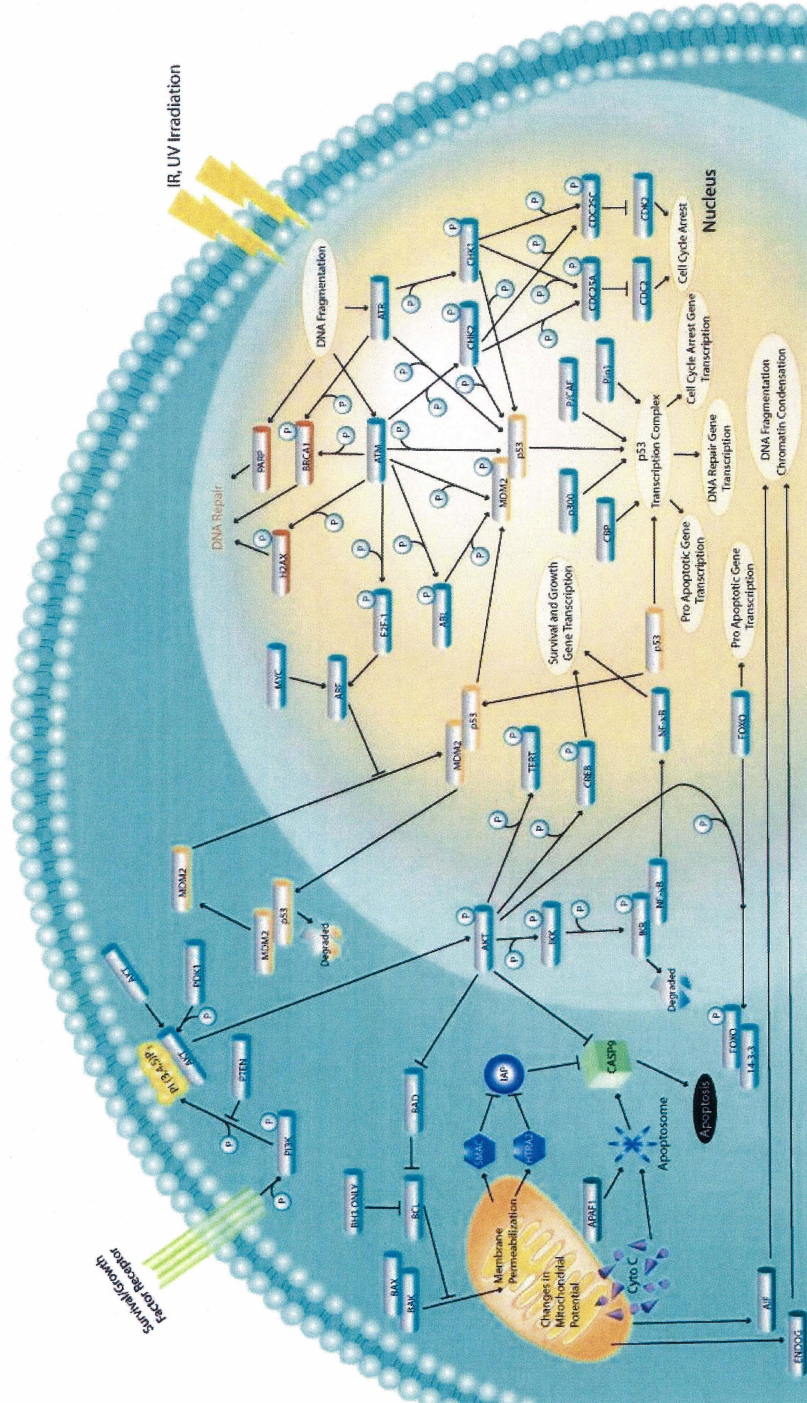


Figure 3. Voie intrinsèque de l'apoptose

Schéma global de la voie intrinsèque d'induction de l'apoptose. Figure tirée de

<http://apoptosis.atcc.org:8080/SignalWeb/signaldb/intrinsic.jsp>

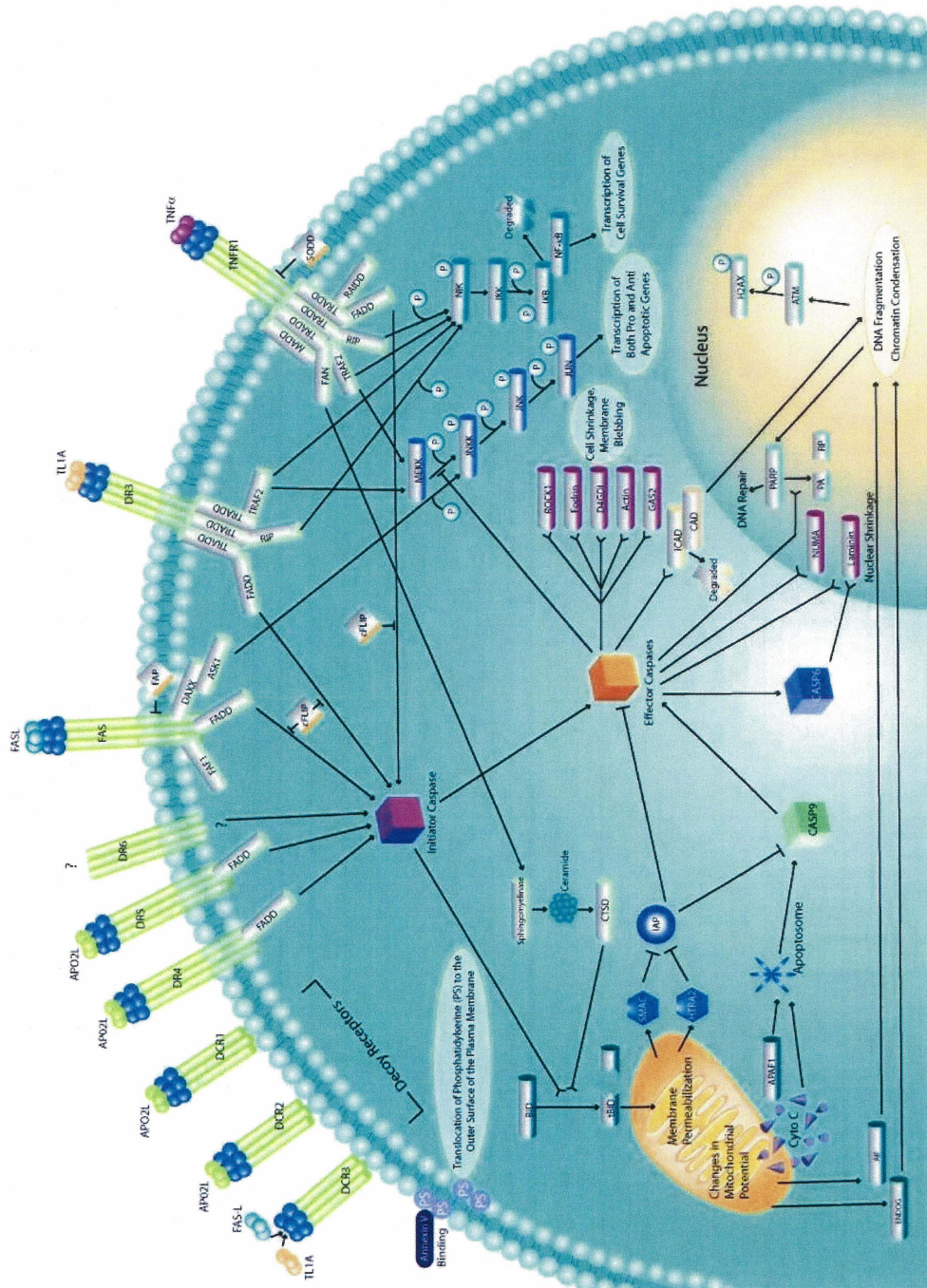


Figure 4. Voie extrinsèque de l'apoptose

Schéma global de l'apoptose induite par les récepteurs de mort cellulaire. Figure tirée de

<http://apoptosis.atcc.org:8080/SignalWeb/signaldb/extrinsic.jsp>

4. Les caspases

Les caspases sont des protéases qui sont produites sous une forme inactive appelée pro-caspase (se sont donc des zymogènes). La forme pro-caspase est composée d'un pro-domaine en N-terminal suivi de la petite sous-unité (β) puis de la grosse sous-unité (α) en C-terminal (EARNSHAW *et al.*, 1999). Comme il a été mentionné précédemment, bien souvent lors de l'induction de l'apoptose, il y a activation des caspases via le clivage des pro-caspases. Ce clivage permet ainsi d'enlever le pro-domaine et de générer les 2 sous-unités qui forment ensuite la caspase active qui est un tétramère composé de deux sous-unités α et deux sous-unités β (EARNSHAW *et al.*, 1999; KAUFMANN et EARNSHAW, 2000). Il existe au moins 12 caspases chez l'humain, dont au moins 6 (les caspases 3, 6, 7, 8, 9 et 10) qui seraient définitivement impliquées dans l'apoptose (KAUFMANN et EARNSHAW, 2000). De plus, au moins 280 substrats des caspases ont été identifiés à ce jour (FISCHER *et al.*, 2003). Certains de ces substrats sont présentés dans le tableau 1. Les substrats des caspases possèdent un site de reconnaissance plus ou moins spécifique à une caspase et la reconnaissance d'un tel site permet l'hydrolyse par la caspase d'un lien peptidique situé du côté carboxyle d'un résidu aspartate présent dans le site (EARNSHAW *et al.*, 1999). Les caspases participant à l'apoptose sont séparées en 2 groupes, soit les caspases initiatrices et les caspases effectrices. Les caspases initiatrices (les caspases 8, 9 et 10) participent principalement à l'initiation de la cascade protéolytique lors de l'induction de l'apoptose tandis que les caspases effectrices (les caspases 3, 6 et 7) participent plutôt au démantèlement de la cellule via le clivage d'une multitude de protéines (KAUFMANN et EARNSHAW,

2000). Les caspases initiatrices ont donc comme substrats des protéines participant à l'induction de l'apoptose comme le Bid, dans le cas des caspases 8 et 10, et les procaspases 3 et 7, dans le cas des caspases 8, 9, et 10. Les substrats des caspases effectrices sont beaucoup plus nombreux et diversifiés. Elles vont cliver, par exemple, des protéines impliquées dans la réparation et la réplication de l'ADN, dans la régulation du cycle cellulaire et la prolifération, dans l'adhésion cellulaire, dans la transcription et dans la régulation de l'apoptose. Le clivage de ces nombreux substrats va causer les différents événements caractérisant l'apoptose et amènent donc le démantèlement et la mort de la cellule (EARNSHAW *et al.*, 1999; FISCHER *et al.*, 2003; KAUFMANN et EARNSHAW, 2000). Parmi les nombreux substrats connus des caspases, le clivage de certains substrats, comme la β -actine, semble spécifique à certains types cellulaires (FISCHER *et al.*, 2003).

Le niveau d'activité des caspases est régulé principalement à deux niveaux, soit au niveau de leur activation par les deux voies d'induction de l'apoptose et au niveau de la régulation de leur activité par des inhibiteurs (EARNSHAW *et al.*, 1999). La régulation des deux voies activant les caspases, principalement par la famille des homologues Bcl-2, va être discutée dans la prochaine section. L'activité des caspases peut être inhibée par certaines protéines et chez les mammifères, cette inhibition se fait par les protéines de la famille des IAP. Au moins 7 IAP ont été identifiées à ce jour; les plus connues étant les cIAP, le XIAP et la survivine (AMBROSINI *et al.*, 1997; DUCKETT *et al.*, 1996; LISTON *et al.*, 2003; ROY *et al.*, 1997; UREN *et al.*, 1996). La plupart des IAP lient et inhibent les formes actives des caspases 3, 7 et 9 (LISTON *et al.*,

2003; REGULA *et al.*, 2003; ROY *et al.*,1997). L'expression de ces protéines est variable selon le type cellulaire; par exemple, la survivine semble être plus exprimée dans les tumeurs que dans les tissus normaux (AMBROSINI *et al.*, 1997). Les IAP permettent donc d'inhiber l'apoptose même lorsqu'il y a activation des voies d'induction de l'apoptose. Cependant, comme il avait été mentionné précédemment, les IAP peuvent être inhibées par les protéines Omi et Diablo (LISTON *et al.*, 2003; REGULA *et al.*, 2003).

Malgré la grande importance des caspases, il peut y avoir, en réponse à certains stimuli apoptotiques, apoptose sans la participation des caspases (DONOVAN et COTTER, 2004). Dans cette apoptose caspase-indépendante, AIF et l'Endonucléase G auraient des rôles importants.

Tableau 1. Liste partielle de substrats des caspases

Polypeptides	Cleavage site	Responsible caspase	Proposed effect of cleavage	Reference
Abundant cytoplasmic proteins				
Gelsolin	DQTD/G	3	Calcium-insensitive actin cleavage	205, 206
Gas-2	SRVD/G	?	Cytoskeleton rearrangement	207
Fodrin (Alpha II-spectrin)	DETD/S DSLSD/S	3	Plasma membrane blebbing	208, 210, 211, 211a, 366
Beta II-spectrin	DEVDIS	3	Unknown	211a
β -Catenin	?	3	$\downarrow\alpha$ -Catenin binding and cell-cell contact	212, 213
Cytokeratin 18	VEVD/A	3, 6, 7	?	216, 217
Abundant nuclear proteins				
Lamin A	VEID/N	6	Nuclear lamina disassembly	12, 44, 220, 223
Lamin B ₁	VEVD/S	6, 7, 3	Nuclear lamina disassembly	10-12, 104, 221-223
NuMA	?	3, 6	Nuclear shape changes	131, 226, 228-231
HnRNP proteins C1 and C2	?	3	\downarrow RNA processing	232
70-kDa protein of U1 snRNP	DGPD/G	3	\downarrow RNA processing	226, 233, 234, 242
mdm2	DVPD/C	3, 6, 7	Unknown, still binds p53	236, 237
Replication Factor C large subunit	DEVVD/G	3	N-terminal fragment inhibits DNA replication	245-246
Topoisomerase I	DDVD/Y	3	Unknown	10, 226, 250, 251
Protein kinases				
PKC δ	DMQD/M	3	Constitutively active kinase	253, 254
PKC τ	DEVVD/K	3	Constitutively active kinase	255
PKC-related kinase 2	DITD/C	3	?Constitutively active kinase	256
PKN	LGTD/S	3	Constitutively active kinase	256a
Calcium/calmodulin dependent protein kinase IV	PAPD/A	3	Unknown function	257
p21-activated kinase 2	SHVD/G	3, 8	Constitutively active kinase	258, 259
PITSLRE kinase α 2-1	YVPD/S	3	Constitutively active kinase	260, 261
Mst1 kinase	DEMD/S	?	Constitutively active kinase	263, 264
Mst2 kinase	DELD/S	?	Constitutively active kinase	264
Focal adhesion kinase	DQTD/S VSWD/S	3, 7 6	Loss of paxillin binding, ? trans- location nucleus, \downarrow activity	265-267
MEKK-1	DTVD/G	3	\downarrow Binding to 14-3-3, Δ subcellular distribution, constitutive activation	268, 269, 370
Wee1 kinase	?	3, 7, 8	Probably inactivation, leading to Cdk activation	272

Tableau tiré de EARNSHAW *et al.* (1999).

Tableau 1. Liste partielle de substrats des caspases (*suite*)

Polypeptide	Cleavage site	Responsible Caspase	Proposed effect of cleavage	Reference
Pro-interleukin-18	LESD/N	1	Induces synthesis of interferon γ	275-278
Ras GTPase-activating protein	DTVD/G	3	Inactivation of survival signaling from extracellular receptors	271, 271a
D4-GDP dissociation inhibitor	DELD/S	3	No demonstrated effect	279
Protein phosphatase 2A subunit A α	DEQD/S	3	↑Activity toward non-cdk substrates	280
Cytosolic phospholipase A ₂	DELD/A	3	Activation	281-282a
Stat 1	MELD/G	3	↓Transcription after interferon α or γ	283
NF κ Bp50, p65	?	3	↓NF κ B-dependent transcription	284
I κ B	DRHD/S	3	?Generates constitutive inhibitor of NF κ B	285
Steroid response element-binding proteins	DEPD/S SEPD/S	3, 7	Nonphysiological cleavage	286, 358, 371
DCC	LSVD/R	3	Product facilitates ligand withdrawal-induced apoptosis	379
Calpastatin	ALDD/S, LSSD/F, ALAD/S	1, 3, 7	Decreased inhibition of calpain	380
p27 ^{kip1}	DPSD/S	3, 7	↓p27 in cyclin E-cdk complexes	288
Rb (retinoblastoma) protein	DEAD/G	3	Unopposed E2F-1 action	290, 291
CDC27	?	3	↓Ubiquitin ligase, stabilization of cyclins A and B	272
Proteins Involved in Human Genetic Diseases				
Huntington	DSVD/L	3, 7	Possible nonphysiological cleavage (cf. 372)	293, 294
Dentatorubral pallidum atrophy protein	DSL/D/G	3	No known effect	294, 295
Presenilin-1	ARQD/S	?	Unknown	296-298
Presenilin-2	DSYD/S	3	Generates antiapoptotic fragment	296, 297, 299
Apoptotic regulatory proteins				
Bel-2	DAGD/V	?	Generates proapoptotic fragment	301-304
Bel-X ₁	HLAD/S	1, 3	Generates proapoptotic fragment	305
FLIP _L	LEVD/G	3, 8, 10	Unknown	144, 147
Bid	LQTD/G	8	Generates proapoptotic fragment	306, 307
Bax	FIQD/R	?	Unknown	303
ICAD	DEPD/S	3	Liberates active CAD endonuclease	308, 309, 312, 345

Tableau tiré de EARNSHAW *et al.* (1999).

5. La famille des homologues Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont d'importants régulateurs de l'apoptose. Les protéines faisant partie de cette famille ont deux caractéristiques communes, soit de réguler l'induction de l'apoptose et de posséder au moins un domaine BH (Bcl-2 homology domain). Ces domaines procurent les fonctions de régulations de l'apoptose de ces protéines (PETROS *et al.*, 2004; ; REGULA *et al.*, 2003; SORENSON, 2004). De plus, plusieurs homologues possèdent un domaine hydrophobe en C-terminal, appelé domaine TM pour domaine transmembranaire, qui est responsable de leur localisation membranaire. Cette famille de protéines, composé d'au moins 20 membres chez les mammifères (KIRKIN *et al.*, 2004), se divise en deux grands groupes : le groupe des homologues pro-apoptotiques et le groupe des homologues anti-apoptotiques. Comme leur nom l'indique, les homologues pro-apoptotiques favorisent l'induction de l'apoptose tandis que les homologues anti-apoptotiques (pro-survie) l'inhibent (CORY *et al.*, 2003; DONOVAN et COTTER, 2004; PETROS *et al.*, 2004; ; REGULA *et al.*, 2003). La famille porte le nom du premier membre à avoir été identifié, soit l'homologue Bcl-2, un homologue anti-apoptotique qui possède les 4 domaines BH et le domaine TM. Le gène encodant la protéine Bcl-2 a été identifié dans un lymphome folliculaire de cellule B humain où il était surexprimé suite à une translocation chromosomale t(14;18) (PEGORARO *et al.*, 1984). Cette protéine, étant importante dans le développement des lymphome des cellules-B, a donc été nommée Bcl-2 pour B cell lymphoma (TSUJIMOTO *et al.*, 1985).

La régulation de l'induction de l'apoptose par les protéines de la famille Bcl-2 se fait principalement au niveau de la mitochondrie. La balance entre les homologues pro-apoptotiques et les homologues anti-apoptotiques va déterminer, en partie, si il y a activation de la voie mitochondriale d'induction de l'apoptose (PETROS *et al.*, 2004). Comme il avait été mentionné précédemment, des protéines induisant l'apoptose sont séquestrées dans l'espace intermembranaire des mitochondries et la formation d'un pore au niveau de la membrane externe des mitochondries permet leur relâche au cytoplasme où elles sont en mesure d'activer la cascade apoptotique et ainsi causer l'apoptose (DONOVAN et COTTER, 2004; REGULA *et al.*, 2003). La formation de ce pore est principalement causée par l'oligomérisation de la protéine Bax, de la protéine Bak ou de la protéine Bok, des homologues pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (CORY *et al.*, 2003; DONOVAN et COTTER, 2004; YAKOVLEV *et al.*, 2004). Cependant, en condition de survie, la balance penche vers les homologues anti-apoptotiques, tel Bcl-2 et Bcl-X_L qui hétérodimérisent avec Bax, Bak et Bok ce qui inhibe l'oligomérisation de ces derniers et, par le fait même, la formation des pores à la mitochondrie (CORY *et al.*, 2003; KIRKIN *et al.*, 2004). La plupart des homologues anti-apoptotiques possèdent les 4 domaines BH ainsi que le domaine transmembranaire (DONOVAN et COTTER, 2004; PETROS *et al.*, 2004). Les homologues pro-apoptotiques sont séparés en deux sous-groupes, soit les homologues pro-apoptotiques à domaines multiples (Bax, Bak et Bok) qui possèdent les domaines BH1, BH2 et BH3 ainsi que le domaine transmembranaire et qui participent à la formation des pores à la mitochondrie, et les homologues pro-apoptotiques possédant seulement le domaine BH3 (Bad, Bim, Bmf, Bid, etc) qui exercent leur fonction pro-apoptotique principalement en inhibant les homologues anti-

apoptotiques par hétérodimérisation (CORY *et al.*, 2003; DONOVAN et COTTER, 2004; KIRKIN *et al.*, 2004). Plusieurs homologues de la famille Bcl-2 et leurs domaines sont présentés dans la figure 5. L'hétérodimérisation des homologues pro-apoptotiques à domaine BH3-seulement avec les homologues anti-apoptotiques empêche la séquestration des homologues à domaines multiples qui peuvent alors former des pores à la mitochondrie pour ainsi amener l'activation de la cascade apoptotique et induire l'apoptose. Donc, les différents homologues exercent leurs fonctions principalement par hétérodimérisation et, dans le cas des homologues pro-apoptotiques à domaines multiples, par oligomérisation. L'expression et/ou l'activité de certains homologues pro-apoptotiques, principalement les homologues à domaine BH3-seulement, sont augmentées en réponse à différents stimuli apoptotiques (CORY *et al.*, 2003; CREGAN *et al.*, 2004). Par exemple, des dommages à l'ADN peuvent induire l'activation de p53; une activation importante de p53 amène, entre autre, une augmentation de l'expression de Puma (CREGAN *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2001) et Noxa (ODA *et al.*, 2000), deux homologues pro-apoptotiques à domaine BH3-seulement (VILLUNGER *et al.*, 2003). Normalement, une telle réponse amène l'inactivation des homologues anti-apoptotiques et, ainsi, l'activation de la voie mitochondriale d'induction de l'apoptose. De plus, les homologues Bcl-2 peuvent, dans certains cas, réguler l'activation de la voie extrinsèque (CORY *et al.*, 2003; LANE *et al.*, 2004; RUDNEY *et al.*, 2005). L'induction de l'apoptose par les récepteurs de mort peut être dépendante de l'activation de la voie mitochondriale par le tBid, un homologue pro-apoptotique à domaine BH3-seulement, et dans une telle situation, les homologues Bcl-2 régule l'induction de l'apoptose par les récepteurs de morts. Dans d'autre cas, l'activation directe des caspase 3 et/ou 7 par la

caspace 8 et/ou 10 est suffisante pour induire l'apoptose; les homologues Bcl-2 n'ont alors pas de rôle important sur la régulation de cette induction de l'apoptose (CORY *et al.*, 2003; RUDNEY *et al.*, 2005).

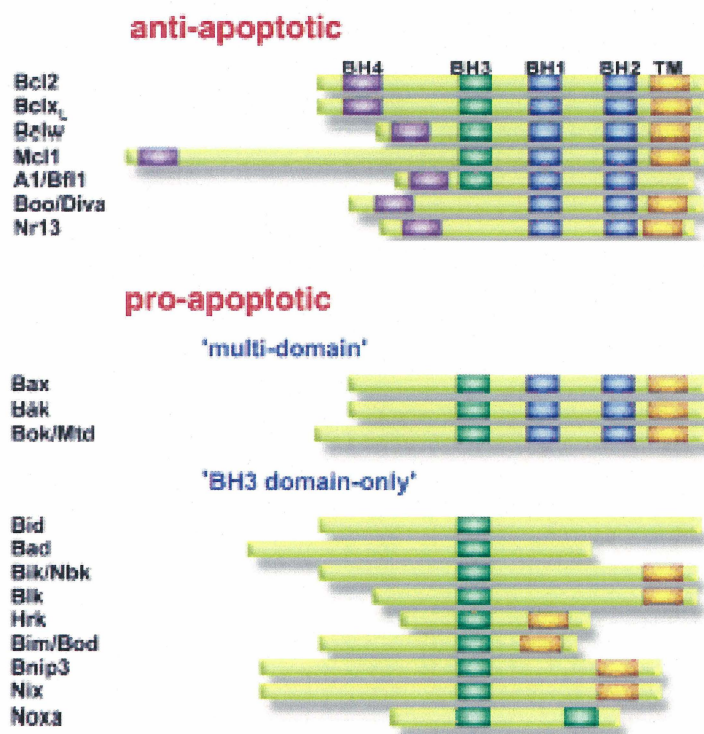


Figure 5. Famille des homologues Bcl-2

Plusieurs membres de la famille Bcl-2 sont présentés ainsi que leurs domaines. Figure adaptée de RANGER *et al.* (2001).

6. L'anoïkose

L'anoïkose est une forme d'apoptose induite par l'absence d'adhésion à une matrice extracellulaire (ECM) convenable (FRISCH et FRANCIS, 1994; MEREDITH *et*

al., 1993). Certains types cellulaires sont insensibles à cette forme d'apoptose; par contre, les cellules épithéliales, comme les cellules OSE, sont particulièrement sensibles à cette forme d'apoptose (BOUDREAU *et al.*, 1995; FRISCH et FRANCIS, 1994; FRISCH *et al.*, 1996; MEREDITH *et al.*, 1993). Les intégrines, des protéines hétérodimériques composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β et présentes à la surface des cellules, participent à la reconnaissance de l'ECM (BOUDREAU *et al.*, 1995; MEREDITH *et al.*, 1993; STRATER *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1995). La réponse à cette interaction ECM-intégrine est variable selon le type cellulaire, les sous-unités α et β composant l'intégrine et le type d'ECM présent (GROSSMANN, 2002). En général, l'interaction ECM-intégrine amène l'agglomération des intégrines ce qui permet le recrutement par leur domaine cytoplasmique des protéines FAK (FRISCH *et al.*, 1996b; MIYAMOTO *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995) et ILK (ATTWELL *et al.*, 2000; DELCOMMENNE *et al.*, 1998) au niveau du domaine cytoplasmique des intégrines. Ce recrutement permet l'autophosphorylation et donc l'activation de ces kinases (DELCOMMENNE *et al.*, 1998; FRISCH *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1995) qui amènent une cascade d'événements qui mène, entre autres, à l'activation des voies de survie PI3K/Akt (ATTWELL *et al.*, 2000; DELCOMMENNE *et al.*, 1998; KHWAJA *et al.*, 1997; RYTOMAA *et al.*, 2000) et MEK/ERK (CHEN *et al.*, 1994; MIYAMOTO *et al.*, 1995). L'activation de ces voies favorise la survie de plusieurs façons. Par exemple, Akt phosphoryle et inactive la caspase 9; MEK et Akt phosphoryle Bad ce qui amène sa liaison à la protéine 14-3-3 qui la séquestre; ERK1 et ERK2 phosphoryle Bcl-2 ce qui la protège contre la protéolyse dirigée par les ubiquitines (STUPACK et CHERESH, 2002). La perte d'adhésion des cellules à une ECM engendre donc la perte d'une multitude de signaux de survie. Il est

important de noter que les signaux de survie présentés dans cet ouvrage ne représentent qu'une partie des signaux générés par l'adhésion des cellules à la matrice. La figure 6 présente une partie des signaux générés par les interactions ECM-intégrines et leur effet sur la voie mitochondriale. Lors de la perte d'interaction ECM-intégrines il y a donc perte d'une multitude de signaux de survie. De plus, les intégrines agglomérées interagissent avec des composantes du cytosquelette ce qui le stabilise (MIYAMOTO *et al.*, 1995). Normalement, l'homologue pro-apoptotique Bmf est séquestré dans le cytosquelette d'actine via DLC-2 (DAY *et al.*, 2004; PUTHALAKATH *et al.*, 2001) tandis que l'homologue pro-apoptotique Bim est séquestré dans les microtubules via DLC-1 (DAY *et al.*, 2004; PUTHALAKATH *et al.*, 1999). Lors de perte des interactions ECM-intégrines, le cytosquelette est déstabilisé et les protéines Bim et Bmf sont alors relâchées au cytoplasme et peuvent inhiber les homologues anti-apoptotiques (DAY *et al.*, 2004; PUTHALAKATH *et al.*, 1999; PUTHALAKATH *et al.*, 2001). D'autre part, le détachement des cellules peut amener l'activation de la caspase 8 par un mécanisme qui n'a pas encore été parfaitement élucidé ce qui contribue aussi à induire l'anoïkose (FRISCH, 1999; RYTOMAA *et al.*, 1999; RYTOMAA *et al.*, 2000). En résumé, chez les cellules sensibles à l'anoïkose, lors de la perte d'adhésion à l'ECM, la relâche d'homologues pro-apoptotiques au cytoplasme, la perte de signaux de survie et/ou l'activation de la caspase 8 induit la mort de ces cellules par apoptose (GROSSMANN, 2002). La plupart de ces événements sont présentées dans la figure 7.

En général, les cellules cancéreuses développent une résistance à l'anoïkose et peuvent alors survivre en suspension et se disséminer. L'acquisition de la résistance à

l'anoïkose est particulièrement problématique dans les cancers ovariens étant donné que la mortalité causée par ce type de cancer est principalement due aux tumeurs secondaires engendrées par des cellules ayant survécu en suspension donc résistantes à l'anoïkose.

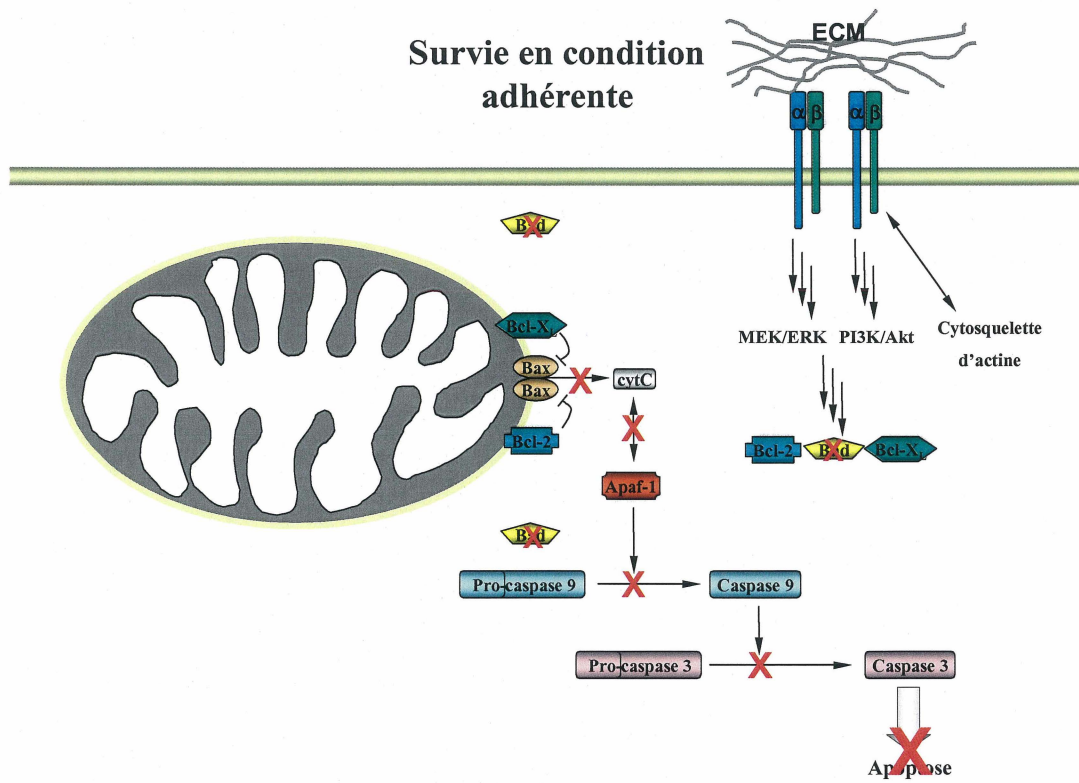


Figure 6. Survie des cellules en condition adhérente

Certains des signaux de survie générés par l'interaction ECM-intégrines sont présentés sur ce schéma ainsi que l'interaction des intégrines avec le cytosquelette d'actine. Les différents éléments de cette figure peuvent être intégrés à la figure 3, qui présente la voie intrinsèque de l'apoptose, pour une meilleure compréhension des mécanismes intracellulaires régissant l'anoïkose.

L'anoïkose

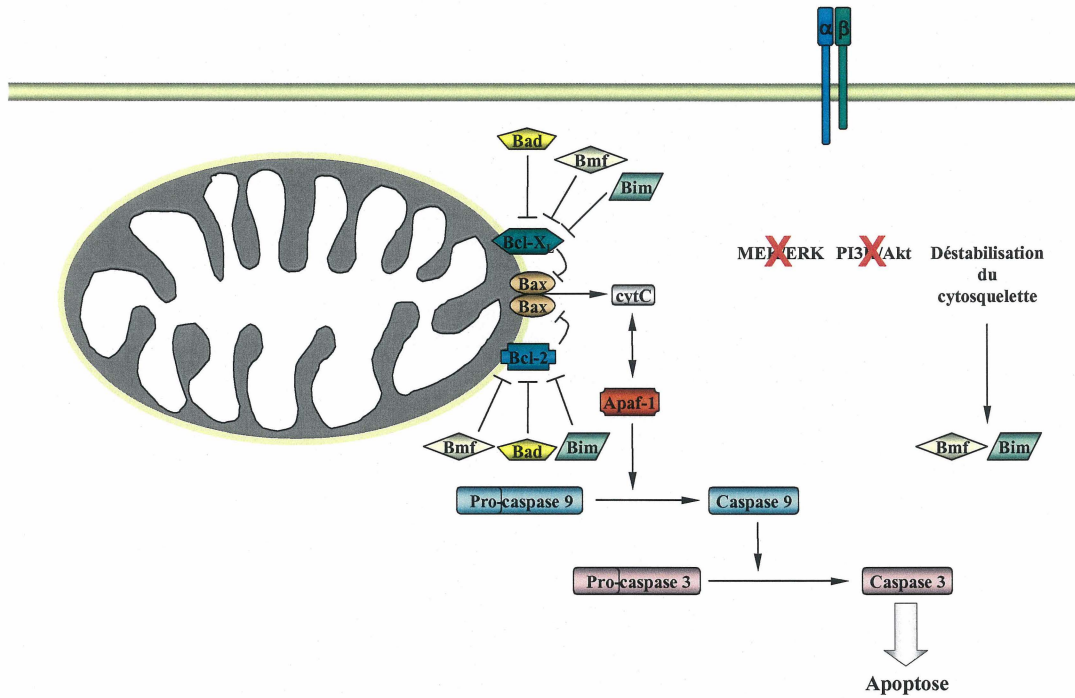


Figure 7. Induction de l'anoïkose

La perte d'interaction ECM-intégrines dans les cellules épithéliales amène la perte de signaux de survie et la déstabilisation du cytosquelette ce qui induit l'apoptose des cellules. Les différents éléments de cette figure peuvent être intégrés à la figure 3, qui présente la voie intrinsèque de l'apoptose, pour une meilleure compréhension des mécanismes intracellulaires régissant l'anoïkose.

7. La protéine Bcl-X_L

Bcl-X_L est une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2 encodée par le gène Bcl-X et, comme la plupart des homologues anti-apoptotiques, elle possède les 4 domaines BH ainsi que le domaine TM (BOISE *et al.*, 1993; DONOVAN et COTTER, 2004; PETROS *et al.*, 2004). Il existe au moins 3 isoformes encodées par le gène Bcl-X et générées par épissage alternatif, les plus connues étant l'isoforme long, Bcl-X_L, et l'isoforme court, Bcl-X_S (BAN *et al.*, 1998; BOISE *et al.*, 1993; GONZALEZ-GARCIA *et al.*, 1995). Bcl-X_S, contrairement à Bcl-X_L, exerce des fonctions pro-apoptotiques étant donné l'absence des domaines BH1 et BH2 qui sont encodés par l'exon absent chez son ARNm (BOISE *et al.*, 1993; COULTAS et STRASSER, 2003).

Dans une multitude de types cellulaires cancéreux et normaux, il a été démontré que la surexpression de Bcl-X_L inhibe l'induction de l'apoptose par différents stimuli apoptotiques (FIGUEROA *et al.*, 2004; GAJATE *et al.*, 2000; LEBEDEVA *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 1998; MINN *et al.*, 1998; SCHMITT *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 2005; XU *et al.*, 1999) tandis que l'inhibition de son expression la favorise (GUENSBERG *et al.*, 2002; LEBEDEVA *et al.*, 2000; OZVARAN *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2003). De plus, dans certains types cellulaires, l'inhibition de l'expression de Bcl-X_L peut induire l'apoptose sans stimulus apoptotique (HON *et al.*, 2004; LEECH *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2005; OZVARAN *et al.*, 2004; SMYTHE *et al.*, 2002). Par rapport à l'anoïkose, il a été démontré que l'inhibition de l'expression ou la surexpression de Bcl-X_L module la sensibilité à l'anoïkose des cellules intestinales de rats IEC-18;

l'inhibition de son expression les sensibilise (COLL *et al.*, 2002) tandis que sa surexpression les protège (ROSEN *et al.*, 2001).

Dans les cancers ovariens, une certaine controverse existe par rapport à l'importance de Bcl-X_L sur la résistance aux différents stimuli apoptotiques. D'abord, il a été observé que Bcl-X_L est surexprimé dans les cancers ovariens comparativement aux cellules normales d'ovaires (MARONE *et al.*, 1998) ce qui suggère que cette protéine pourrait être importante pour les cellules de cancers ovariens. Cependant, par rapport à ces fonctions, certaines études *in vitro* ont démontré que la surexpression de Bcl-X_L protège les cellules de cancer ovariens contre l'induction de l'apoptose par différents stimuli (LIU *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 2005) contrairement à d'autres études où cette surexpression n'a pas d'effet protecteur (BEALE *et al.*, 2000; ROGERS *et al.*, 2002; ROY *et al.*, 2000). Fait surprenant, la surexpression de Bcl-X_L dans la lignée A2780 avait des effets protecteurs face au cisplatine dans une étude (LIU *et al.*, 1998) mais n'en avait pas dans une autre (ROY *et al.*, 2000). Des études portant sur la surexpression de Bcl-X_L dans des modèles de xénogreffes ont démontrés un effet protecteur de la protéine face aux différents agents chimiothérapeutiques, tel le cisplatine et le taxol (ROGERS *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2005). L'effet de l'inhibition de l'expression de Bcl-X_L sur la sensibilité à différents stimuli apoptotiques a très peu été étudié dans les cancers ovariens. Dans une de ces rares études, la perte de Bcl-X_L dans la lignée A2780(100) via l'utilisation d'antisens ne sensibilisait pas ces cellules à différents agents chimiothérapeutiques causant des dommages à l'ADN, tel le cisplatine (ROY *et al.*, 2000). À ce jour, une seule étude publiée porte sur le rôle de Bcl-X_L dans la résistance à

l'anoïkose dans les cancers ovariens. Dans cette étude, les auteurs démontraient, via l'utilisation d'antisens, que Bcl-X_L module la résistance à l'anoïkose, l'inhibition de son expression sensibilisant les cellules HEY (carcinome ovarien humain) à cette forme d'apoptose (FRANKEL *et al.*, 2001). Malheureusement, l'effet de la perte de Bcl-X_L a été évalué dans une seule lignée et les contrôles n'étaient pas complets (l'effet de l'antisens n'a pas été contrôlé) ce qui laisse planer un doute sur la validité de ce résultat. Dans la même étude, une diminution des niveaux de Bcl-X_L était observée lors de la perte d'adhésion de cellules sensibles (cellules OSE) à l'anoïkose tandis que des niveaux stables étaient observés dans des lignées résistantes (cellules cancéreuses d'ovaires) à l'anoïkose (FRANKEL *et al.*, 2001). Les résultats de cette étude suggère néanmoins que Bcl-X_L aurait un rôle important dans la résistance à l'anoïkose dans ces cellules.

Dans la plupart des études citées, l'effet de l'inhibition de l'expression de Bcl-X_L ou de sa surexpression était observé dans une seule lignée, ce qui, malheureusement, n'empêchait pas les auteurs de tirer des conclusions générales sur les fonctions de cette protéine dans les cancers ovariens. Les différences observées pourraient donc être attribuées à des conditions expérimentales différentes, dans certains cas, mais principalement à l'utilisation de lignées cellulaires différentes. Dans les cancers ovariens, l'effet protecteur de Bcl-X_L pourrait donc être lignée spécifique.

8. L'interférence à l'ARN

L'interférence à l'ARN (ARNi) est une réponse biologique aux ARN double-brin (ARNdb) et constitue, entre autre, une défense antivirale (HANNON, 2002; HANNON et BROSSI, 2004). Ce phénomène, présent dans la plupart des organismes eucaryotes (HANNON, 2002), est médié par des duplexes d'ARN d'une taille de généralement 21 à 25 paires de bases générés par le clivage d'ARNdb de plus grande taille (HANNON, 2002; HANNON et BROSSI, 2004). Chez les mammifères, ce clivage est médié une RNase III dénommée Dicer (ELBASHIR *et al.*, 2001). Les courts duplexes d'ARN, aussi appelé siRNA (pour short interfering RNA), sont reconnus par des protéines qui mènent au recrutement d'un des brin du duplexe par un complexe protéique. Le complexe résultant se nomme le complexe RISC (pour RNA-induced silencing complex) et amène le clivage direct des ARN complémentaires au brin présent dans le complexe (ELBASHIR *et al.*, 2001; HANNON, 2002; HANNON et BROSSI, 2004). Les différentes étapes de l'ARNi sont présentées dans la figure 8. Les travaux de FIRE *et al.* (1998) ont démontrés qu'un long dsRNA amène, chez *C. Elegans*, une diminution plus importante de l'expression d'un gène que l'utilisation d'un brin antisens seulement. Par la suite, les travaux d'ELBASHIR *et al.* (2001) ont démontré que les ARNdb présents dans les cellules de mammifères sont clivés par une RNase III, nommée Dicer, en siRNA qui médient ensuite l'ARNi. L'ARNi constitue donc une défense contre les virus à génome constitué d'ARNdb car elle permet la dégradation des ARNm générés par ce type de virus. D'autre part, la protéine PKR exerce aussi une défense contre ce type de virus. Cette kinase reconnaît les ARNdb d'au moins 30 nucléotides puis s'autoactive; PKR

activée amène l'arrêt de la traduction ainsi que l'activation des voies des interférons (α et β) qui peuvent induire la mort cellulaire pour éliminer les cellules infectées et empêcher la propagation du virus (WILLIAMS, 1997).

L'utilisation d'ARNdb possédant un brin complémentaire à un ARNm cible permet donc d'amener la dégradation de cet ARNm. À condition que l'ARNdb utilisé ne possède pas de région complémentaire à d'autres ARNm, seule l'ARNm cible va être dégradé. Pour l'utilisation d'ARNdb comme outil pour inhiber l'expression d'un gène, l'activation de la voie PKR est néfaste étant donné qu'elle amène des réponses non-spécifiques, c'est pourquoi des ARNdb de moins de 30 paires de bases (siRNA), donc incapables d'activer PKR, sont généralement utilisés (HANNON, 2002; HANNON et BROSSI, 2004). La transfection de siRNA dans des cellules amène donc la dégradation de l'ARNm cible et cause ainsi spécifiquement l'arrêt de l'expression de la protéine encodée par cet ARNm. Ceci permet, entre autre, d'étudier les fonctions de cette protéine dans les cellules d'intérêt.

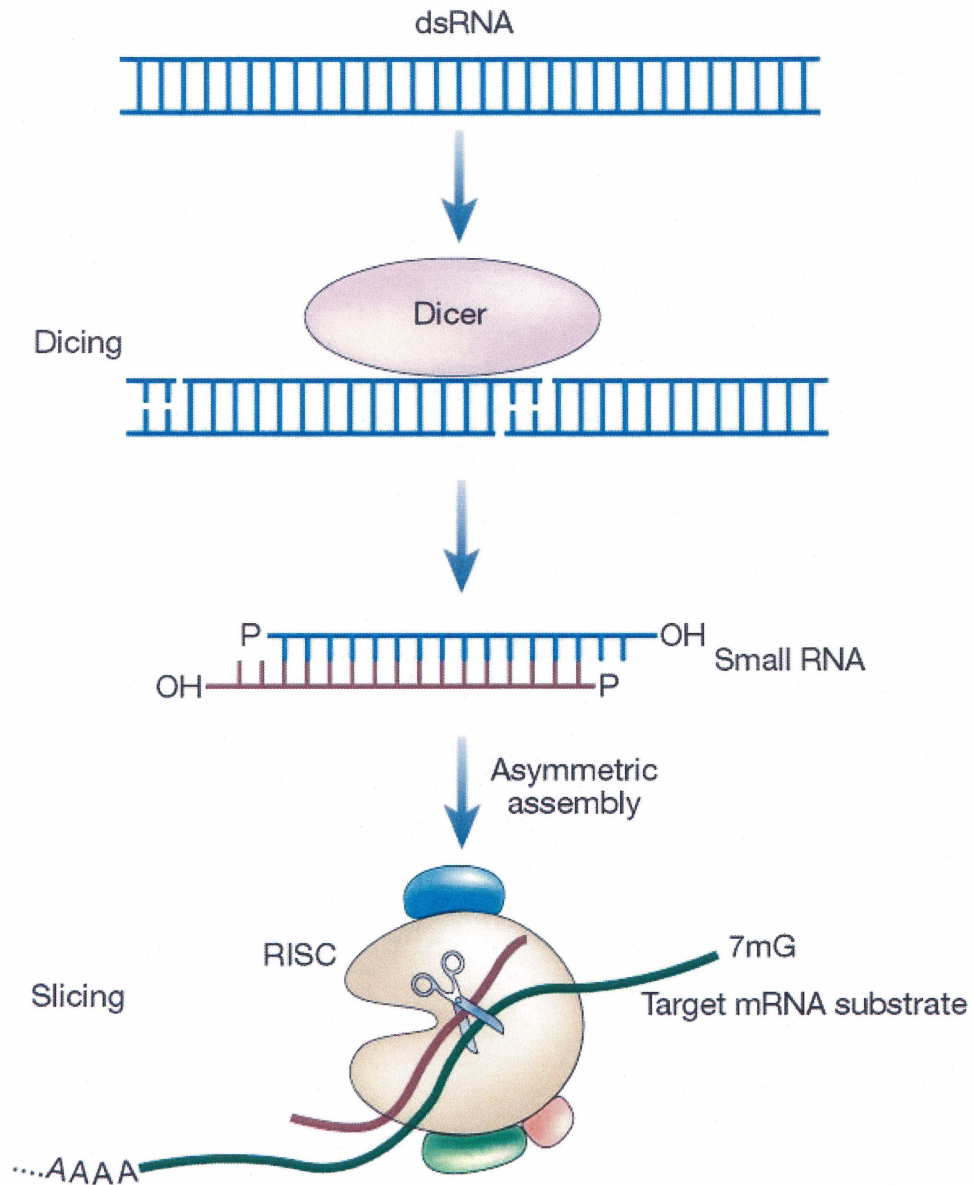


Figure 8. Étapes de l'ARNi

D'abord, les ARNdb sont clivés en siRNA par la protéine Dicer. Ensuite, les brins du siRNA se séparent et forment le complexe effecteur RISC qui médie la dégradation des ARNm complémentaires au brin d'ARN présent dans le complexe. Figure adaptée de HANNON et ROSSI (2002).

9. But

Le but principal de ce projet est d'évaluer l'importance de la protéine Bcl-X_L dans les cancers ovariens et plus spécifiquement dans la survie de ces cellules en condition adhérente et non-adhérente ainsi que sur leur sensibilité aux principaux agents chimiothérapeutiques utilisés dans la thérapie de ce type de cancer (composé-platiné et taxol). Notre hypothèse est que Bcl-X_L est fonctionnellement non-équivalent dans les différentes lignées de cellules cancéreuses. Pour accomplir cette étude, nous allons inhiber l'expression de Bcl-X_L dans différentes lignées de cancer ovarien via l'utilisation d'un siRNA et, d'autre part, nous allons la surexprimer via l'utilisation d'un vecteur de surexpression. L'impact de l'inhibition et de la surexpression sur la survie des cellules sera évalué dans différents contextes. De plus, le niveau d'expression de Bcl-X_L dans des cellules OSE sera comparé au niveau d'expression dans des lignées de cancer ovarien.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

10. Culture cellulaire et réactifs

La lignée de cancer ovarien OVCAR-3 et la lignée de cancer du col de l'utérus HeLa ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA). La lignée de cancer ovarien SKOV3ip1 a été fournie par J. Price (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX). Cette lignée a été établie à partir d'ascites produits par une souris *nu/nu* qui avait développé des tumeurs après l'injection intrapéritonéale de cellules SKOV3. La lignée SKOV3ip1 a un phénotype plus agressif que la lignée SKOV3. Les lignées de cancer ovarien CaOV-3, OV4 et UCI 101 ont été fournies par D.T. Curiel (Gene Therapy Center, University of Alabama at Birmingham, AL). Les lignées COV-2 et COV-17 ont été établies à partir d'ascites de patientes atteintes du cancer ovarien et fournies par P. Bessette du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Les cellules épithéliales d'ovaires normaux OVN-12T, OVN-13T et OVN-22T ont aussi été fournies par P. Bessette. Les cellules épithéliales d'ovaires normaux NOV-31 ont été immortalisées et fournies par Anne-Marie Mess-Masson (Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada). Les cellules SKOV3ip1, CaOV-3, OV4 et UCI 101 sont cultivées dans du DMEM/F12 (Wisent, Saint-Bruno, Québec, Canada) contenant 10% de sérum foetal bovin (FBS) (BioMedia, Drummondville, Québec, Canada) inactivé. Les cellules COV-2 et COV-17 sont cultivées dans du DMEM/F12 contenant 20% de FBS, les cellules OVCAR-3 dans du RPMI 1640 (Wisent, Saint-Bruno, Québec, Canada) contenant 20% de FBS et 10 µg/mL d'insuline (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) et les cellules HeLa dans du DMEM (Wisent, Saint-Bruno, Québec, Canada) contenant 10% de FBS.

Les cellules épithéliales d'ovaires normaux sont cultivées dans du Medium 199 / MCDB 105 (1:1) (Wisent, Saint-Bruno, Québec, Canada) contenant 10% de FBS. Tous les milieux complets 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). Les cellules sont maintenues dans un incubateur humidifié contenant 5% de CO₂. Le cis-diamminedichloroplatinium (cisplatine) a été acheté de chez Faulding (Montréal, Québec, Canada) et le taxol de Bristol-Meyers (New-York, NY) a été fourni par le département de chimiothérapie du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (Sherbrooke, Québec, Canada).

11. Culture cellulaire en suspension pour les essais d'anoïkose

Des pétris 6 cm ont été recouverts de poly-2-hydroxyethyl méthacrylate (poly-HEMA, 10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) dilué dans de l'éthanol 95%. Deux couches de 3 mL de solution de poly-HEMA sont appliquées et l'éthanol est évaporé pendant environ 18 heures pour chaque couche dans une hotte à flux laminaire. Deux lavages au PBS sont effectués avant l'utilisation des pétris. Par pétri, 5×10^5 cellules sont incubées dans 3,33 mL du milieu de culture complet approprié ($1,5 \times 10^5$ cellules / mL). Les cellules sont cultivées 3 jours avant d'effectuer l'essai ELISA (voir plus bas) pour mesurer l'induction de l'apoptose. En parallèle, des cellules sont cultivées en condition adhérente comme contrôle.

12. Analyse protéique par immunobuvardage de type Western

Les extraits protéiques sont obtenus par la lyse pendant 30 minutes sur glace des cellules avec un tampon isotonique NP-40 (283 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM Hepes, 4 mM EGTA, 0,6% Nonidet P-40, pH 7.2) contenant des inhibiteurs de protéases (1 µg/mL AEBSF, 2 µg/mL aprotinine, 0,7 µg/mL pepstatine A et 0,5 µg/mL leupeptine) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Le contenu protéique des échantillons est mesuré par l'essai de dosage Bradford (Biorad, Hercules, CA). Pour chaque échantillon, un volume de 30 µL contenant 30 µg de protéine est chauffé à 95°C pendant 5 minutes en présence de β-mercaptoéthanol afin de dénaturer les protéines. Les échantillons sont ensuite appliqués sur un gel de polyacrylamide 12% et la migration s'effectue à 120 V pendant environ 1 heure. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, Québec, Canada) pendant environ 1 heure par l'application d'un courant de 300 mA. Les membranes sont ensuite lavées avec du PBS-Tween 20 0,1% avant d'être bloquées pendant 1 heure avec une solution PBS-Tween 20 0,1% contenant 4% de lait (solution de blocage). Suite à leur lavage, les membranes sont incubées pendant environ 18 heures avec l'anticorps primaire approprié dilué dans la solution de blocage. Les membranes sont ensuite lavées avec une solution de PBS-Tween 20 0,1% puis incubées avec l'anticorps secondaire approprié (anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA). Finalement, après le lavage des membranes, les protéines sont visualisées par chémiluminescence avec le ECL+ selon les recommandations du manufacturier (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Les anticorps primaires utilisés sont l'anti-Bcl-X_L de Cell Signaling

(Beverly, MA), l'anti-caspase 3 de BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada), l'anti-PARP de Cell Signaling (Beverly, MA) et l'anti- α -tubuline de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Les anticorps anti-Bcl-X_L et anti-PARP sont des anticorps de lapin tandis que l'anti-caspase 3 et l'anti- α -tubuline sont des anticorps de souris. Les anticorps primaires ont été utilisés à une dilution de 1:1000 sauf l'anticorps anti- α -tubuline qui a été utilisé à une dilution de 1:40000.

13. Analyse par RT-PCR du niveau des ARNm encodant Bcl-X_L et Bcl-X_S

Les ARN totaux sont extraits des cellules d'intérêt avec le TRIzol (Invitrogen Life Technology, Burlington, Ontario, Canada) selon les recommandations du manufacturier. La transcription inverse des ARN est effectuée avec l'AMV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI) à partir d'amorces oligo-dT (Invitrogen Life Technology, Burlington, Ontario, Canada). L'amplification par PCR des ADNc de Bcl-X_L et de Bcl-X_S est effectuée avec l'amorce sens 5'-ATGTCTCAGAACCGGGA-3' et l'amorce anti-sens 5'-TCATTTCCGACTGAAGAGTGA-3'. L'amplification de l'ADNc de la β -actine est effectuée avec l'amorce sens 5'-GAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGG-3' et l'amorce anti-sens 5'-CGCAGGATGGCATGGGGGAGGGCATAACCCC-3'.

14. Analyse de l'expression et la localisation de Bcl-X_L par immunofluorescence indirecte sur lame

Les cellules à analyser sont ensemencées sur une lame à microscope stérile. Après environ 24 heures d'incubation, les cellules sont lavées au PBS, fixées à -20°C avec du méthanol pendant 10 minutes puis conservées à 4°C dans du PBS (les cellules fixées

peuvent être conservées ainsi jusqu'à 3 semaines). Les cellules sont traitées pendant 5 minutes sur glace avec une solution de PBS contenant 0,1% de Triton X-100 afin de les perméabiliser puis lavées avec du PBS froid. Ensuite, les lames sont bloquées pendant 45 minutes avec une solution de PBS BSA 2% (solution de blocage). Suite au blocage, les lames sont incubées pendant 1 heure avec l'anticorps anti-Bcl-X_L (Cell Signaling, Beverly, MA) dilué 1:500 dans la solution de blocage. Les lames sont ensuite lavées avec du PBS froid puis incubées pendant 45 minutes dans le noir avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à l'Oregon-Green (Molecular Probes, Eugene, OR) dilué 1 :500 dans la solution de blocage. Toutes les étapes subséquentes sont effectuées dans le noir. Après l'incubation avec l'anticorps secondaire, les lames sont lavées avec du PBS froid puis incubées 3 minutes avec une solution PBS contenant 0,5 µg/mL de DAPI (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Québec, Canada). Les lames sont lavées avec du PBS froid puis une goutte de milieu de montage (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) est ajoutée sur la zone qui sera observée puis recouverte par une lamelle de verre. Les côtés de la lamelle sont scellés sur la lame avec un fixatif transparent. Finalement, les lames sont visualisées avec un microscope à fluorescence Olympus 1X70.

15. Production et transfection des siRNA

Les siRNA produits in vitro ont été synthétisés avec le Silencer™ siRNA Construction Kit d'Ambion (Austin, TX) selon les procédures fournies par le manufacturier. Le brin sens de chaque duplexe correspond une séquence AA(N)₁₉ de la région codante de l'ARNm de Bcl-X_L (GenBank accession no. NM 138578) à l'exception du siRNA #6 qui correspond seulement à une séquence (N)₁₉ et qui possède donc deux

extrémités non-complémentaires. Les différents siRNA ciblent les séquences suivantes de la région codante du ARNm de Bcl-X_L; #1: nucléotides 58-78, #2: nucléotides 371-391, #3: nucléotides 458-478, #4: nucléotides 469-489, #5: nucléotides 523-543 et #6: nucléotides 540-558. Le siRNA dirigé contre la GAPDH a été synthétisé à l'aide d'amorces qui étaient fournies dans le kit dont la séquence est inconnue. Les siRNA synthétisés chimiquement ont été achetés de la compagnie IDT (Coralville, IA). Ceux-ci sont le siRNA #4 ciblant l'ARNm de Bcl-X_L (même cible que le siRNA #4 d'Ambion) et un siRNA ciblant la séquence 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAUU-3' de l'ARNm de la luciférase. Les cellules OVCAR-3 sont transfectées en suspension tandis que les cellules HeLa, SKOV3ip1 et CaOV-3 sont transfectées en condition adhérente, 24 heures après leur ensemencement. La concentration finale du siRNA est de 50 nM et la culture des cellules ensemencées et des cellules transfectées est effectuée dans un milieu sans antibiotique et sans fongicide. Dans le cas des transfections de cellules en condition adhérente, le nombre de cellules ensemencées est la quantité requise pour obtenir une confluence d'environ 30-50% lors de la transfection. Pour les transfections en plaque 6 puits, dans le cas des cellules CaOV-3, $1,3 \times 10^5$ cellules sont ensemencées par puit et, dans le cas des cellules SKOV3ip1 et HeLa, $6,5 \times 10^4$ cellules sont ensemencées par puit. Les cellules sont transfectées en plaques 6 puits avec un mélange contenant l'oligofectamine (Invitrogen Life Technology, Burlington, Ontario, Canada), l'optiMEM (Invitrogen Life Technology, Burlington, Ontario, Canada) et le siRNA (sauf pour le contrôle transfectant seulement) selon les recommandations du fabricant. Pour les transfections en pétri de 10 cm, dans le cas des cellules CaOV-3, 1×10^6 cellules sont ensemencées et, dans le cas des cellules SKOV3ip1, 5×10^5 cellules sont ensemencées.

Pour les transfections en condition adhérente dans les pétris de 10 cm, les recommandations du manufacturier sont adaptées pour des plus grands volumes. Brièvement, le siRNA (18,5 μ L de siRNA 20 μ M) est dilué dans 1345 μ L d'optiMEM tandis que 29,5 μ L d'oligofectamine est dilué dans 80,5 μ L d'optiMEM. Les deux mélanges sont incubés 10 minutes avant d'être combinés. Le mélange obtenu est incubé 20 minutes et pendant cette incubation, les cellules à transférer sont lavées avec du milieu de transfection (milieu sans FBS, sans antibiotique, sans fongizone). Suite au lavage, 6 mL de milieu de transfection est ajouté au pétri puis le mélange transfectant/siRNA y est ajouté. La transfection des cellules HeLa, SKOV3ip1 et CaOV-3 se fait donc dans un milieu sans FBS et, 4 heures post-transfection, la concentration en FBS est ajustée à 10% avec du milieu contenant 30% de sérum (ajout de 0,5 mL par puit de plaque 6 puits et de 3,7 mL par pétri de 10 cm). Pour la transfection de cellules OVCAR-3 en suspension, $2,5 \times 10^6$ cellules contenu dans 9,6 mL de milieu de transfection (RPMI 20% FBS, sans antibiotique, sans fongizone) sont inoculées dans un pétri de 10 cm immédiatement avant la transfection. Le siRNA (27,8 μ L) est dilué dans 1270 μ L d'optiMEM tandis que 44,3 μ L d'oligofectamine sont dilués dans 121,7 μ L d'optiMEM. Les deux mélanges sont incubés 10 minutes avant d'être combinés. Le mélange résultant est incubé 20 minutes puis ajouté aux cellules. Pour la validation de l'efficacité des siRNA, le contenu protéique des cellules est extrait 48 heures post-transfection et analysé par immunobuvardage de type Western. De plus, dans le cas des cellules CaOV-3 et SKOV3ip1, la validation a aussi été effectuée par immunofluorescence à partir de cellules fixées 48 heures post-transfection. Pour les cellules SKOV3ip1, les effets des

siRNA #1 et #4 d'Ambion sur les niveaux des ARNm encodant Bcl-X_L et Bcl-X_S ont été évalués à 48 heures post-transfection par RT-PCR.

16. Production des clones stables

Afin de générer un plasmide qui permet la surexpression de Bcl-X_L, l'ADNc de Bcl-X_L a été sous-cloné du vecteur pORF/Bcl-X_L au vecteur pcDNA3 via l'utilisation des enzymes de restrictions NotI et XhoI. Le vecteur pcDNA3 possède un promoteur fort CMV qui permet l'expression constitutive du gène sous son contrôle et possède le gène néomycine qui permet la sélection des cellules transfectées. Les transfusions de plasmides sont effectuées avec le FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Québec, Canada) selon les recommandations du manufacturier. Brièvement, 2 µg d'ADN (pcDNA3 ou pcDNA3/Bcl-X_L) linéarisés (avec l'enzyme de restriction PvuI) et 6 µL de FuGENE 6 sont incubés pendant 1 heure dans un volume total de 100 µL puis ajouté aux cellules à transfecter qui sont d'une confluence de 50-80%. Dans le cas des cellules OVCAR-3, 6x10⁵ cellules sontensemencées dans des pétris de 6 cm, 48 heures avant la transfection tandis que dans le cas des cellules COV-2 et SKOV3ip1, 5x10⁵ cellules sontensemencées dans des pétris de 6 cm, 24 heures avant la transfection. Les cellules sont incubées 5 jours avant d'être réensemencées dans un pétri de 10 cm puis sélectionnées pour les cellules transfectées stablement 24 heures plus tard avec du G418 (Invitrogen Life Technology, Burlington, Ontario, Canada). Les doses de G418 utilisées pour la sélection sont de 0,4 mg/mL pour les cellules SKOV3ip1, de 0,2 mg/mL pour les cellules COV-2 et de 0,1 mg/mL pour les cellules OVCAR-3. Le milieu de sélection est changé à chaque 3 ou 4 jours. Dans le cas des cellules COV-2 et OVCAR-3, la sélection a permis

d'obtenir des cellules isolées qui, avec le temps, ont formé des îlots de cellules. Une douzaine de ces îlots par plasmide (pcDNA3 ou pcDNA3/Bcl-X_L) par lignée ont été récupérés avec des anneaux de clonage puis mis en culture dans des puits de plaques 96 puits. Les clones ont été par la suite amplifiés par leur passage dans des contenants plus grands (24 puits, 12 puits, 6 puits, T25 et T75) jusqu'à l'obtention d'au moins deux T75. Malheureusement, dans le cas des cellules SKOV3ip1, un tapis de cellules transfectées stablement a été obtenu plutôt que des îlots; par conséquent, l'ensemble des cellules a été utilisé plutôt que des clones. Les clones stables et les populations stables ont ensuite été analysés par immunobuvardage de type Western pour évaluer l'expression de Bcl-X_L. Les cellules transfectées stablement sont constamment maintenues dans le milieu de sélection sauf lors des différentes expériences.

17. Coloration des cellules vivantes au cristal violet

Le milieu de culture contenu dans les puits de plaque 6 puits est d'abord enlevé et ensuite, les puits sont lavés avec 3 mL de PBS. Les cellules sont fixées avec 1 mL de solution Buffered-Formaldehyde Fresh, 10% formaline (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) pendant 10 minutes. Le tampon est enlevé et les puits sont lavés avec 3 mL de PBS. Les cellules vivantes sont colorées avec 1 mL de solution de cristal violet (1% cristal violet dans éthanol 70%) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) pendant 15 minutes. Le colorant est enlevé et les cellules sont lavées avec de l'eau jusqu'à ce que l'excès de colorant soit enlevé. Finalement, les puits sont séchés pendant au moins 18 heures à l'air libre. Pour évaluer l'effet de Bcl-X_L sur les cellules CaOV-3 et les cellules SKOV3ip1,

des cellules transfectées avec les siRNA (ou traitées seulement avec le transfectant) en plaque 6 puits ont été colorées avec le cristal violet.

18. Essai de prolifération et de survie par XTT

L'essai XTT mesure l'activité métabolique des cellules et permet ainsi de d'évaluer indirectement la prolifération ou la survie cellulaire. En effet, le XTT, un sel de tétrazolium, est réduit en un composé coloré par des enzymes mitochondriales de cellules métaboliquement actives. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité de cellules métaboliquement active. En plus de permettre la mesure de la prolifération, cet essai permet d'évaluer la survie cellulaire étant donné que les enzymes mitochondriales sont inactivées rapidement lors de la mort cellulaire. Cet essai, effectué à partir de cellules contenues dans des puits de plaques 96 puits, se déroule dans le noir, le XTT réagissant à la lumière. D'abord, 10 mg de XTT (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) sont dilués dans 10 mL de PBS puis incubés 30 minutes à 60°C. Ensuite, 10 mL du milieu de culture approprié (DMEM/F12 ou RPMI 1640) sans rouge de phénol (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) chauffé à 37°C et 15 µL de phénazine méthosulfate (PMS) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) sont ajoutés à la solution de XTT. Le milieu de culture est enlevé des puits à analyser et 100 µL de la solution contenant le PMS et le XTT y sont ajoutés. Les plaques sont incubées 30 minutes puis l'absorbance à 450 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur à microplaque. Les courbes de prolifération sont obtenues en effectuant l'essai XTT à différents temps après l'ensemencement des cellules. Dans le cas des expériences avec les siRNA, 5x10³ cellules sont ensemencées par puit, 24 heures après leur transfection, tandis que dans les

essais avec les clones stables, $2,5 \times 10^3$ cellules sontensemencées par puit. D'autre part, le pourcentage de survie est évalué en comparant l'absorbance de cellules traitées avec une drogue par rapport à l'absorbance de cellules non traitées. Pour les essais de survie, $1,5 \times 10^4$ cellules sontensemencées par puit, les traitements avec les drogues sont débutés 24 heures post-ensemencement et les mesures sont prises à 24 et 48 heures post-traitement. Dans les cas des expériences avec les siRNA, les cellules sontensemencées 24 heures après leur transfection. Les concentrations de cisplatine utilisées sont de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les cellules SKOV3ip1, les cellules CaOV-3 et les clones OVCAR-3 et de 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les cellules OVCAR-3 transfectées avec les siRNA. Les concentrations de taxol utilisées sont de 15 nM pour les cellules SKOV3ip1 et les cellules CaOV-3 et de 500 nM pour les cellules OVCAR-3. Au moins 9 lectures sont effectuées dans au moins deux expériences indépendantes pour chaque échantillon.

19. Mesure de l'apoptose

Le kit Cell Death Detection ELISA de Roche Molecular Biochemicals (Laval, Québec, Canada) permet de mesurer l'enrichissement des nucléosomes au cytoplasme et ainsi d'évaluer l'induction de l'apoptose. Les cellules à analyser sont récupérées et lavées au PBS avant d'être comptées puis lysées à l'aide du tampon fourni dans le kit. Un volume de lysat correspondant à l'équivalent de 1×10^3 cellules est utilisé pour effectuer l'essai. Deux mesures par échantillon sont effectuées et chaque expérience est répétée deux fois pour 4 mesures au total. L'essai est effectué selon les recommandations du fabricant. L'ELISA est utilisé pour mesurer l'induction de l'apoptose dans les cellules transfectées avec les siRNA. Dans ces expériences, le contrôle utilisé est un lysat

de cellules non transfectées (traitées avec le transfectant), cultivées en condition adhérente en absence d'agent chimiothérapeutique et obtenu 3 jours après leur ensemencement (2×10^5 cellules ensemencées dans un puit de plaque 6 puits). Pour les différentes expériences en condition adhérente, 2×10^5 cellules sont ensemencées 24 heures post-transfection dans des puits de plaques 6 puits. Pour les cellules CaOV-3, l'effet des siRNA a été évalué à différents temps post-transfection, soit de 2 à 7 jours post-transfections. Dans les cas des cellules SKOV3ip1 et OVCAR-3, l'effet des siRNA a été évalué à 4 jours post-transfection mais aussi en réponse aux drogues. Pour les essais de sensibilité, les cellules sont traitées avec le cisplatine ou le taxol 48 heures après leur réensemencement. Les concentrations utilisées de drogues sont, dans le cas du cisplatine, de $5 \mu\text{g/mL}$ pour les cellules SKOV3ip1 et de $1,25 \mu\text{g/mL}$ pour les cellules OVCAR-3 et, dans le cas du taxol, de 15 nM pour les cellules SKOV3ip1 et de 500 nM pour les cellules OVCAR-3. Pour les essais d'anoïkose, les cellules SKOV3ip1 et OVCAR-3 sont réensemencées 24 heures post-transfection dans des pétris de 6 cm de polyHEMA et cultivées pendant 3 jours (voir la section X) avant d'effectuer l'essai.

Alternativement, l'apoptose a été mesurée par iodure de propidium en cytométrie de flux. La fluorescence de l'iodure de propidium est augmentée par sa liaison à l'ADN double-brin. Ainsi, l'essai iodure de propidium en cytométrie de flux permet d'évaluer le contenu en ADN de chaque cellule. Lors de l'apoptose, l'ADN internucléosomal est dégradé ce qui diminue la quantité d'ADN présente dans la cellule. Les cellules apoptotiques se situent en subG1 sur le graphique portant le nombre de cellules en fonction de leur fluorescence donc en fonction de leur contenu en ADN et le pourcentage

de cellules en subG1 correspond au pourcentage de cellules apoptotiques. Cet essai, ainsi que l'essai XTT, a été utilisé pour évaluer la sensibilité des clones stables aux cisplatine et au taxol. Pour cet essai, $1,5 \times 10^6$ cellules ont étéensemencées dans un pétri de 10 cm et, 2 jours plus tard, le milieu de culture est chang e pour du milieu contenant du cisplatine ou du taxol. Le traitement au cisplatine est de 2 jours à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tandis que le traitement au taxol est de 3 jours à 500 nM. Suite à ces traitements, les cellules sont r cup er es par trypsinisation et lav es 2 fois avec du PBS puis resuspendues dans 0,5 mL de PBS. Doucement, 4,5 mL d'éthanol 95% à 4 C est ajout e à la suspension cellulaire afin de fixer les cellules. Les cellules sont conserv es ainsi au moins 18 heures et jusqu'à 3 semaines à 4 C. Ensuite, deux lavages au PBS / BSA 1% sont effectu es. Lors du deuxième lavage, la suspension cellulaire est filtr e sur une maille de 40 μm puis le décompte cellulaire est effectu e. Les cellules sont centrifug es puis resuspendues dans 160 μL de PBS / BSA 1% par 10^6 cellules présentes. Les étapes suivantes doivent être effectu es dans le noir. Ensuite, 20 μL de solution 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iodure de propidium (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), 38 mM sodium citrate, pH 7,0 et 20 μL de solution 10 mg/mL RNase A (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Québec, Canada), 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 sont ajout es par 10^6 cellules présentes (il est crucial de conserver ce ratio PI et RNase A par rapport au nombre de cellules). Le mélange est incub e   37 C pendant 30 minutes. Finalement, la fluorescence (en FL2) des cellules est mesur e avec un FACS (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada).

20. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm l'erreur standard. Une différence est considérée statistiquement significative lorsque P est inférieur à 0,05 selon le test de t Student non-pairé bilatéral.

RÉSULTATS

21. Expression de Bcl-X_L dans les cellules OSE et les cellules de cancer ovarien

Afin de vérifier les niveaux d'expression de la protéine Bcl-X_L dans les différentes cellules épithéliales d'ovaires, normales et cancéreuses, l'immunobuvardage de type Western a été effectué à partir d'extraits protéiques obtenus de différentes cellules humaines d'ovaires. Le tableau 2 présente les cellules utilisées ainsi que le statut clinique des patientes lors du prélèvement. Malgré que la détection de Bcl-X_L n'a pas été effectuée sur un seul et même gel pour les différentes cellules, il est clair que les cultures primaires de cellules normales et, à un degré moindre, dans la lignée de cellules normales NOV-31, les niveaux d'expression de Bcl-X_L sont beaucoup plus faibles que dans les lignées cancéreuses (figure 9). La détection de l' α -tubuline dans la lignée OV-4 est très faible ce qui suggère que moins de protéines ont été chargées pour cet échantillon donc le niveau réel de Bcl-X_L serait supérieur au niveau observé. Les cellules cancéreuses d'ovaires analysées surexpriment Bcl-X_L comparativement aux cellules normales d'ovaires.

Tableau 2. Description des différentes cellules humaines d'ovaires analysées

Cellules		Description
Normales	OVN 12T	Culture primaire de cellules OSE
	OVN 13T	Culture primaire de cellules OSE
	OVN 22T	Culture primaire de cellules OSE
	NOV-31	Lignée de cellules OSE
Cancéreuses	CaOV-3	Lignée cellulaire d'ovaires cancéreux, adénocarcinome
	SKOV3ip1	Lignée cellulaire dérivée des cellules SKOV3; phénotype plus agressif (SKOV3: lignée cellulaire d'ovaires cancéreux, adénocarcinome, patiente répondant au cisplatine)
	OV4	Lignée cellulaire d'ovaires cancéreux
	UCI 101	Lignée cellulaire d'ovaires cancéreux, adénocarcinome, patiente résistante au cisplatine
	OVCAR-3	Lignée cellulaire d'ovaires cancéreux, adénocarcinome, patiente résistante au cisplatine
	COV-2	Lignée cellulaire d'ovaires cancéreux, adénocarcinome disséminé, patiente répondant au cisplatine
	COV-17	Lignée cellulaire d'ovaires cancéreux

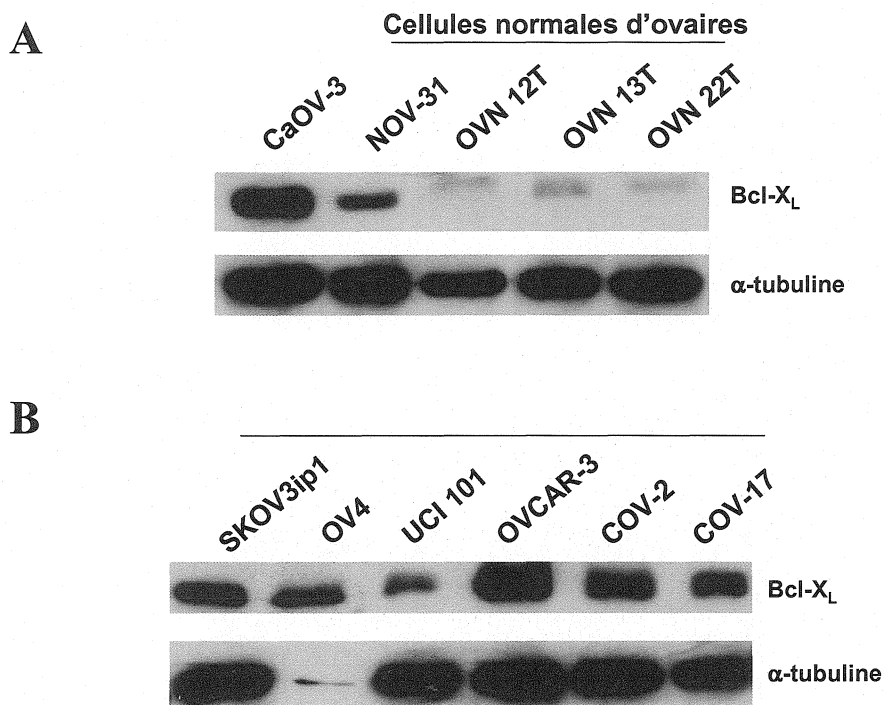


Figure 9. Expression de la protéine Bcl-X_L dans des cellules humaines d'ovaires

L'analyse par immunobuvardage de type Western de l'expression de Bcl-X_L a été effectuée sur des extraits protéiques de cellules humaines d'ovaires. **(A)** Cellules CaOV-3 et cellules normales. **(B)** Cellules cancéreuses. La détection de l'α-tubuline a été effectuée comme contrôle de chargement.

22. Sélection du siRNA

D'abord, six siRNA ciblant l'ARNm encodant Bcl-X_L ainsi qu'un siRNA ciblant l'ARNm encodant la GAPDH ont été produits à l'aide du kit de la compagnie d'Ambion. Les régions ciblées de l'ARNm par les siRNA Bcl-X_L sont présentées à la figure 10 et la position exacte de ces régions, dans le tableau 3. Les différents siRNA ciblent seulement l'ARNm de Bcl-X_L à l'exception du siRNA #1 qui cible à la fois l'ARNm de Bcl-X_L et de Bcl-X_S. L'efficacité des différents siRNA a été évaluée dans les cellules HeLa (figure 11A) ainsi que dans les cellules SKOV3ip1 (figure 11B) par immunobuvardage de type Western à partir d'extraits protéiques de cellules 48 heures post-transfection. Parmi les différents siRNA, le #1 et le #4 sont les plus efficaces étant donné qu'ils amènent la diminution la plus importante de l'expression de Bcl-X_L. Malheureusement, les anticorps utilisés (3 anticorps différents) n'ont pas permis la détection de Bcl-X_S même si ils devaient reconnaître cet isoforme, ce qui suggère que l'isoforme court n'est pas exprimée suffisamment pour pouvoir le détecter par immunobuvardage de type Western. Donc, afin de s'assurer que le siRNA #4 n'a pas d'effet sur l'ARNm de l'isoforme court, l'effet des deux siRNA #1 et #4, soit les siRNA les plus efficaces, a été évalué par RT-PCR à partir d'ARNm isolés de cellules SKOV3ip1 48 heures post-transfection (figure 12). Comparativement aux contrôles transfectant seul et siRNA GAPDH, les deux siRNA Bcl-X_L causent la disparition de l'ARNm Bcl-X_L, ce qui corrèle avec les résultats d'immunobuvardage de type Western, tandis que seul le siRNA #1 cause la diminution de l'ARNm de Bcl-X_S. Le siRNA #4 sera donc le siRNA utilisé pour les différentes expériences étant donné qu'il est le plus efficace des siRNA n'ayant pas d'effet sur Bcl-X_S.

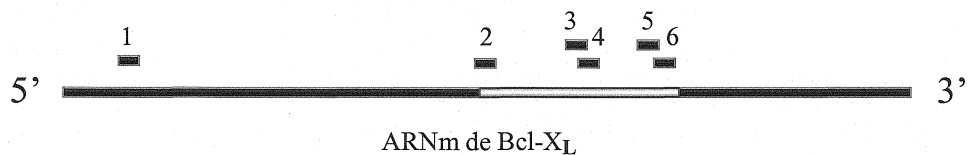


Figure 10. Cibles des différents siRNA Bcl-X_L

Les régions ciblées par les différents siRNA sur l'ARNm de Bcl-XL sont présentées. Les régions en noir représentent les séquences présentes chez les ARNm de Bcl-X_L et de Bcl-X_S tandis que la région en jaune représente la séquence présente seulement chez l'ARNm de Bcl-X_L.

Tableau 3. Positions des séquences de l'ARNm de Bcl-X_L ciblées par les différents siRNA Bcl-X_L

siRNA Bcl-X _L	Position sur l'ARNm
1	58-78
2	371-391
3	458-478
4	469-489
5	523-543
6	540-558

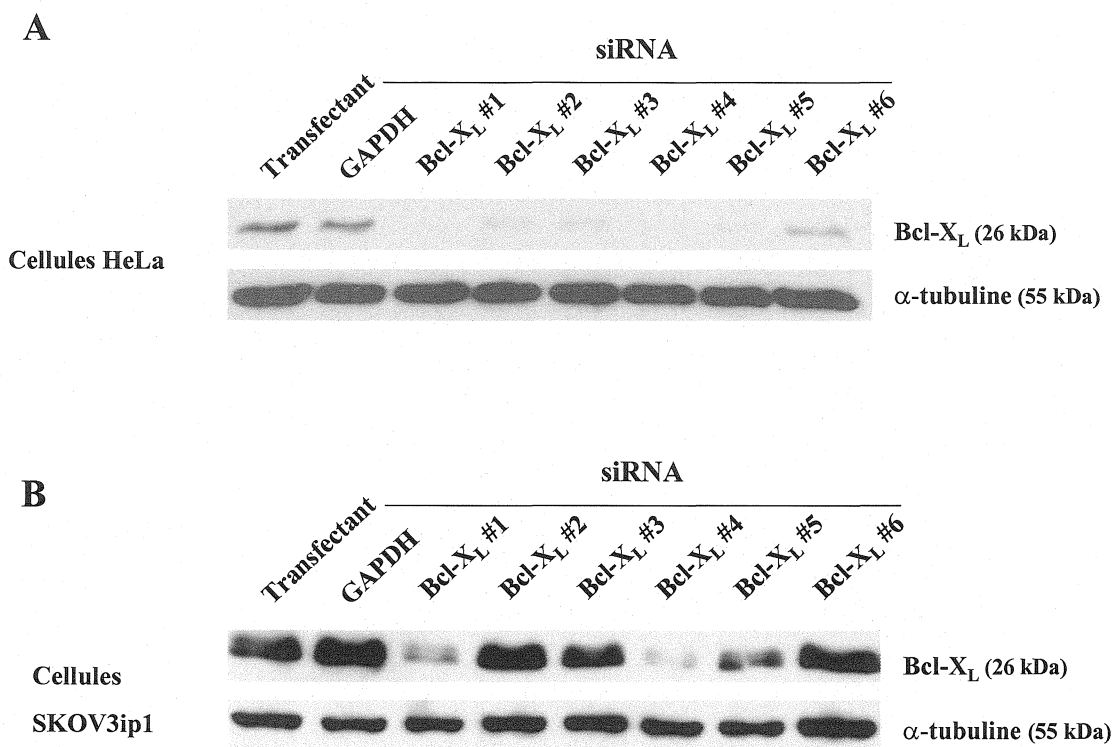


Figure 11. Validation de l'efficacité des siRNA Bcl-X_L par immunobuvardage de type Western

L'expression de Bcl-X_L a été évaluée par immunobuvardage de type Western à partir d'extraits protéiques de cellules HeLa (A) et de cellules SKOV3ip1 (B) obtenus 48 heures après la transfection avec les différents siRNA d'Ambion (50 nM) ou le traitement avec le transfectant seulement. La détection de l'α-tubuline a été effectuée comme contrôle de chargement.

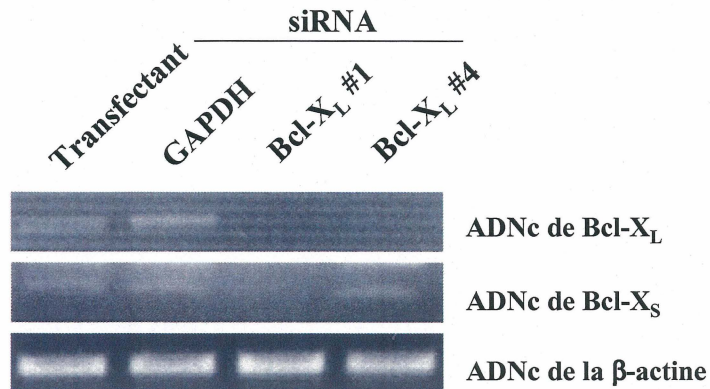


Figure 12. Validation de l'efficacité des siRNA Bcl-X_L au niveau des ARNm par RT-PCR

L'effet des siRNA Bcl-X_L #1 et #4 d'Ambion sur les niveaux des ARNm de Bcl-X_L et Bcl-X_S a été évalué par RT-PCR dans les cellules SKOV3ip1 à partir des ARN totaux extraits 48 heures après la transfection. La détection de la β-actine a été effectuée comme contrôle.

23. Validation du siRNA #4 dans les différentes lignées de cancer ovarien

Étant donné que les siRNA de la compagnie Ambion avaient une certaine toxicité intrinsèque (données non présentées), des siRNA synthétisés chimiquement par la compagnie IDT sont utilisés pour la suite de l'étude. Dans les différentes expériences, les contrôles utilisés seront toujours des cellules traitées avec seulement le transfectant et des cellules transfectées avec un siRNA ciblant l'ARNm de la luciférase. Les lignées CaOV-3, SKOV3ip1 et OVCAR-3 sont utilisées pour l'étude de Bcl-X_L via l'utilisation de siRNA. Nous utilisons ces lignées car elles sont fréquemment employées comme modèles pour l'étude des cancers ovariens et, de plus, elles expriment fortement Bcl-X_L (figure 7).

D'abord, l'efficacité du siRNA #4 a été évaluée par immunobuvardage de type Western à partir d'extraits protéiques obtenus de cellules 48 heures après leur transfection. Dans les différentes lignées, la transfection du siRNA #4 amène une diminution très importante de l'expression de Bcl-X_L (figure 13). Cette inhibition, observée par immunobuvardage de type Western est maintenue au moins pendant 5 jours dans les cellules SKOV3ip1 (données non-présentées). Pour les lignées CaOV-3 et SKOV3ip1, l'efficacité du siRNA a aussi été confirmée par immunofluorescence à partir de cellules fixées 48 heures après leur transfection. Dans le cas des cellules CaOV-3 (figure 14), comparativement aux cellules contrôles (figure 14B et 14C), le siRNA #4 (figure 14D) amène une diminution globale, mais variable selon les cellules, de la fluorescence correspondant à Bcl-X_L (en vert). En effet, on constate dans la figure 14D que la cellule située au bas (marquée par un astérisque rouge) a perdu presque totalement le signal correspondant à Bcl-X_L tandis que dans les 2 cellules du centre (marqués par des flèches rouges), la diminution est moins importante. De plus, certaines cellules ne semblent pas transfectées comme la cellule du haut (marquée par une flèche blanche) où la fluorescence est similaire à celle des cellules contrôles (figure 14B et 14C). Dans les cellules SKOV3ip1 (figure 15), le siRNA #4 amène une diminution presque totale de l'expression de Bcl-X_L dans la majorité des cellules (figure 15D). Cependant, comme dans les cellules CaOV-3, certaines cellules ne semblent pas transfectées étant donné qu'une des cellules du champ (marquée par un astérisque) a une fluorescence comparable à certaines cellules contrôles (figures 15B et 15C). Les immunobuvardages et les immunofluorescences valident l'efficacité du siRNA #4 à inhiber l'expression de Bcl-X_L dans les 3 lignées d'intérêts. Cet outil pourra donc être utilisé pour étudier les fonctions de la protéine Bcl-X_L.

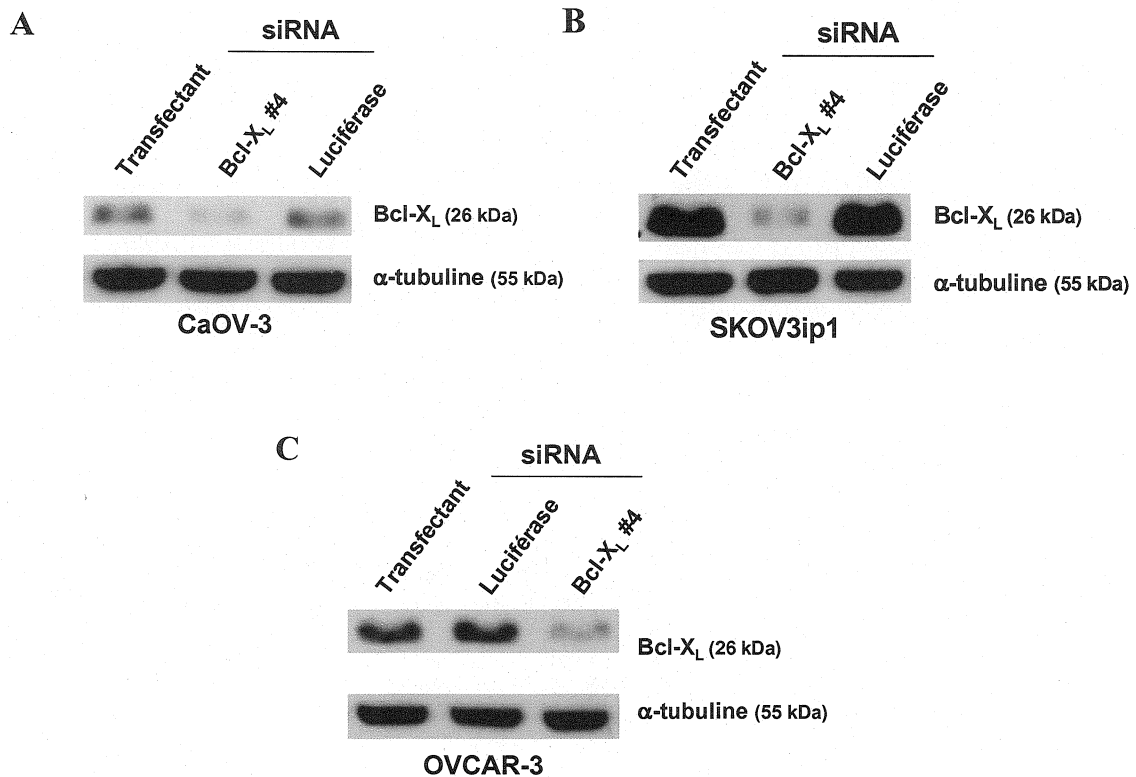


Figure 13. Effet du siRNA Bcl-X_L #4 sur l'expression de Bcl-X_L dans différentes lignées de cancer ovarien

L'expression de Bcl-X_L a été évaluée par immunobuvardage de type Western à partir d'extraits protéiques de cellules CaOV-3 (A), de cellules SKOV3ip1 (B) et de cellules OVCAR-3 (C) obtenus 48 heures après la transfection avec les siRNA d'IDT (50 nM) ou le traitement avec le transfectant seulement. La détection de l'α-tubuline a été effectuée comme contrôle de chargement.

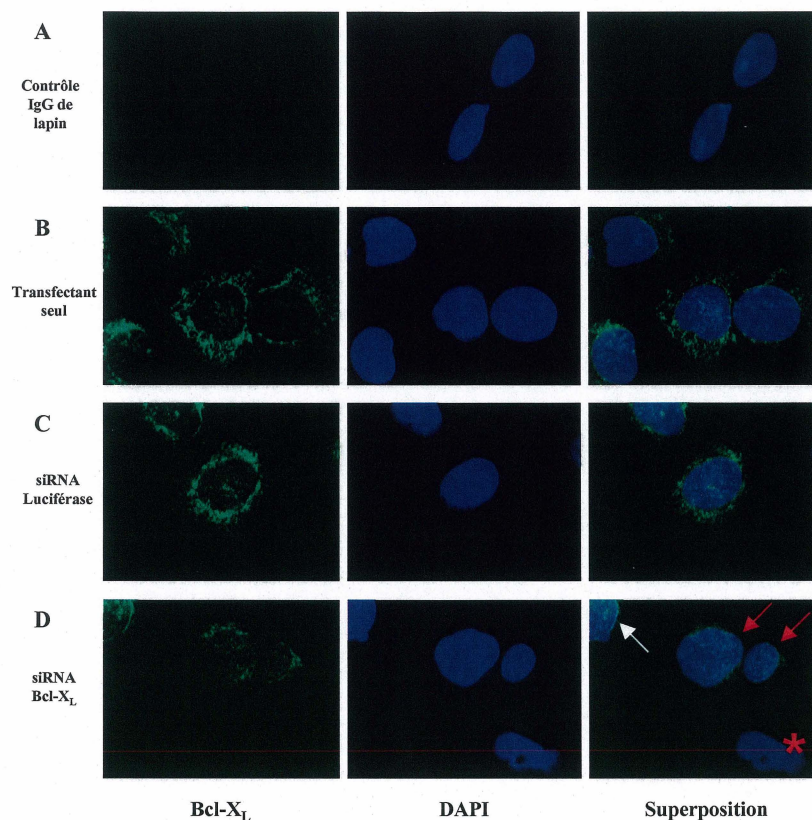


Figure 14. Effet du siRNA Bcl-X_L #4 sur l'expression de Bcl-X_L dans les cellules CaOV-3 observé par immunofluorescence

L'expression de Bcl-X_L a été évaluée par immunofluorescence (colonne de gauche sauf pour A) à partir de cellules CaOV-3 fixées 48 heures après le traitement avec le transfectant (B) ou la transfection avec les siRNA d'IDT (50 nM), soit le siRNA Luciférase (C) et le siRNA Bcl-X_L #4 (D). Le bruit de fond (A) a été obtenu via l'utilisation de IgG idiotypiques plutôt que l'anticorps anti-Bcl-X_L à partir de cellules traitées avec le transfectant seulement. La coloration des noyaux au DAPI a été effectuée (colonne du centre) pour mettre en évidence les cellules présentes dans le champ. La superposition des deux images est présentée à la colonne de droite. Grossissement de 1500X.

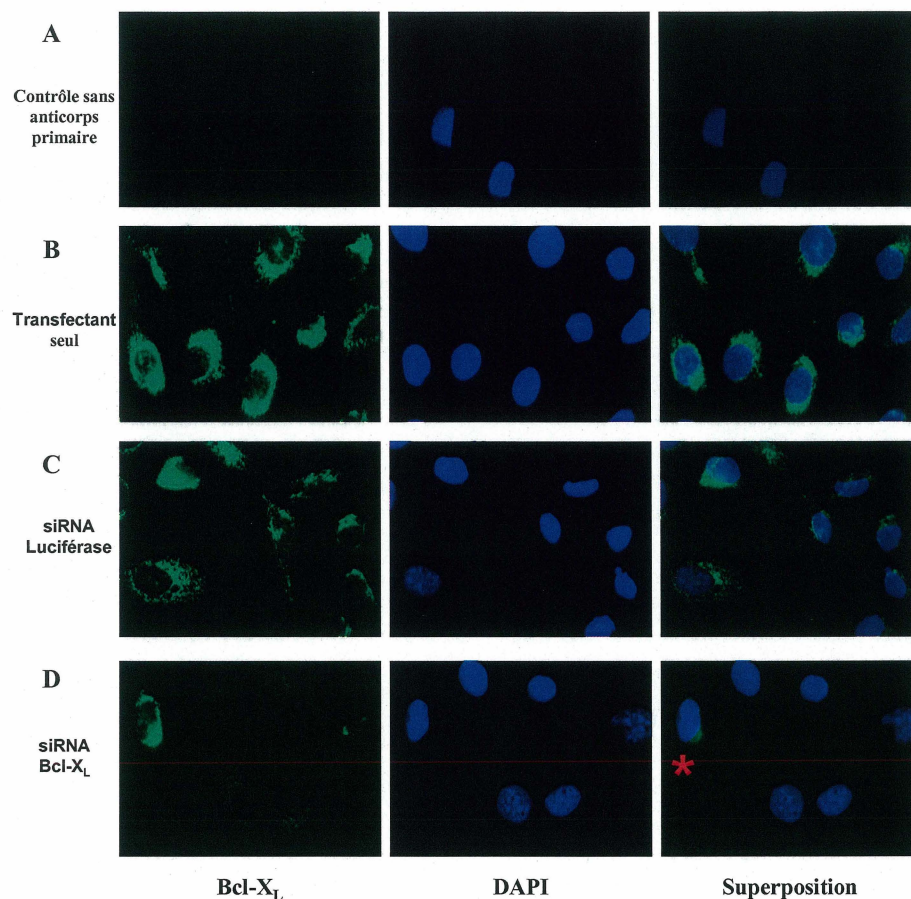


Figure 15. Effet du siRNA Bcl-X_L #4 sur l'expression de Bcl-X_L dans les cellules SKOV3ip1 observé par immunofluorescence

L'expression de Bcl-X_L a été évaluée par immunofluorescence (colonne de gauche sauf pour A) à partir de cellules SKOV3ip1 fixées 48 heures après le traitement avec le transfectant (B) ou la transfection avec les siRNA d'IDT (50 nM), soit le siRNA Luciferase (C) et le siRNA Bcl-X_L #4 (D). Le bruit de fond (A) a été obtenu via l'utilisation de seulement l'anticorps secondaire à partir de cellules traitées avec le transfectant seulement. La coloration des noyaux au DAPI a été effectuée (colonne du centre) pour mettre en évidence les cellules présentes dans le champ. La superposition des deux images est présentée à la colonne de droite. Grossissement de 1000X.

24. Validation de la surexpression de Bcl-X_L

Pour le volet surexpression de Bcl-X_L, les lignées utilisées sont les SKOV3ip1, les OVCAR-3 et les COV-2. Le vecteur permettant la surexpression de Bcl-X_L est présenté dans la figure 16. Dans toutes les expériences de surexpression, les contrôles utilisés sont les cellules parentales et des clones transfectés stablement avec le vecteur pcDNA3 sans insert. Dans le cas des cellules SKOV3ip1, la production des clones stables surexprimant Bcl-X_L a échoué. D'abord, il a été impossible d'obtenir des colonies isolées et la population résultante ne surexprimait Bcl-X_L que très faiblement (données non-présentées). Dans le cas des cellules OVCAR-3 et COV-2, une multitude de clones indépendants ont été produits. Pour ces deux lignées, deux clones surexprimant Bcl-X_L ont été sélectionnés pour effectuer les différentes expériences. Les niveaux d'expression de Bcl-X_L dans ces clones sont présentés en figure 17A pour les clones OVCAR-3 et en figure 17B pour les clones COV-2. Malgré la validation de la surexpression, aucune autre expérience n'a été accomplie avec les clones COV-2. La localisation de la protéine dans les clones OVCAR-3 a été observée par immunofluorescence afin de s'assurer qu'elle soit localisée convenablement pour qu'elle soit en mesure d'effectuer ces fonctions. En comparant les clones surexprimant Bcl-X_L au contrôle parental (figure 18B) et au contrôle pcDNA3 (figure 18C), on constate que le signal correspondant à Bcl-X_L (en vert) est beaucoup plus intense dans les clones #4 (figure 18D) et #6 (figure 18E) et que la distribution de ce signal leur est similaire. Ces résultats indiquent que, dans les clones #4 et #6, la localisation de Bcl-X_L est convenable et confirment sa surexpression.

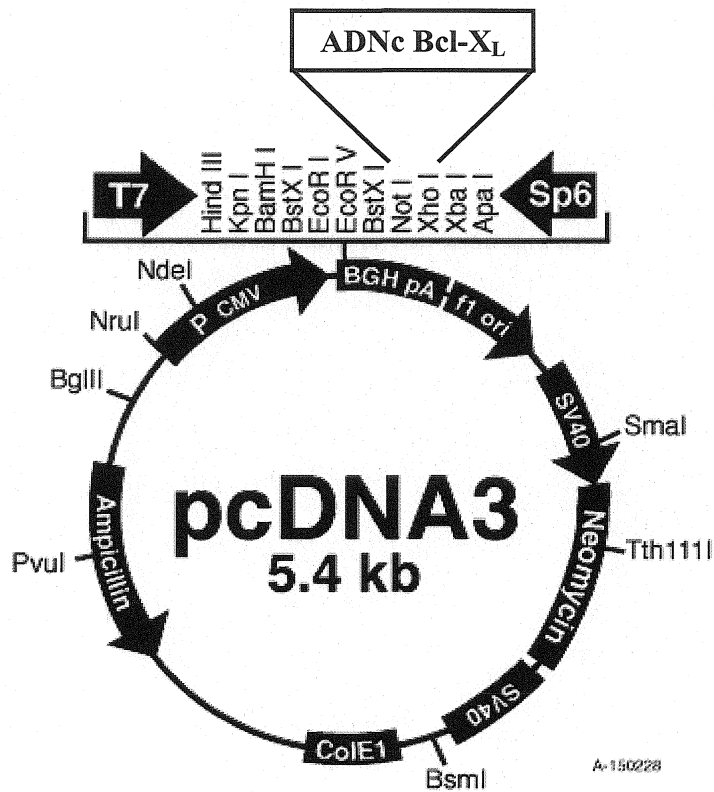


Figure 16. Vecteur pcDNA3 / Bcl-X_L #4 utilisé pour la surexpression de Bcl-X_L

Le vecteur pcDNA3 dans lequel l'ADNc de Bcl-X_L a été inséré entre les sites Not I et Xho I. Cette construction est utilisée pour surexprimer Bcl-X_L dans différentes lignées cellulaires.

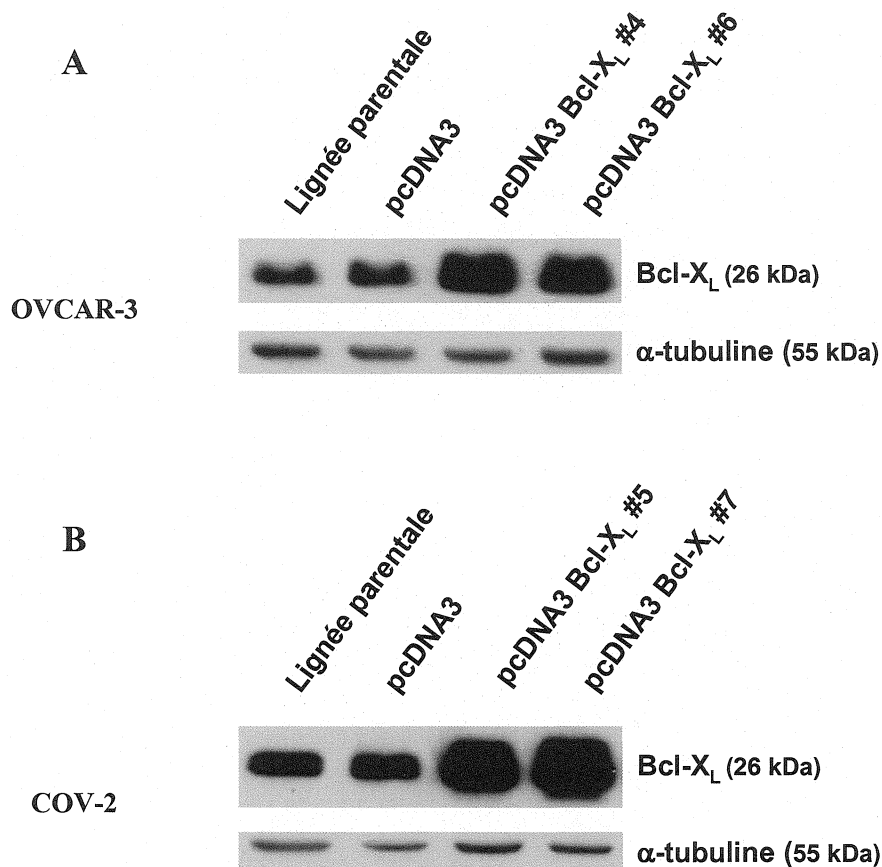


Figure 17. Surexpression de Bcl-X_L dans les lignées OVCAR-3 et COV-2

L'expression de Bcl-X_L a été évaluée par immunobuvardage de type Western à partir d'extraits protéiques de cellules OVCAR-3 (A) et de cellules CaOV-3 (B). L'expression de la protéine dans des clones transfectés avec le vecteur pcDNA3 Bcl-X_L est comparée à l'expression dans la lignée parentale et dans un clone transfecté avec le vecteur vide. La détection de l'α-tubuline a été effectuée comme contrôle de chargement.

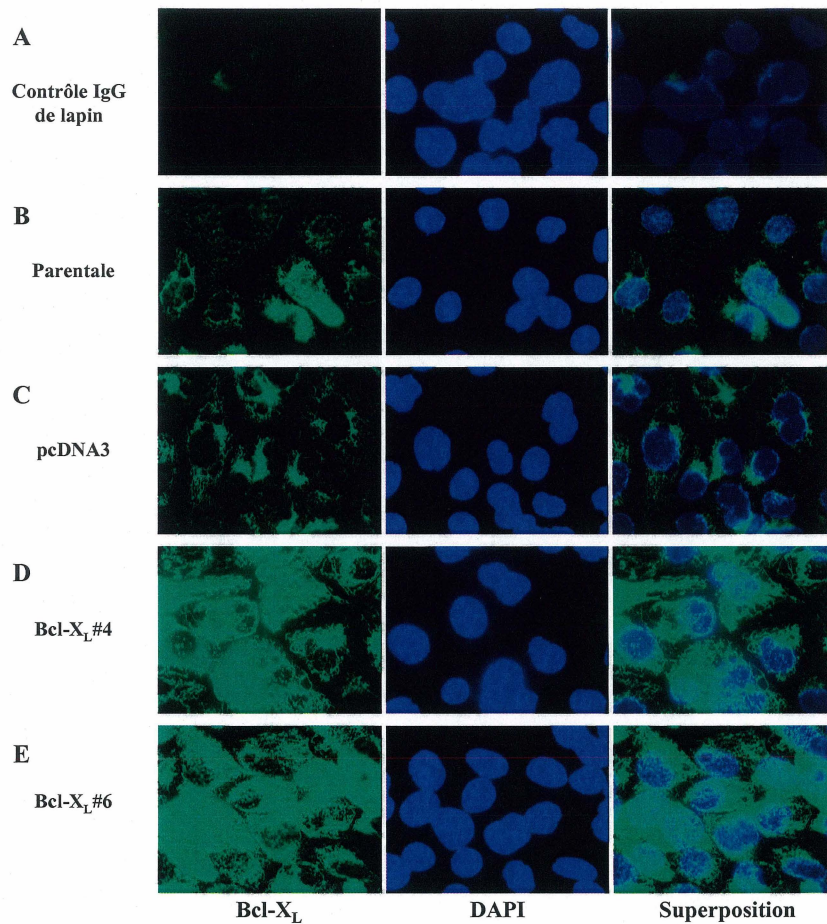


Figure 18. Surexpression et localisation de Bcl-X_L dans la lignée OVCAR-3 observées par immunofluorescence

L'expression et la localisation de Bcl-X_L ont été évaluées par immunofluorescence (colonne de gauche sauf pour A) dans la lignée parentale OVCAR-3 (B), dans le clone pcDNA3 (C) et dans les clones pcDNA3 Bcl-X_L #4 (D) et #6 (E). Le bruit de fond (A) a été obtenu via l'utilisation de IgG idiotypiques plutôt que l'anticorps anti-Bcl-X_L à partir des cellules OVCAR-3 parentales. La coloration des noyaux au DAPI a été effectuée (colonne du centre) pour mettre en évidence les cellules présentes dans le champ. La superposition des deux images est présentée à la colonne de droite. Grossissement de 1000X.

25. Effet de la perte de Bcl-X_L sur la prolifération

D'abord, nous avons mesuré l'effet de la perte de Bcl-X_L sur la prolifération des différentes lignées cellulaires en condition normale de culture à l'aide de l'essai XTT. Dans les cas des cellules CaOV-3, la prolifération des cellules transfectées avec le siRNA Bcl-X_L #4, donc les cellules où l'expression de Bcl-X_L est inhibée, est ralentie à celle des cellules contrôles (figure 19A). Cette différence statistiquement significative (test student; $p < 0,0005$) est observée dès le premier jour et est maintenue aux différents temps. Pour confirmer cette observation, la coloration des cellules vivantes avec le cristal violet a été effectuée sur les cellules, 7 jours après leur transfection. Comparativement aux deux contrôles, beaucoup moins de cellules traitées avec le siRNA Bcl-X_L #4 ont été colorées par le cristal violet (figure 19B). Ces deux expériences confirment que la perte de Bcl-X_L amène une diminution de la prolifération des cellules CaOV-3. De plus, beaucoup plus de cellules probablement mortes flottaient dans les puits correspondant aux cellules transfectées avec le siRNA Bcl-X_L #4 que dans les puits contrôles. La perte de Bcl-X_L semble donc induire la mort de cellules CaOV-3. Dans le cas des cellules SKOV3ip1, aucune différence dans prolifération n'est observée par l'essai XTT (figure 20A). Cependant, la densité optique maximale est atteinte au jour 5 et, par la suite, la densité optique chute. Cette chute de la densité optique pourrait être due principalement à deux facteurs soit à l'atteinte de la confluence ou à de la mort cellulaire. Premièrement, l'atteinte de la confluence inhibe la prolifération cellulaire et les cellules non-prolifératives ont généralement une activité métabolique diminuée ce qui entraîne une chute de la mesure de densité optique par XTT. Deuxièmement, l'apoptose et la nécrose entraînent une diminution du nombre de cellules présentes et ainsi une diminution de la

densité optique par XTT. Malheureusement, l'essai XTT ne permet pas de discriminer ces deux facteurs. À 7 jours post-transfection, la quantité de cellules vivantes colorées au cristal violet est beaucoup plus importante dans les cellules contrôles que dans les cellules transfectées avec le siRNA Bcl-X_L #4 (figure 20B). De plus, les puits correspondant aux cellules traitées avec le siRNA Bcl-X_L #4 contenaient beaucoup plus de cellules flottantes que les puits contrôles. Ces observations suggèrent que la perte de Bcl-X_L entraîne la mort de cellules SKOV3ip1. La diminution de la densité optique par XTT sembleraient donc être causée par une atteinte de confluence pour les cellules contrôles et à de la mort cellulaire pour les cellules traitées avec le siRNA Bcl-X_L #4. Une mesure directe de l'apoptose à différents temps suite à la transfection aurait permis de vérifier cette hypothèse. Finalement, dans le cas des cellules OVCAR-3, la perte de l'expression de Bcl-X_L n'affecte pas la prolifération cellulaire mesurée par XTT (figure 21). Malheureusement, la coloration au cristal violet n'a pas été effectuée avec cette lignée. Cependant, malgré un tapis cellulaire comparable, il semblait y avoir plus de cellules possiblement mortes qui flottaient dans les puits où l'expression de Bcl-X_L était inhibée. La perte de l'expression de Bcl-X_L semble donc induire de la mort cellulaire dans les 3 lignées mais de façon plus importante dans les cellules CaOV-3.

26. Effet de la perte de Bcl-X_L sur la survie en condition adhérente

La perte d'expression de Bcl-X_L semble amener de la mort cellulaire, possiblement par apoptose, dans les 3 lignées de cancer ovarien étudiées. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons mesuré l'enrichissement des nucléosomes au cytoplasme, donc l'induction de l'apoptose, à l'aide de l'essai ELISA cell death detection. L'induction

de l'apoptose ainsi mesurée est augmentée dans les lignées étudiées lors de la perte d'expression de Bcl-X_L (figure 22) et ce, de façon statistiquement significative (test student; CaOV-3 et SKOV3ip1: $p < 0,005$; OVCAR-3: $p < 0,05$). De plus, l'induction de l'apoptose dans le temps a été mesurée pour les cellules CaOV-3 (figure 23). Cette expérience démontre que l'induction de l'apoptose dans les cellules CaOV-3 se fait très rapidement suite à la perte de l'expression de Bcl-X_L.

27. Effet de la perte de Bcl-X_L sur la cascade apoptotique en condition adhérente

Étant donné que la perte de l'expression de Bcl-X_L induit l'apoptose, nous avons vérifié les conséquences de cette inhibition sur certaines protéines impliquées dans la cascade apoptotique dans les lignées SKOV3ip1 et CaOV-3. Pour ce faire, des extraits protéiques obtenus de cellules 3 jours post-transfection ont été utilisés pour accomplir des immunobuvardages de type Western. D'abord, dans les cas des cellules SKOV3ip1 (figure 24A), la transfection du siRNA Bcl-X_L #4 amène comme prévu une chute très importante du niveau d'expression de Bcl-X_L. L'intensité de la bande correspondant à la pro-caspase 3 est relativement similaire dans les différentes conditions mais elle semble légèrement plus faible dans les cellules traitées avec le siRNA Bcl-X_L #4 (la diminution de la pro-caspase 3 est causée fort probablement par son clivage en caspase 3 active). De plus, le PARP, un substrat de la caspase 3, est clivé seulement dans les cellules traitées avec le siRNA Bcl-X_L #4. Dans le cas des cellules CaOV-3 (figure 24B), la transfection du siRNA Bcl-X_L #4 cause une diminution importante de l'expression de Bcl-X_L mais aussi une diminution de la pro-caspase 3 qui est corrélée avec un clivage marqué du PARP. Ces observations suggèrent que la perte de Bcl-X_L amène l'activation de la cascade

apoptotique dans les lignées SKOV3ip1 et CaOV-3 et que cette activation, à 3 jours post-transfection, serait plus importante dans les cellules CaOV-3. Ces résultats confirment que la perte de Bcl-X_L induit de l'apoptose mais de façon différente selon les différentes lignées cellulaires. Ceci suggère que la fonction de Bcl-X_L est non-équivalente d'une lignée à l'autre dans la régulation de l'apoptose.

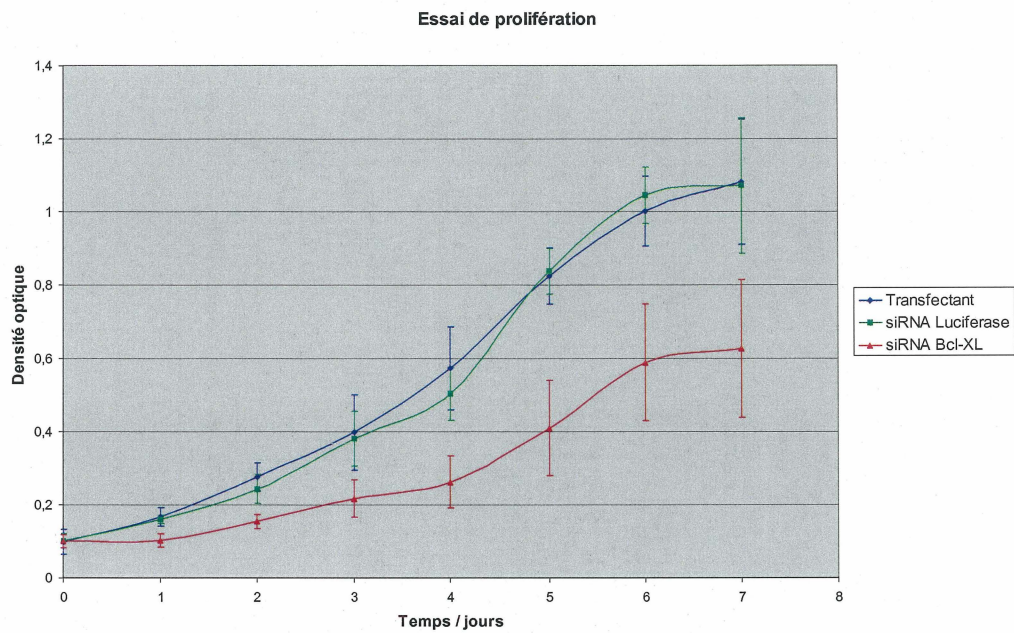
A**B**

Figure 19. Effet de la perte de Bcl-X_L sur la prolifération des cellules CaOV-3

L'effet de la perte de l'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 a été évalué sur la prolifération des cellules CaOV-3 par un essai de prolifération XTT (A) et par la coloration des cellules vivantes à 7 jours post-transfection avec le cristal violet (B). Dans le cas l'essai XTT, les cellules ont étéensemencées 24 heures après leur transfection. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 10 lectures provenant de deux expériences indépendantes.

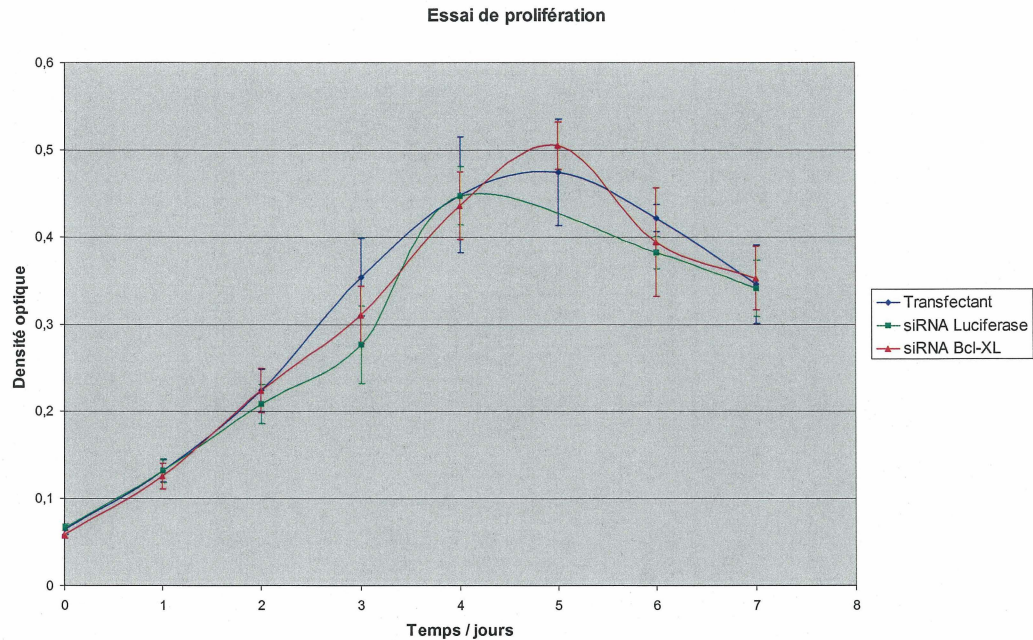
A**B**

Figure 20. Effet de la perte de Bcl-X_L sur la prolifération des cellules SKOV3ip1

L'effet de la perte de l'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 a été évalué sur la prolifération des cellules SKOV3ip1 par un essai de prolifération XTT (A) et par la coloration des cellules vivantes à 7 jours post-transfection avec le cristal violet (B). Dans le cas l'essai XTT, les cellules ont étéensemencées 24 heures après leur transfection. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 10 lectures provenant de deux expériences indépendantes.

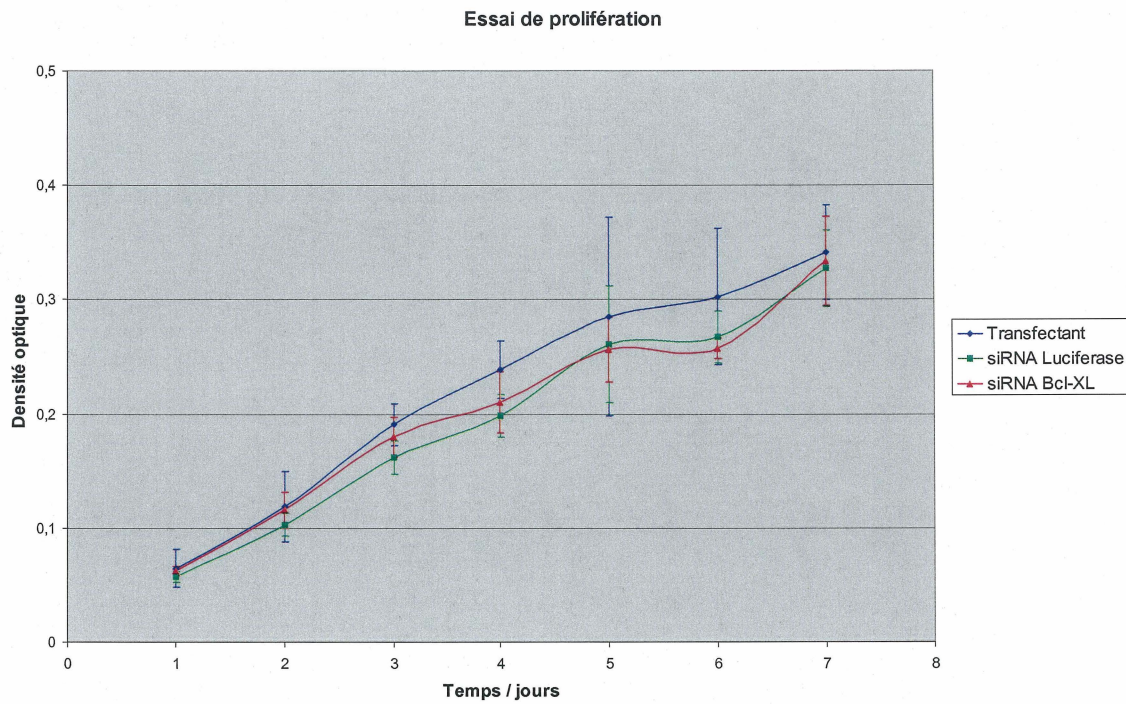


Figure 21. Effet de la perte de Bcl-X_L sur la prolifération des cellules OVCAR-3

L'effet de la perte de l'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 a été évalué sur la prolifération des cellules OVCAR-3 par un essai de prolifération XTT. Les cellules ont étéensemencées 24 heures après leur transfection. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 10 lectures provenant de deux expériences indépendantes.

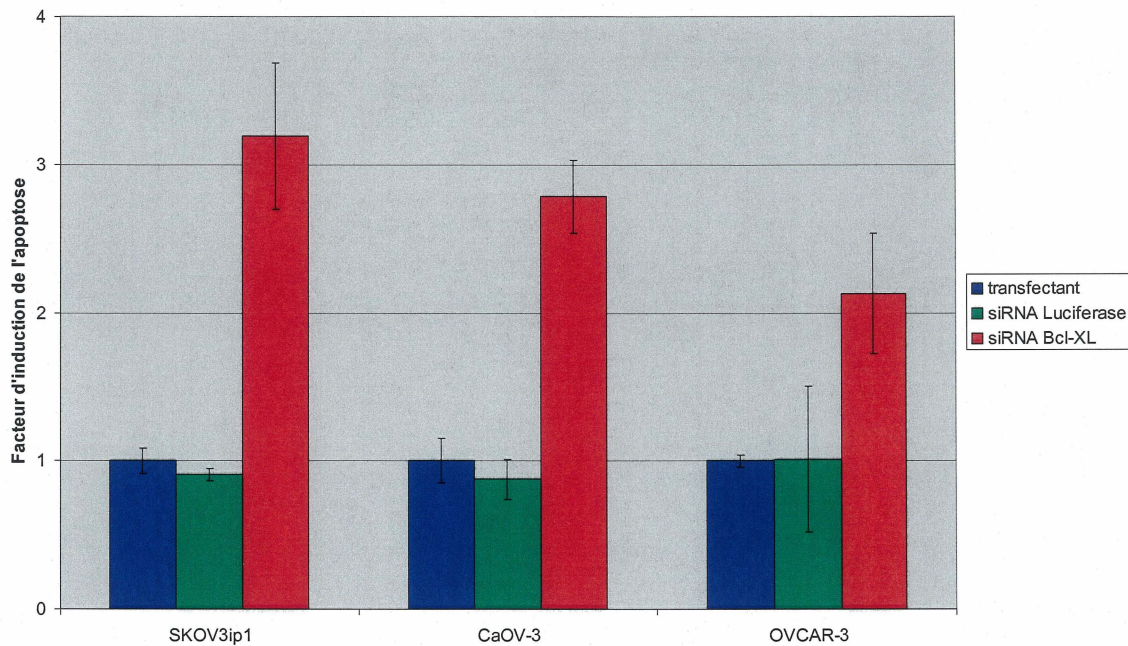


Figure 22. Induction de l'apoptose en condition normale de culture causée par la perte de Bcl-X_L

L'effet de la perte de l'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 a été évalué au niveau de l'induction de l'apoptose par l'essai ELISA cell death detection dans les cellules SKOV3ip1, CaOV-3 et OVCAR-3 en condition adhérente. L'essai a été effectué 96 heures après la transfection des cellules. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 4 lectures provenant de deux expériences indépendantes.

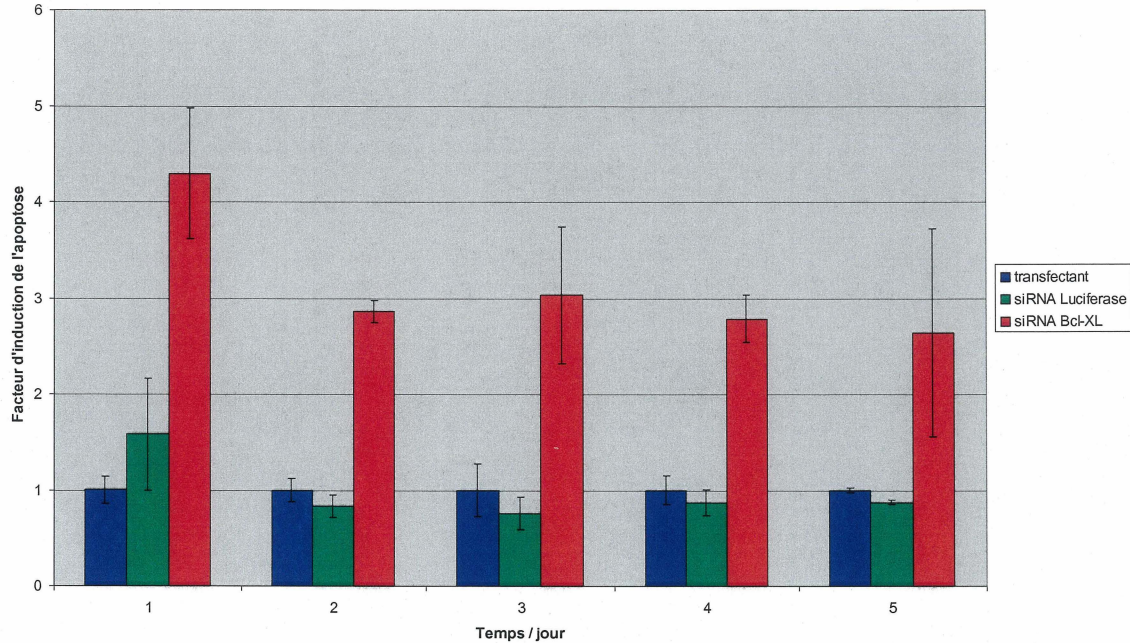


Figure 23. Induction de l'apoptose en fonction du temps en condition normale de culture causée par la perte de Bcl-X_L chez les cellules CaOV-3

L'effet de la perte de l'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 a été évalué au niveau de l'induction de l'apoptose dans le temps par l'essai ELISA cell death detection chez les cellules CaOV-3. L'essai a été débuté 48 heures après la transfection des cellules (t=1). Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 10 lectures provenant de deux expériences indépendantes.

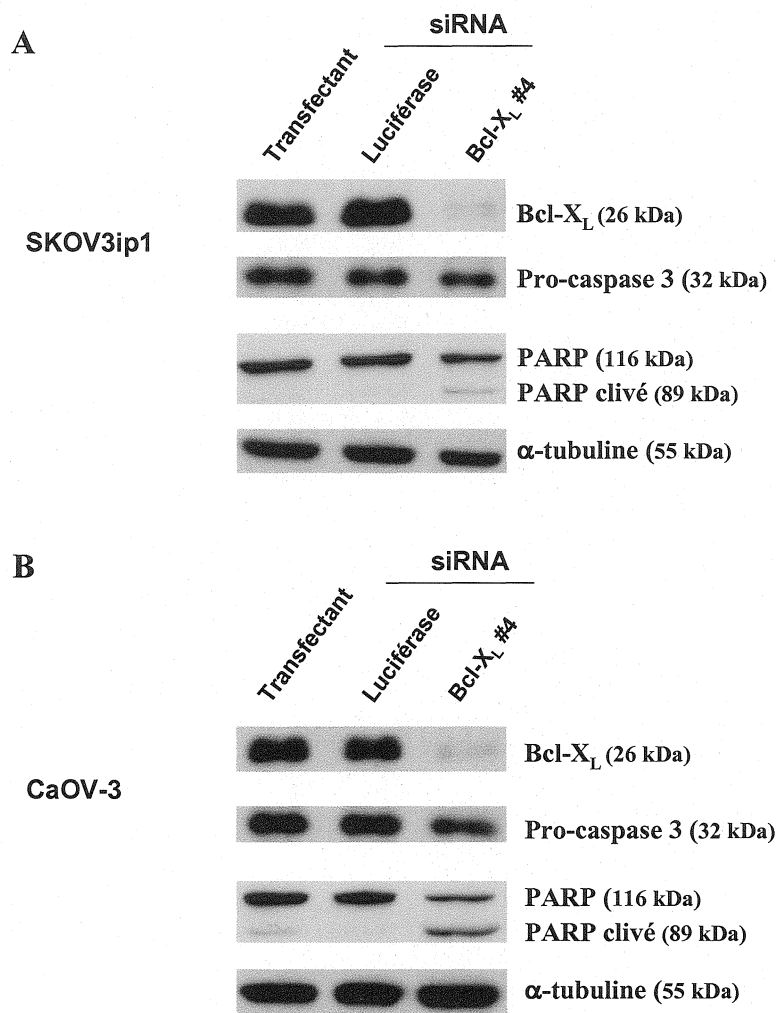


Figure 24. Induction de la cascade apoptotique causée par la perte de Bcl-X_L dans les lignées SKOV3ip1 et CaOV-3

Les niveaux de Bcl-X_L, de la pro-caspase 3 et le clivage du PARP ont évaluée par immunobuvardage de type Western à partir d'extraits protéiques de cellules SKOV3ip1 (A) et de cellules CaOV-3 (B) obtenus 72 heures après la transfection avec les siRNA (50 nM) ou le traitement avec le transfectant seulement. La détection de l' α -tubuline a été effectuée comme contrôle de chargement.

28. Effet de la surexpression de Bcl-X_L sur la prolifération

L'effet de la surexpression de Bcl-X_L sur la prolifération a été évalué dans les cellules OVCAR-3 par un essai de prolifération XTT. La prolifération des deux clones indépendants est diminuée par rapport au contrôle parental et au contrôle pcDNA3 (figure 25). Cette diminution de prolifération ne semble pas être due à de la mort cellulaire étant donné que la quantité de cellules flottantes était similaire dans les contrôles et les clones. Cette différence serait possiblement due à une progression moins rapide dans le cycle cellulaire chez les cellules surexprimant Bcl-X_L tel que démontré récemment pour Bcl-2 (BÉLANGER *et al.*, 2005).

29. Effet de la perte de Bcl-X_L sur la sensibilité à l'anoïkose

Le rôle de Bcl-X_L sur la sensibilité à l'anoïkose a été évalué dans les lignées SKOV3ip1 et OVCAR-3 en mesurant avec l'essai ELISA cell death detection l'induction de l'apoptose de cellules 3 jours en suspension par rapport à des cellules adhérentes. Comme le démontre la figure 26, la culture en suspension induit l'apoptose dans les cellules SKOV3ip1. De plus, la perte de Bcl-X_L augmente la sensibilité des cellules SKOV3ip1 à l'anoïkose de façon statistiquement significative (test student; $p < 0,05$). De plus, le facteur d'induction de l'apoptose causée par la suspension n'est pas seulement un effet additif de l'induction de l'apoptose causée par la perte de Bcl-X_L et de celle causée par la suspension. Dans le cas des cellules OVCAR-3 (figure 27), la culture des cellules contrôles en suspension n'induit pas d'apoptose par rapport aux cellules contrôles adhérentes donc les cellules OVCAR-3 seraient totalement résistantes à l'anoïkose. De plus, le même facteur d'induction de l'apoptose est obtenu pour les cellules traitées avec

le siRNA Bcl-X_L #4 qu'elles soient en condition adhérente ou en suspension donc la perte d'expression de Bcl-X_L ne rend donc pas les cellules OVCAR-3 sensibles à l'anoïkose. Bcl-X_L a donc des effets différents sur la survie en suspension dans différentes lignées de cancer ovarien.

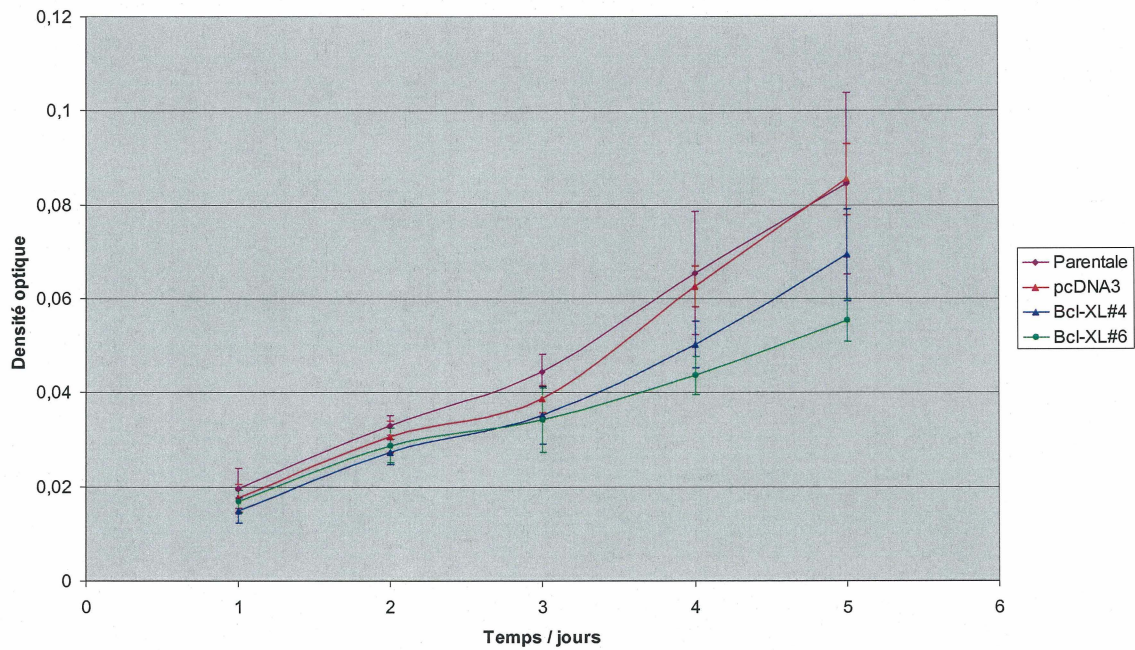


Figure 25. Effet de surexpression de Bcl-X_L sur la prolifération des cellules OVCAR-3

L'effet de la surexpression de Bcl-X_L a été évalué sur la prolifération des cellules OVCAR-3 par un essai de prolifération XTT. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 10 lectures provenant de deux expériences indépendantes.

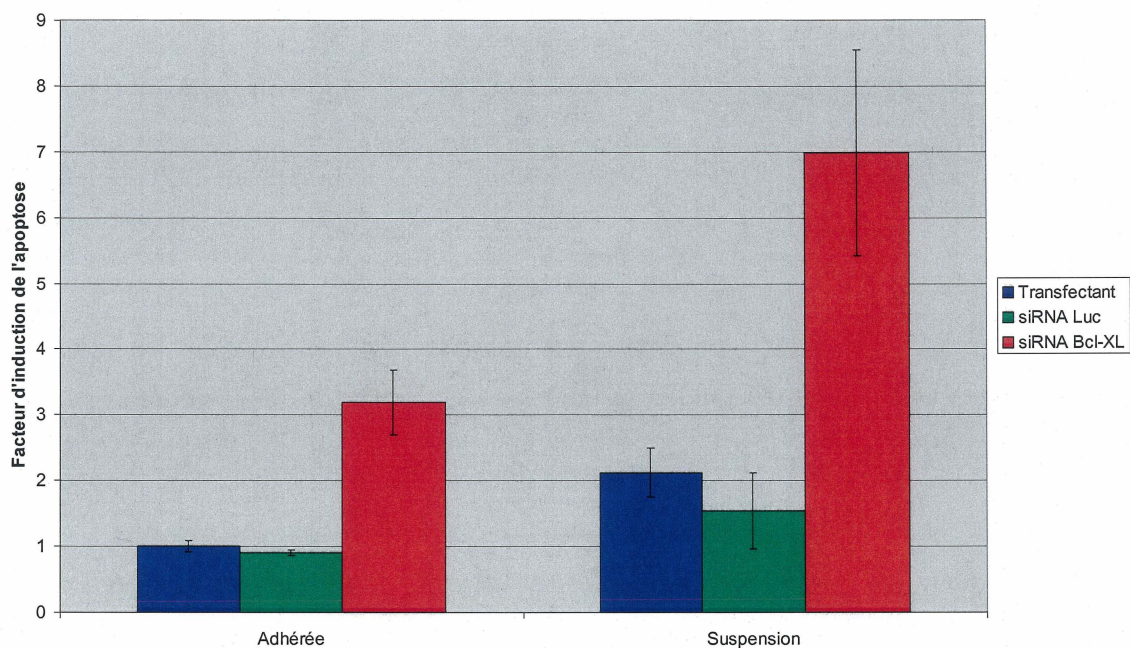


Figure 26. Potentialisation de l'induction de l'anoïkose chez les cellules SKOV3ip1 causée par la perte de Bcl-X_L

L'effet de la perte de l'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 a été évalué au niveau de l'induction de l'apoptose par l'essai ELISA cell death detection dans les cellules SKOV3ip1 en condition adhérente et en suspension 72 heures. L'essai a été effectué 96 heures après la transfection des cellules. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 4 lectures provenant de deux expériences indépendantes.

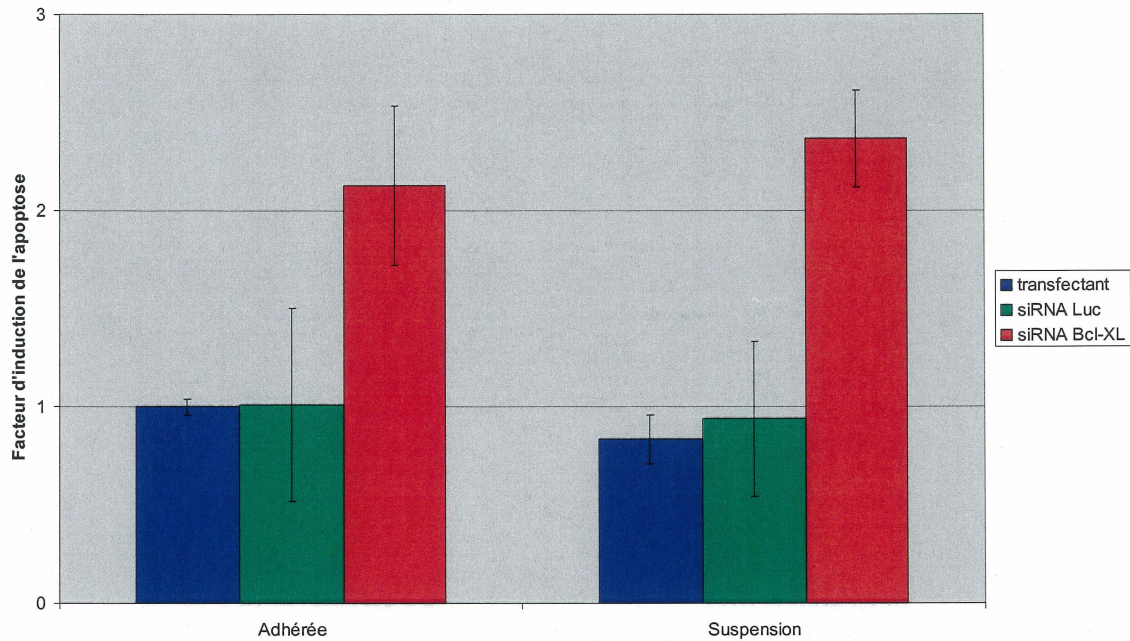


Figure 27. Absence de sensibilisation à l'anoïkose chez les cellules OVCAR-3 causée par la perte de Bcl-X_L

L'effet de la perte de l'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 a été évalué au niveau de l'induction de l'apoptose par l'essai ELISA cell death detection dans les cellules OVCAR-3 en condition adhérente et en suspension 72 heures. L'essai a été effectué 96 heures après la transfection des cellules. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 4 lectures provenant de deux expériences indépendantes.

30. Effet de la perte de Bcl-X_L sur la chimiosensibilité

La résistance à la chimiothérapie étant un problème extrêmement important dans les cancers ovariens, nous avons évalué l'effet de la perte de l'expression de Bcl-X_L sur la sensibilité au cisplatine et au taxol ainsi que sur l'apoptose induite par ces drogues. Des essais XTT ont été effectués à 24 et 48 heures après le début du traitement avec le cisplatine ou le taxol afin d'évaluer la survie des différentes cellules à ces drogues. Afin d'être en mesure d'observer l'effet de Bcl-X_L sur la résistance à ces drogues, les concentrations utilisées représentaient des doses diminuant la survie à environ 50% à 24 ou 48 heures. D'abord, l'inhibition de l'expression de Bcl-X_L diminue de façon statistiquement significative (test Student; $p < 0,05$) la survie des cellules CaOV-3 en réponse au cisplatine (figure 28A) et au taxol (figure 28B) après 24 et 48 heures de traitement. Des effets similaires sont observés dans les cellules SKOV3ip. En effet, dans ces cellules, la perte de Bcl-X_L diminue de façon statistiquement significative (test Student; $p < 0,05$) la survie au cisplatine après 24 et 48 heures de traitement (figure 29A) et, de façon moins importante, celle du taxol après 48 heures de traitement (figure 29B). De plus, l'induction de l'apoptose a aussi été mesurée avec l'essai ELISA cell death detection dans les cellules SKOV3ip1 en réponse à un traitement de 48 heures avec les drogues. La figure 30A démontre que le traitement au cisplatine induit fortement l'apoptose des cellules SKOV3ip1 et que la perte de l'expression de Bcl-X_L augmente énormément cette induction de l'apoptose (statistiquement significatif; test Student; $p < 0,005$). Pour le taxol, une très grande variabilité inter-expérience est obtenue donc les résultats de ces expériences sont présentés séparément (figure 30B). Cependant, la même tendance est présente dans les deux expériences. En effet, le traitement au taxol induit

l'apoptose des cellules SKOV3ip1 et la perte d'expression de Bcl-X_L augmente cette induction de l'apoptose. Cependant, l'augmentation de l'induction de l'apoptose est beaucoup plus importante pour le cisplatine que pour le taxol. La perte de Bcl-X_L potentialise aussi l'action du cisplatine et du taxol dans la lignée OVCAR-3 (figure 31). En effet, la perte de l'expression de la protéine diminue de façon statistiquement significative (test Student; $p < 0,0005$) la survie de ces cellules face au cisplatine (figure 31A) et au taxol (figure 31B) à 24 et 48 heures. De plus, cette perte d'expression augmente l'induction de l'apoptose en réponse à un traitement de 48 heures au cisplatine ou au taxol (figure 32; différences statistiquement significatives; test Student; $p < 0,005$).

31. Effet de la surexpression de Bcl-X_L sur la chimiosensibilité

L'effet de la surexpression de Bcl-X_L dans les cellules OVCAR-3 sur la sensibilité au cisplatine et au taxol a été évalué par XTT et par un essai d'iodure de propidium en cytométrie de flux. D'abord, la surexpression de Bcl-X_L augmente la survie des deux clones au taxol (figure 33B) seulement à 48 heures (statistiquement significatif; test student; $p < 0,001$) mais n'a aucun effet sur leur survie au cisplatine (figure 33A). Le pourcentage de cellules apoptotiques a été mesuré dans ces cellules suite à un traitement de 48 heures au cisplatine (figure 34A) et de 72 heures au taxol (figure 34B). Dans les deux cas, les mêmes tendances inter-expériences sont obtenues mais aussi une grande variabilité. Les résultats des deux expériences sont donc présentés séparément. Le pourcentage de cellules apoptotiques induit par le cisplatine (figure 34A) et le taxol (figure 34B) est beaucoup plus faible dans les clones surexprimant Bcl-X_L que dans les cellules

contrôles. La surexpression de Bcl-X_L semble donc protéger les cellules OVCAR-3 contre le cisplatine et le taxol.

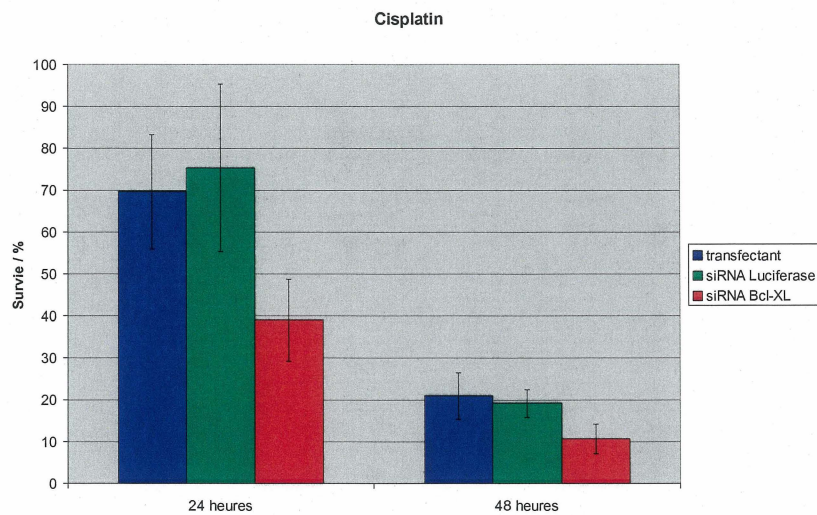
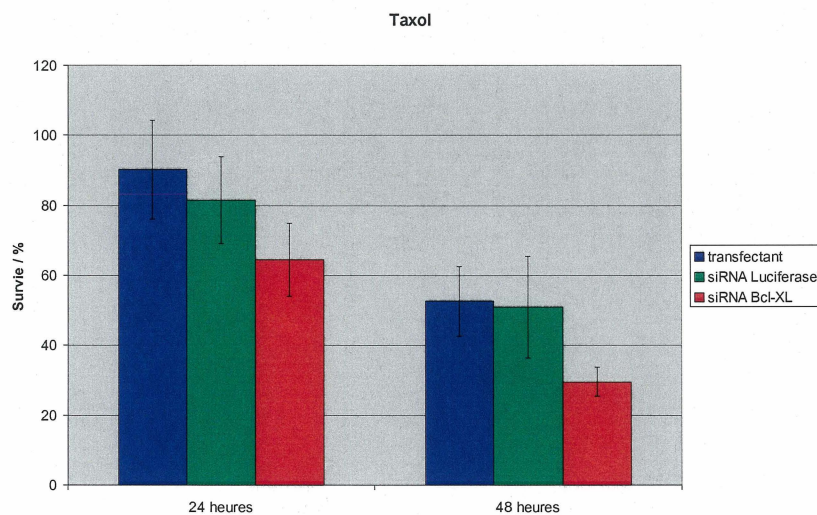
A**B**

Figure 28. Sensibilisation au cisplatine et au taxol mesurée par XTT des cellules CaOV-3 causée par la perte Bcl-X_L

L'effet de la perte d'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 sur la sensibilité au cisplatine (A) et au taxol (B) des cellules CaOV-3 a été évalué par un essai de survie XTT. Les traitements de 24 et 48 heures avec le cisplatine (5 µg/mL) ou le taxol (15 nM) ont débutés 48 heures après la transfection des cellules. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 9 lectures provenant de trois expériences indépendantes.

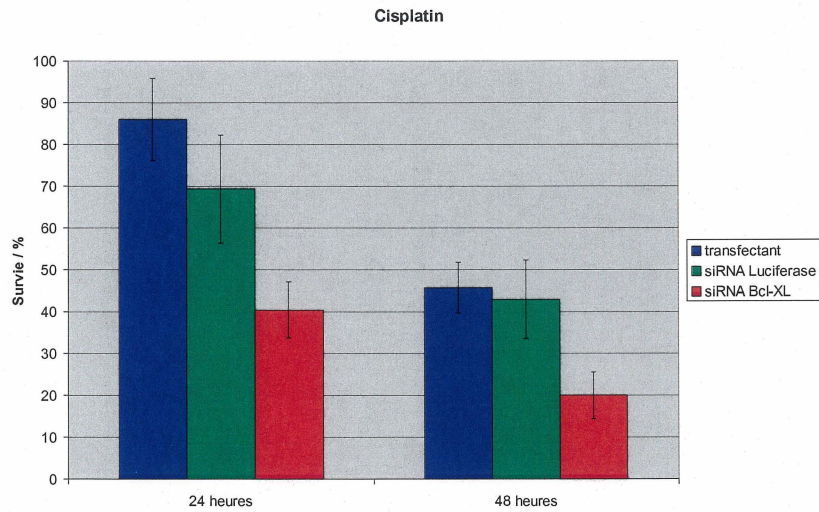
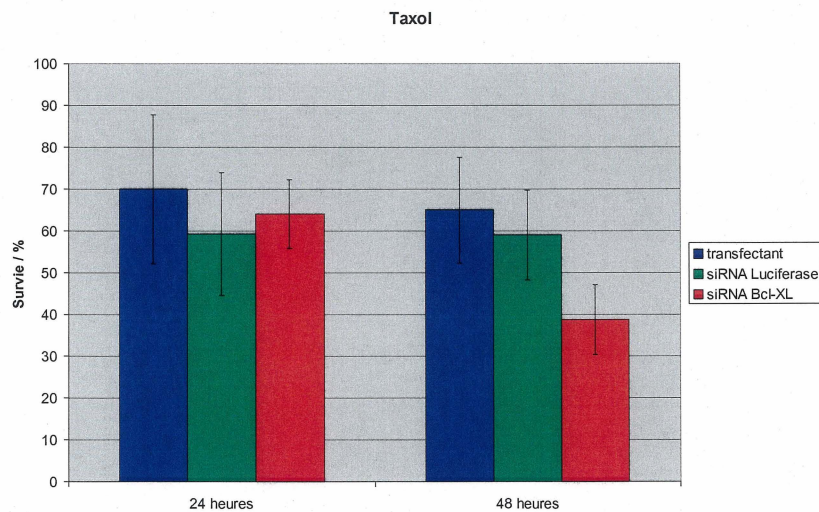
A**B**

Figure 29. Sensibilisation au cisplatine et au taxol mesurée par XTT des cellules SKOV3ip1 causée par la perte Bcl-X_L

L'effet de la perte d'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 sur la sensibilité au cisplatine (A) et au taxol (B) des cellules SKOV3ip1 a été évalué par un essai de survie XTT. Les traitements de 24 et 48 heures avec le cisplatine (5 µg/mL) ou le taxol (15 nM) ont débutés 48 heures après la transfection des cellules. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 9 lectures provenant de trois expériences indépendantes.

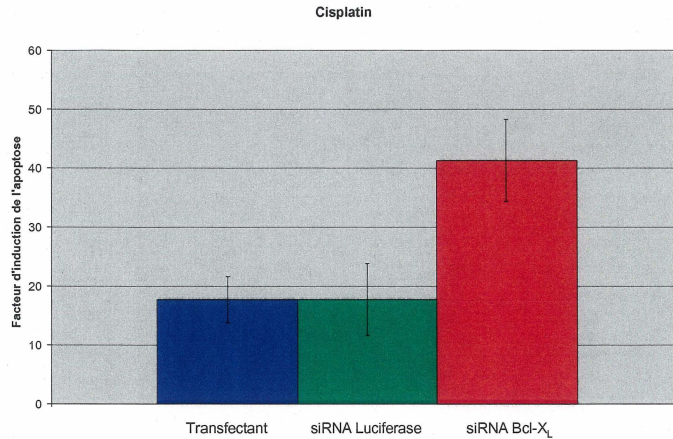
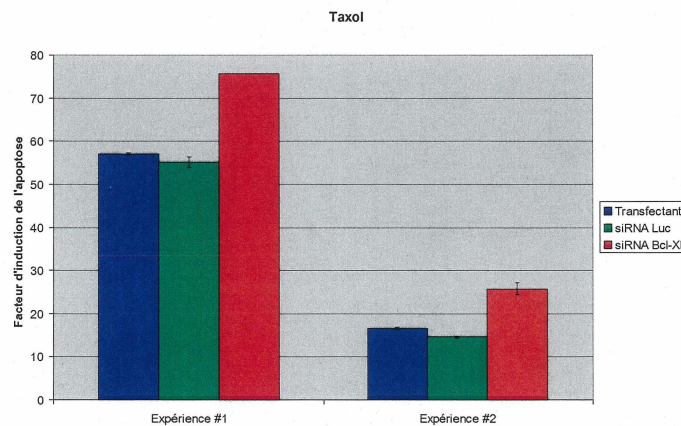
A**B**

Figure 30. Sensibilisation au cisplatine et au taxol mesurée par ELISA des cellules SKOV3ip1 causée par la perte Bcl-X_L

L'effet de la perte d'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 sur la sensibilité au cisplatine (A) et au taxol (B) des cellules SKOV3ip1 a été évalué par la mesure de l'induction de l'apoptose par l'essai ELISA. Les traitements 48 heures avec le cisplatine (5 µg/mL) ou le taxol (15 nM) ont débuté 48 heures après la transfection des cellules. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 4 lectures provenant de deux expériences indépendantes pour le cisplatine tandis que pour le taxol, les deux expériences indépendantes sont présentées séparément avec l'écart type obtenu sur les deux lectures par expérience.

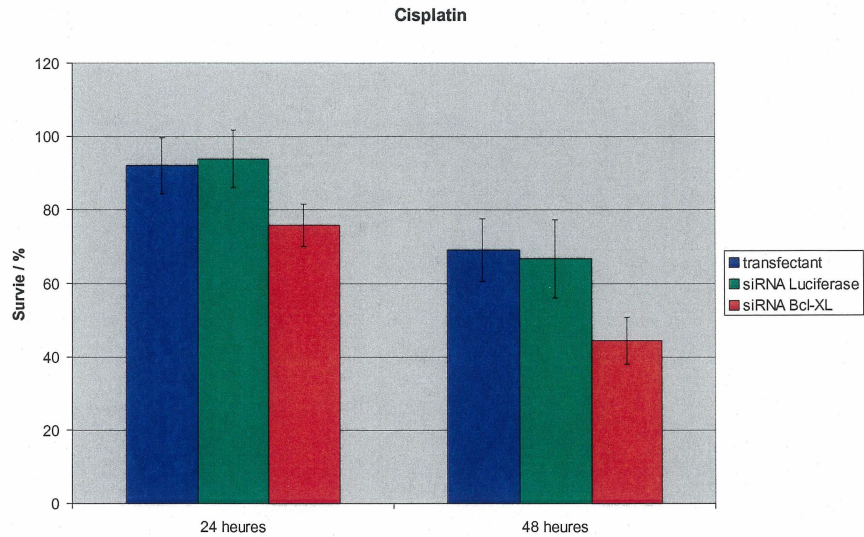
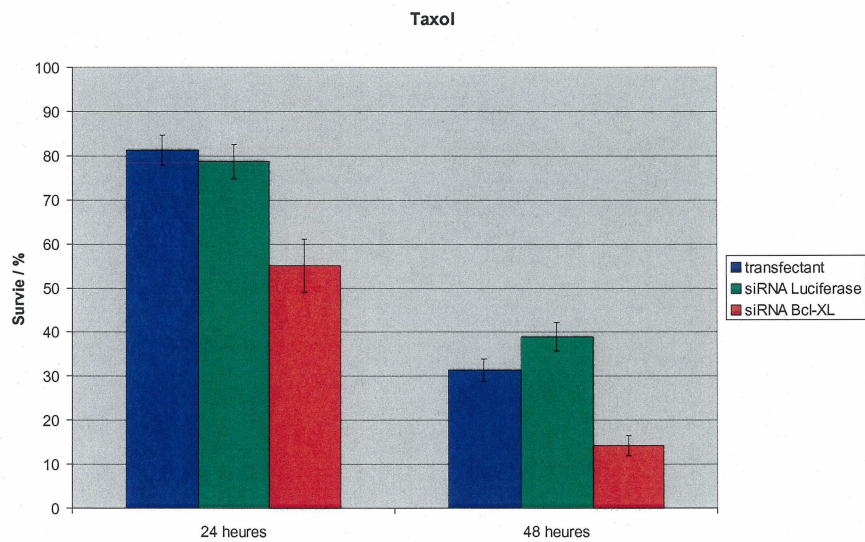
A**B**

Figure 31. Sensibilisation au cisplatine et au taxol mesurée par XTT des cellules OVCAR-3 causée par la perte Bcl-X_L

L'effet de la perte d'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 sur la sensibilité au cisplatine (A) et au taxol (B) des cellules OVCAR-3 a été évalué par un essai de survie XTT. Les traitements de 24 et 48 heures avec le cisplatine (1,25 µg/mL) ou le taxol (500 nM) ont débuté 48 heures après la transfection des cellules. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 10 lectures provenant de deux expériences indépendantes.

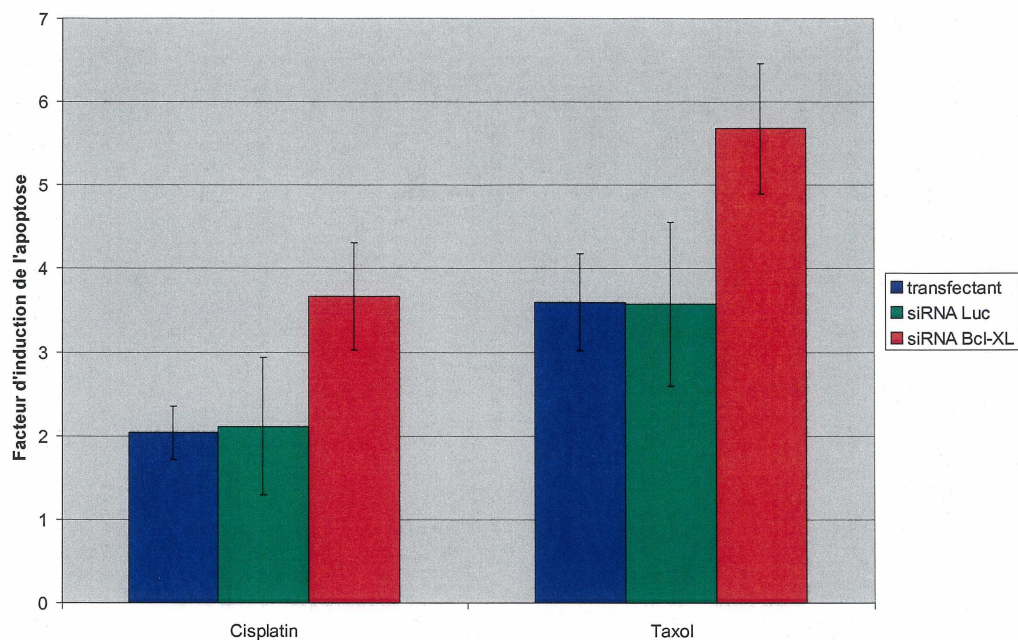


Figure 32. Sensibilisation au cisplatine et au taxol mesurée par ELISA des cellules OVCAR-3 causée par la perte Bcl-X_L

L'effet de la perte d'expression de Bcl-X_L causé par le siRNA #4 sur la sensibilité au cisplatine et au taxol des cellules OVCAR-3 a été évalué par la mesure de l'induction de l'apoptose par l'essai ELISA. Les traitements 48 heures avec le cisplatine (1,25 µg/mL) ou le taxol (500 nM) ont débuté 48 heures après la transfection des cellules. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 4 lectures provenant de deux expériences indépendantes.

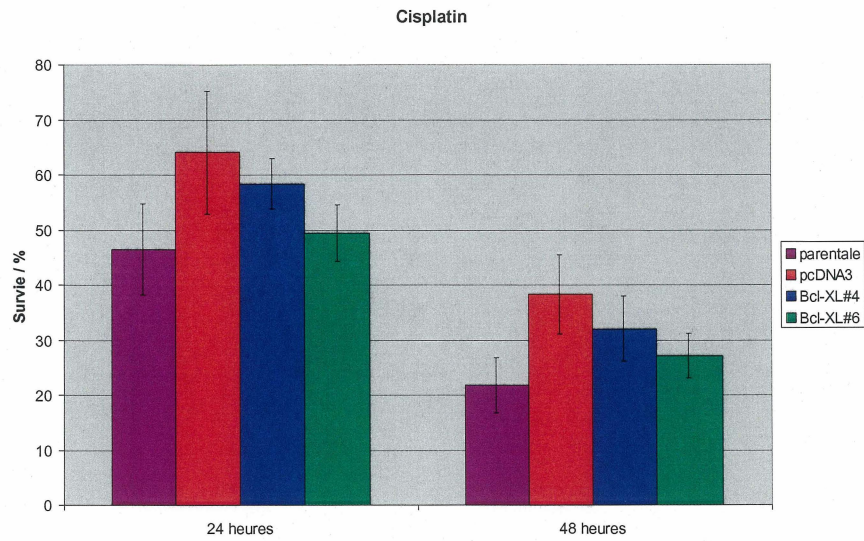
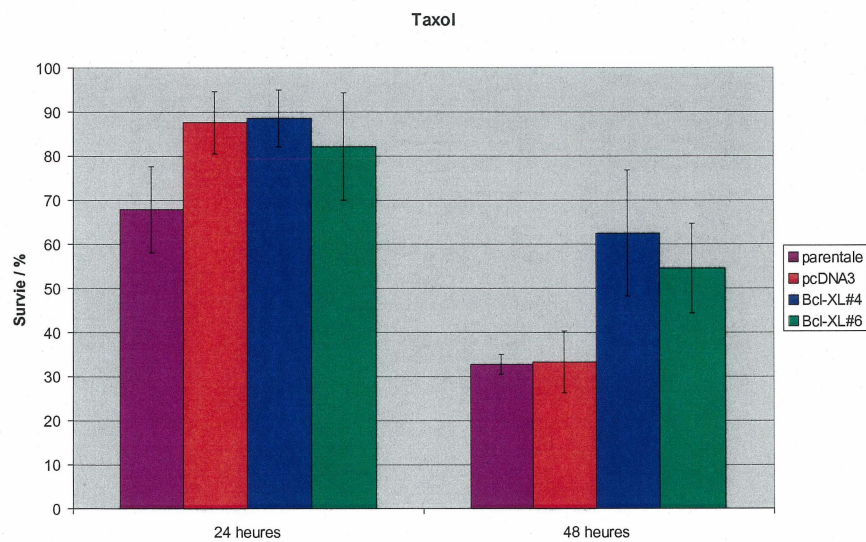
A**B**

Figure 33. Effet de la surexpression de Bcl-X_L sur la sensibilité mesurée par XTT au cisplatine et au taxol des cellules OVCAR-3

L'effet de la surexpression de Bcl-X_L sur la sensibilité au cisplatine (A) et au taxol (B) des cellules OVCAR-3 a été évalué par un essai de survie XTT. Des traitements de 24 et 48 heures avec le cisplatine (5 µg/mL) ou le taxol (500 nM) ont été effectués. Les données sont présentées avec l'écart type obtenu sur les 9 lectures provenant de trois expériences indépendantes.

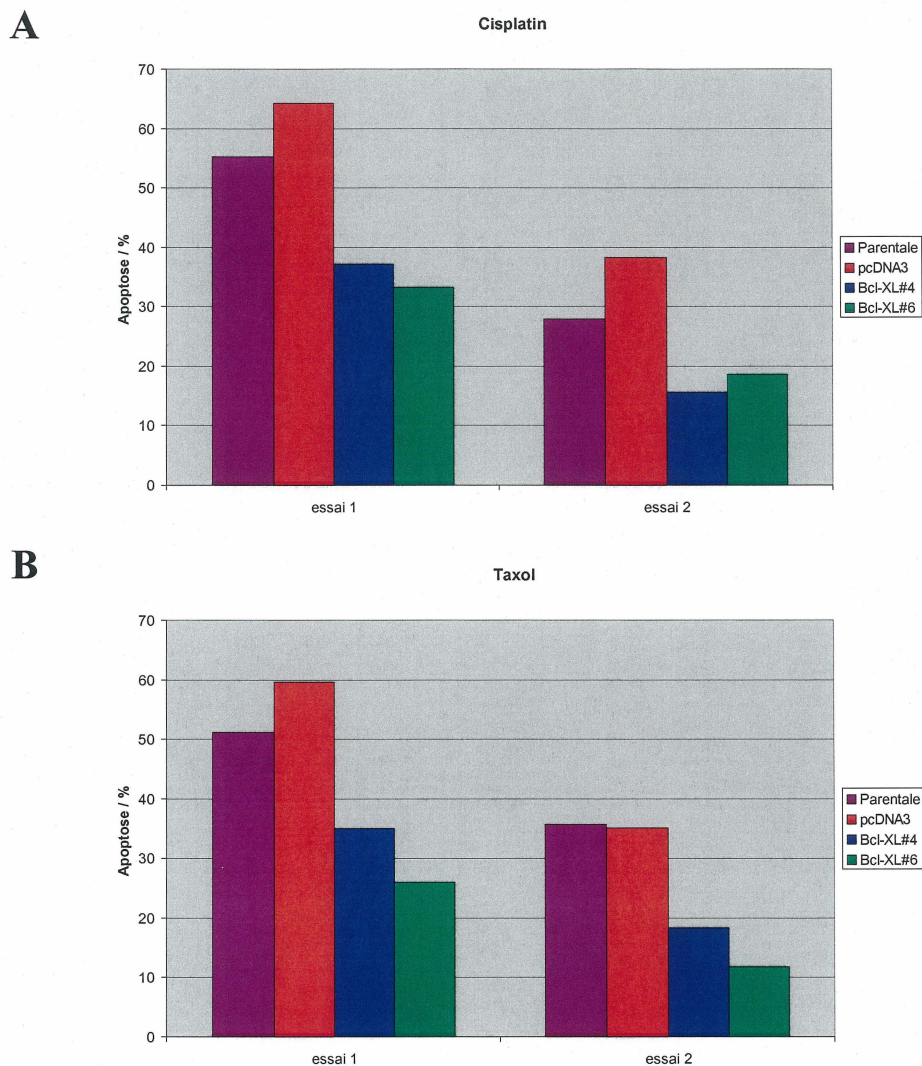


Figure 34. Effet de la surexpression de Bcl-X_L sur la sensibilité au cisplatin et au taxol des cellules OVCAR-3 mesurée par un essai d'iodure de propidium en cytométrie de flux

L'effet de la surexpression de Bcl-X_L sur la sensibilité au cisplatin (A) et au taxol (B) des cellules OVCAR-3 a été évalué par un essai d'iodure de propidium en cytométrie de flux. Des traitements 48 heures avec le cisplatin (5 µg/mL) ou de 72 heures avec le taxol (500 nM) ont été effectués. Les données obtenues en deux expériences indépendantes sont présentées séparément.

DISCUSSION

Les cancers ovariens sont des cancers très létaux et la mortalité qu'ils engendrent est généralement reliée au développement d'une résistance à la chimiothérapie. Malheureusement, les mécanismes moléculaires de cette résistance semblent être multiples et variables mais ils sont peu connus dans ce type de cancer. La protéine Bcl-X_L est connue comme étant un régulateur important de la cascade apoptotique dans la plupart des types cellulaires et est surexprimée dans les cellules de cancers ovariens par rapport aux cellules OSE tel que démontré dans cette étude et par le groupe de MARONE (1998). Cette surexpression suggère que Bcl-X_L serait possiblement important pour les cellules de cancers ovariens. Cependant, dans différentes études sur ce type de cancer, des résultats contradictoires ont été obtenus par rapport à l'importance de la régulation de l'induction de l'apoptose par Bcl-X_L. En effet, certaines études démontrent que Bcl-X_L exerce des fonctions anti-apoptotiques importantes (LIU *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 2005) mais d'autres études associaient aucun rôle anti-apoptotique à la protéine (BEALE *et al.*, 2000; ROY *et al.*, 2000). D'autre part, les travaux de FRANKEL *et al.* (2001) suggèrent que Bcl-X_L exerce un rôle critique dans la résistance à l'anoïkose dans les cancers ovariens. Cependant, cette conclusion découle de résultats obtenus à partir d'une seule lignée cellulaire de cancer ovarien. La présente étude tente donc d'évaluer l'importance de Bcl-X_L pour la survie des cellules de cancer ovarien dans différentes conditions de culture et en réponse aux principaux agents chimiothérapeutiques. Notre hypothèse était donc que Bcl-X_L est fonctionnellement non-équivalent dans les différentes lignées de cellules cancéreuses.

D'abord, nos résultats confirment que Bcl-X_L est surexprimé dans les cellules de cancers ovariens par rapport aux cellules OSE comme le démontraient les travaux de MARONE *et al.* (1998). Selon les données connues sur les différentes lignées utilisées, nous ne sommes malheureusement pas en mesure de proposer un mécanisme général responsable de cette surexpression. La surexpression de Bcl-X_L est donc observée dans toutes les lignées analysées ce qui réitère l'idée que Bcl-X_L exerce un rôle important dans les cellules de cancer ovarien. Pour vérifier cette hypothèse, deux approches ont été utilisées soit la surexpression et l'inhibition de l'expression de Bcl-X_L. Des clones indépendants surexprimant Bcl-X_L ont été produits dans les lignées OVCAR-3 et COV-2 mais les études fonctionnelles ont porté seulement sur les cellules OVCAR-3. L'utilisation de clones stables comporte certains avantages et inconvénients comparativement à l'utilisation d'une population transfectée stablement. D'abord, les clones produits forment une population cellulaire homogène et cette homogénéité facilite l'interprétation des résultats. De plus, la population reste relativement similaire même après plusieurs passages comparativement à une population hétérogène dans laquelle certaines cellules peuvent prendre le dessus par rapport aux autres. Par contre, l'intégration du vecteur dans le génome de la cellule peut affecter l'expression de d'autres gènes selon le site d'intégration et affecter le comportement de la cellule. Il est difficile de discriminer entre l'effet de la surexpression et l'effet non-spécifique causé par le site d'intégration ce qui constitue un désavantage de cette approche. Généralement dans une population stable, seule une fraction de cellules vont posséder un effet non-spécifique donné ce qui rend cet effet négligeable. Cependant, pour minimiser ce

désavantage relié à l'emploi de clones, l'utilisation d'au moins deux clones indépendants, comme nous le faisons dans cette étude, permet de s'assurer que les effets observés sont reliés à la surexpression de la protéine plutôt qu'au site d'intégration du vecteur. À partir de la lignée OVCAR-3, deux clones stables indépendants ont été validés, par rapport à la surexpression et la localisation de Bcl-X_L, et utilisés pour les expériences phénotypiques. Pour la deuxième approche, l'inhibition de l'expression de Bcl-X_L, des siRNA ont été utilisés. D'abord, parmi six siRNA, le siRNA #4 a été sélectionné étant donné qu'il inhibe fortement l'expression de Bcl-X_L et ne semble pas affecter l'expression de Bcl-X_S. Pour cette sélection, nous avons utilisé des siRNA produits à l'aide d'un kit de la compagnie Ambion qui permet leur synthèse via l'utilisation de l'ARN polymérase T7. Malheureusement, ces siRNA semblaient avoir une certaine toxicité séquence-indépendante. De plus, les travaux de KIM *et al.* (2004) ont démontré que les siRNA produits avec l'ARN polymérase T7 induit les interférons α et β ce qui pourrait expliquer la toxicité observée lors de l'utilisation de siRNA d'Ambion. Pour la suite de l'étude, des siRNA sans toxicité intrinsèque et synthétisés chimiquement par la compagnie IDT ont été utilisés.

D'abord, nos résultats démontrent que la perte d'expression de Bcl-X_L affecte fortement la prolifération des cellules CaOV-3 et, plus modestement, celle des cellules SKOV3ip1. De plus, la perte de Bcl-X_L induit l'apoptose dans les trois lignées étudiées, soit les lignées CaOV-3, SKOV3ip1 et les OVCAR-3. De plus, la perte d'expression de Bcl-X_L entraîne très rapidement l'induction de l'apoptose et ainsi une diminution marquée de la prolifération des cellules CaOV-3. Donc, il semblerait que Bcl-X_L soit

particulièrement important pour la survie des cellules CaOV-3. À notre connaissance, ces résultats sont les premiers à démontrer que Bcl-X_L est essentiel à la survie des cellules de cancer ovarien en condition normale de culture. L'utilisation d'un milieu plus riche (en sérum par exemple) diminuerait peut-être l'apoptose induite par la perte de Bcl-X_L mais ce genre d'expérience n'a pas été effectué. Cependant, dans les conditions physiologiques, les cellules cancéreuses sont généralement dans un environnement pauvre et, dans de telles conditions, une forte expression de Bcl-X_L serait donc favorable à leur survie comme le suggèrent nos résultats.

La surexpression de Bcl-X_L diminue la prolifération des cellules OVCAR-3. Cet effet est probablement dû à une inhibition de la progression dans le cycle cellulaire causée par la surexpression de la protéine tel que le suggère les résultats d'une étude récente où l'expression de Bcl-2 a été associée à une diminution de la prolifération et une accumulation des cellules en phase S (BÉLANGER *et al.*, 2005). De plus, il a été observé que la surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-X_L inhibe la progression du cycle cellulaire en phase G1 dans des cellules quiescentes stimulées avec du sérum pour entrer dans le cycle cellulaire (O'REILLY *et al.*, 1996). Les travaux de CRESCENSKI *et al.* (2003) ont démontré que, dans les cellules HEC1B (carcinome endométrial humain), des niveaux élevés de Bcl-2 amène une augmentation de p27^{KIP1}. Cette augmentation de p27^{KIP1} cause l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 via l'inhibition de Cdk2. D'autre part, les travaux de BÉLANGER *et al.* (2005) ont montré que l'inhibition de Bcl-2 entraîne une diminution transitoire de p27^{KIP1} lors de la phase G1 du cycle cellulaire. Un mécanisme

semblable pourrait donc causer la diminution de la prolifération des cellules OVCAR-3 lors de la surexpression de Bcl-X_L.

Par la suite, nous avons évalué l'effet de la perte de Bcl-XL sur la sensibilité à l'anoïkose des cellules de cancer ovarien. Les lignées SKOV3ip1 et OVCAR-3 ont été utilisées lors de ces expériences. D'abord, nous avons démontré que la lignée SKOV3ip1 est sensible à l'anoïkose tandis que la lignée OVCAR-3 est insensible. De plus, la perte de l'expression de Bcl-X_L augmente la sensibilité à l'anoïkose des cellules SKOV3ip1 mais ne rend pas sensibles les cellules OVCAR-3. FRANKEL *et al.* (2001) avait suggéré un rôle critique de Bcl-X_L pour le maintien de la résistance à l'anoïkose des cellules de cancer ovarien malgré que les résultats qu'ils avaient obtenus portent seulement sur une lignée de cancer ovarien. Nos résultats obtenus avec les cellules SKOV3ip1 supportent leur conclusion tandis que ceux obtenus avec la lignée OVCAR-3 l'infirment. Contrairement à ce qui avait été suggéré par FRANKEL *et al.* (2001), il semblerait que le rôle de Bcl-X_L dans la résistance à l'anoïkose ne soit pas critique dans toutes les cellules de cancer ovarien mais seulement dans certaines lignées. L'effet de la surexpression de Bcl-X_L sur la survie en suspension des cellules OVCAR-3 n'a pas été évalué étant donné que ces cellules sont déjà totalement résistantes à l'anoïkose. D'autre part, il pourrait être intéressant d'évaluer l'importance de Bcl-X_L sur la survie en suspension à plus long terme ou sur des cellules isolées.

En première ligne de traitement du cancer ovarien, généralement une combinaison carboplatin/taxol est utilisée. L'effet de la modulation du niveau de Bcl-X_L sur la

résistance à ces agents a donc été évalué. Étant donné leur mode d'action identique, nous avons utilisé le cisplatine plutôt que le carboplatine pour ces expériences. Les concentrations utilisées correspondent à une dose qui amène une survie d'environ 50% à 24 ou 48 heures. D'abord, dans les trois lignées de cancer ovarien étudiées, la survie cellulaire en réponse à l'un ou l'autre de ces agents est diminuée dans les cellules où l'expression de Bcl-X_L est inhibée comparativement aux cellules contrôles. De plus, la perte de Bcl-X_L semble potentialiser davantage l'action du cisplatine que celle du taxol dans les cellules CaOV-3 et SKOV3ip1. Par contre, dans la lignée OVCAR-3, l'action du taxol semble davantage potentialisée comparativement à l'action du cisplatine. Nous avons aussi évalué l'induction de l'apoptose causée par les drogues dans les lignées SKOV3ip1 et OVCAR-3. La perte de Bcl-X_L augmente l'induction de l'apoptose en réponse aux drogues et la potentialisation est plus grande pour le cisplatine que le taxol dans les cellules SKOV3ip1 ce qui corrèle avec les essais de survie. Dans le cas des cellules OVCAR-3, la potentialisation de l'action du cisplatine et du taxol au niveau de l'induction de l'apoptose est similaire malgré qu'elle soit plus importante pour le taxol lorsque la survie est mesurée. L'ensemble de ces résultats démontre que la perte de Bcl-X_L sensibilise les cellules de cancer ovarien au cisplatine et au taxol. D'autre part, la surexpression de Bcl-X_L dans la lignée OVCAR-3 augmente la survie en réponse au taxol mais ne semble pas avoir d'effet sur la survie en réponse au cisplatine. Cependant, la surexpression de Bcl-X_L diminue le pourcentage de cellules apoptotiques en réponse au cisplatine ainsi qu'au taxol. Cette absence de corrélation entre la survie et l'apoptose mesurée en réponse au cisplatine est peut-être due au fait que la prolifération des clones est plus lente que celle des cellules contrôles. L'essai d'iodure de propidium permet de

mesurer par cytométrie de flux le pourcentage exact de cellules apoptotiques tandis que l'essai de survie par XTT est une mesure indirecte du pourcentage de cellules vivantes. L'essai d'iodure de propidium est donc plus fiable dans cette situation. Par conséquent, ces résultats indiquent que la surexpression de Bcl-X_L protège partiellement les cellules OVCAR-3 contre le cisplatine et le taxol. Cependant, ces deux drogues affectent principalement les cellules prolifératives et, étant donné que les clones surexprimant Bcl-X_L prolifèrent moins vite, il n'est pas à exclure que l'effet protecteur de la protéine soit dû à son effet sur la prolifération plutôt qu'à un effet anti-apoptotique sur la cascade apoptotique. D'autre part, les cellules OVCAR-3 expriment déjà très fortement Bcl-X_L et sa surexpression cause des effets protecteurs probablement beaucoup moins importants que si elle aurait été surexprimée dans une lignée qui l'exprime plus faiblement. Il sera donc intéressant d'effectuer les mêmes expériences avec les clones COV-2 qui surexpriment Bcl-X_L pour confirmer les effets de la surexpression et d'autant plus étant donné que les cellules COV-2 parentales ont un niveau basal d'expression de Bcl-X_L inférieur à celui des cellules OVCAR-3. L'ensemble de ces résultats démontrent que la protéine Bcl-X_L module la résistance des cellules de cancer ovarien étudiées au cisplatine et au taxol ce qui correspond aux résultats obtenus par les groupes de LIU *et al.* (1998) et de WILLIAMS *et al.* (2005). Cependant, nos résultats diffèrent de ceux des groupes de BEALE *et al.* (2000) et de ROY *et al.* (2000) qui portaient principalement sur la lignée A2780, et qui n'observaient pas d'effet protecteur de Bcl-X_L face à différents agents chimiothérapeutiques tel le cisplatine. Ces différences suggèrent que la protection de Bcl-X_L contre les agents chimiothérapeutiques serait lignée spécifique. Cependant, dans la

plupart des lignées, cette protéine exerce une protection contre les différents agents et l'absence d'effet protecteur est plutôt rare.

Même si Bcl-X_L exerce des fonctions protectrices contre le cisplatine et le taxol, il est fort probable que d'autres facteurs participent à la résistance clinique à la chimiothérapie. En effet, l'inhibition de l'expression et la surexpression d'une multitude de protéines permettent de moduler la résistance aux différents agents chimiothérapeutiques. Selon nous, la résistance à l'ensemble des agents chimiothérapeutiques serait causée par un ensemble d'altérations moléculaires et non pas une seule. De plus, ces altérations variables dans les différentes cellules de cancer ovarien expliquent probablement le fait que Bcl-X_L est fonctionnellement non-équivalent dans les différentes lignées étudiées.

Notre étude démontre que, dans les cancers ovariens, la protéine Bcl-X_L est importante pour la survie et qu'elle protège partiellement ces cellules contre l'action du cisplatine et du taxol. De plus, Bcl-X_L exerce un effet protecteur contre l'induction de l'anoïkose mais cet effet semble lignée spécifique. L'ensemble de ces résultats inculque un rôle important de Bcl-X_L sur la survie des cellules de cancer ovarien. Cependant, dans un contexte clinique, inhiber l'expression de cette protéine dans les cellules de cancer ovarien risque fort de produire des effets variables en raison du rôle fonctionnel très variable de Bcl-X_L dans les différentes cellules.

CONCLUSION

La protéine Bcl-X_L est un important régulateur négatif de l'apoptose qui participe à la résistance à différents stimuli apoptotiques dans la plupart des types cellulaires. Malgré que cette protéine soit surexprimé dans les cancers ovariens, ce que nous avons reconfirmé, son importance sur la résistance à différents stimuli apoptotiques dans ce type de cancer est controversée. Notre étude a donc pour but de clarifier l'effet de la protéine Bcl-X_L sur la survie des cellules de cancers ovariens et elle a permis de mettre en évidence des rôles importants de cette protéine à différents niveaux. Pour ce faire, nous avons modulé le niveau d'expression de la protéine dans différentes lignées de cancer ovarien via l'utilisation d'un siRNA et d'un vecteur de surexpression.

D'abord, la protéine Bcl-X_L semble importante pour la survie de la plupart des cellules de cancers ovariens dans des conditions normales de culture. De plus, elle participe à la résistance au cisplatine et au taxol dans toutes les lignées étudiées. Il semblerait que l'absence de protection contre les agents chimiothérapeutiques observée par d'autres groupes soit plutôt exceptionnelle. Finalement, de façon lignée-spécifique, elle protège des cellules de cancer ovarien contre l'anoïkose. Donc, Bcl-X_L favorise la survie des cellules de cancer ovarien de différentes façons et une forte expression de cette protéine dans ces cellules favorise donc leur survie dans des conditions sous optimales de culture, leur dissémination et la résistance aux traitements de chimiothérapie. Ce n'est donc pas surprenant de constater que Bcl-X_L est surexprimé dans les cellules de cancer ovarien. Finalement, nous avons observé que la surexpression de Bcl-X_L inhibe la

prolifération des cellules OVCAR-3. Nous supposons que Bcl-X_L inhibe le cycle cellulaire. Par contre, cet effet sur le cycle cellulaire et le mécanisme de cette inhibition devront être étudiés plus en détails.

En perspective, il sera intéressant d'évaluer le rôle de Bcl-X_L sur la résistance à d'autres stimuli apoptotiques et plus particulièrement à des stimuli apoptotiques qui induisent l'apoptose par la voie extrinsèque, tel le TRAIL, contrairement aux stimuli étudiés dans cette étude qui agissaient via la voie intrinsèque. De plus, il sera intéressant d'évaluer le rôle de cette protéine sur la résistance à l'anoïkose à long terme et en condition où les cellules sont isolées. Aussi, l'effet de la surexpression de Bcl-X_L dans d'autres lignées sera évalué. Étant donné que nous avons déjà produit des clones surexprimant Bcl-X_L dans la lignée COV-2, l'effet de cette surexpression pourra être évalué rapidement dans cette lignée. Finalement, comme il a été mentionné, l'effet de Bcl-X_L sur le cycle cellulaire sera étudié.

REMERCIEMENTS

D'abord, je tiens à remercier Alain Piché, mon directeur de recherche, pour m'avoir accepté dans son laboratoire, pour m'avoir permis d'étudier sur l'apoptose, un sujet qui me passionne, et pour m'avoir fait confiance tout au long de ma maîtrise. De plus, je veux remercier Claudine Rancourt pour ses nombreux conseils et commentaires constructifs sur le projet et pour m'avoir encouragé à faire des présentations orales ce qui m'a énormément aidé à vaincre cette phobie.

Je voudrais remercier tous les membres actuels et anciens du laboratoire pour les belles années que j'ai passées avec eux. De plus, j'estime avoir changé et progressé énormément au cours de ma maîtrise (pas seulement au niveau scientifique) et c'est en bonne partie grâce à tout les gens, étudiants, stagiaires, techniciens, assistant de recherche, patrons et amis, que j'ai côtoyé pendant les deux dernières années et demie. Je veux aussi remercier particulièrement Maxime Pinard, Sylvain L'Espérance, Michel Paquette, Maxime Tremblay et Geneviève Levasseur qui sont tous devenus mes bons amis lors de mon passage sur le département et qui rendaient la plupart de mes journées de travail plus agréables et plus motivantes.

Finalement, je tiens à remercier mes parents et particulièrement ma mère Pauline qui m'a toujours encouragé à étudier et aussi pour son support moral et financier.

RÉFÉRENCES

Ahn HJ, Kim YS, Kim JU, Han SM, Shin JW et Yang HO. Mechanism of taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian carcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004;91(5):1043-1052.

Ambrosini G, Adida C et Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine* 1997;3(8):917-921.

Attwell S, Roskelley C et Dedhar S. The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene*. 2000;19(33):3811-3815.

Baird RD et Kaye SB. Drug resistance reversal--are we getting closer? *European Journal of Cancer* 2003;39(17):2450-2461.

Ban J, Eckhart L, Weninger W, Mildner M et Tschachler E. Identification of a human cDNA encoding a novel Bcl-x isoform. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;248(1):147-152.

Beale PJ, Rogers P, Boxall F, Sharp SY et Kelland LR. BCL-2 family protein expression and platinum drug resistance in ovarian carcinoma. *British Journal of Cancer*

2000;82(2):436-440.

Bélangier S, Côté M, Lane D, L'esperance S, Rancourt C et Piché A. Bcl-2 decreases cell proliferation and promotes accumulation of cells in S phase without affecting the rate of apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* 2005;97(3):796-806.

Benedet JL. Progress in gynecologic cancer detection and treatment. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2000;70(1):135-147.

Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G et Thompson CB. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74(4):597-608.

Boudreau N, Sympton CJ, Werb Z et Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995;267(5199):891-893.

Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* 2002;109(4):437-442.

Burgoyne LA, Hewish DR et Mobbs J. Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochemical Journal* 1974;143(1):67-72.

Chao DT et Korsmeyer SJ. BCL-XL-regulated apoptosis in T cell development. *International Immunology* 1997;9(9):1375-1384.

Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burridge K et Juliano RL. Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269(43):26602-26605.

Coll ML, Rosen K, Ladeda V et Filmus J. Increased Bcl-xL expression mediates v-Src-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2002;21(18):2908-2913.

Coultas L et Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2003;13(2):115-123.

Cory S et Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2002;2(9):647-656.

Cory S, Huang DC et Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590-8607.

Cramer DW et Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 1983;71(4):717-721.

Cregan SP, Arbour NA, Maclaurin JG, Callaghan SM, Fortin A, Cheung EC, Guberman DS, Park DS et Slack RS. p53 activation domain 1 is essential for PUMA upregulation and p53-mediated neuronal cell death. *The journal of Neuroscience* 2004;24(44):10003-10012.

Crescenzi E, Palumbo G et Brady HJ. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochemical Journal* 2003;375(Pt 2):263-274.

Crul M, van Waardenburg RC, Beijnen JH et Schellens JH. DNA-based drug interactions of cisplatin. *Cancer Treatment Reviews* 2002;28(6):291-303.

Day CL, Puthalakath H, Skea G, Strasser A, Barsukov I, Lian LY, Huang DC et Hinds MG. Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. *Biochemical Journal* 2004;377(3):597-605.

Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J et Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998;95(19):11211-11216.

Donovan M et Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1644(2-3):133-

147.

Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM et Thompson CB. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *The EMBO Journal* 1996;15(11):2685-2694.

Earnshaw WC, Martins LM et Kaufmann SH. Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions during Apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 1999;68:383-424.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K et Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411(6836):494-498.

Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971;2(7716):163.

Feeley KM et Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* 2001;38(2):87-95.

Figuroa B Jr, Chen S, Oyler GA, Hardwick JM et Betenbaugh MJ. Aven and Bcl-xL enhance protection against apoptosis for mammalian cells exposed to various culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 2004;85(6):589-600.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE et Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806-811.

Fischer U, Jänicke RU et Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* 2003;10:76-100.

Frankel A, Rosen K, Filmus J et Kerbel RS. Induction of anoikis and suppression of human ovarian tumor growth in vivo by down-regulation of Bcl-X(L). *Cancer Research* 2001;61(12):4837-4841.

Frisch SM. Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis. *Current Biology* 1999;9(18):1047-1049.

Frisch SM et Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology* 1994;124(4):619-626.

Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E et Chan-Hui PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *Journal of Cell Biology* 1996;134(3):793-799.

Gajate C, Barasoain I, Andreu JM et Mollinedo F. Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-X(L) and cell cycle arrest. *Cancer Research* 2000;60(10):2651-2659.

Gonzalez-Garcia M, Garcia I, Ding L, O'Shea S, Boise LH, Thompson CB et Nunez G. bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1995;92(10):4304-4308.

Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 2002;7(3):247-260.

Guensberg P, Wacheck V, Lucas T, Monia B, Pehamberger H, Eichler HG et Jansen B. Bcl-xL antisense oligonucleotides chemosensitize human glioblastoma cells. *Chemotherapy* 2002;48(4):189-195.

Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L et Chittenden T. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2001;98(20):11318-11323.

Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418(6894):244-251.

Hannon GJ et Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004;431(7006):371-378.

Hon H, Rucker EB 3rd, Hennighausen L et Jacob J. bcl-xL is critical for dendritic cell survival in vivo. *The Journal of Immunology* 2004;173(7):4425-4432.

Kaufmann SH et Earnshaw WC. Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. *Experimental Cell Research* 2000;256:42-49.

Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH et Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *The EMBO Journal* 1997;16(10):2783-2793.

Kim DH, Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E et Rossi JJ. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nature Biotechnology* 2004;22(3):321-325.

Kirkin V, Joos S et Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1644(2-3):229-249.

Lane D, Cartier A, L'Esperance S, Cote M, Rancourt C et Piche A. Differential induction of apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human ovarian carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* 2004;93(3):594-604.

Lebedeva I, Rando R, Ojwang J, Cossum P et Stein CA. Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Research* 2000;60(21):6052-6060.

Leech SH, Olie RA, Gautschi O, Simoes-Wust AP, Tschopp S, Haner R, Hall J, Stahel RA et Zangemeister-Wittke U. Induction of apoptosis in lung-cancer cells following bcl-xL anti-sense treatment. *International Journal of Cancer* 2000;86(4):570-576.

Liston P, Fong WG et Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 2003;22(53):8568-8580.

Liu F, He CW, Zhang YF et Zhou KY. RNA interference by expression of short hairpin RNAs suppresses bcl-xL gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005;26(2):228-234.

Liu JR, Fletcher B, Page C, Hu C, Nunez G et Baker V. Bcl-xL is expressed in ovarian carcinoma and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Gynecologic Oncology* 1998;70(3):398-403.

Marone M, Scambia G, Mozzetti S, Ferrandina G, Iacovella S, De Pasqua A, Benedetti-Panici P et Mancuso S. bcl-2, bax, bcl-XL, and bcl-XS expression in normal and neoplastic ovarian tissues. *Clinical Cancer Research* 1998;4(2):517-524.

Meredith JE Jr, Fazeli B et Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Molecular Biology of the Cell* 1993;4(9):953-961.

Minn AJ, Rudin CM, Boise LH et Thompson CB. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995;86(5):1903-1910.

Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK et Yamada KM. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *Journal of Cell Biology* 1995;131(3):791-805.

Moss C et Kaye SB. Ovarian cancer: progress and continuing controversies in management. *European Journal of Cancer* 2002;38(13):1701-1707.

Ness RB et Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1999;91(17):1459-1467.

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T et Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000;288(5468):1053-1058.

O'Reilly LA, Huang DC et Strasser A. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *The EMBO Journal* 1996;15(24):6979-6990.

Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H et Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003;22(47):7280-7295.

Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, Daly MB, Godwin AK, Schilder RJ, Xu X et Hamilton TC. Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell* 2004;5(1):19-24.

Ozols RF. Ovarian Cancer. *American Cancer Society* 2003:101-131.

Özören N et El-Deiry WS. Cell surface Death signaling in normal and cancer cells. *Seminars in Cancer Biology* 2003;13:135-147.

Ozvaran MK, Cao XX, Miller SD, Monia BA, Hong WK et Smythe WR. Antisense oligonucleotides directed at the bcl-xl gene product augment chemotherapy response in mesothelioma. *Molecular Cancer Therapeutics* 2004;3(5):545-550.

Paddison PJ, Caudy AA, Sachidanandam R et Hannon GJ. Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *Methods in Molecular Biology* 2004;265:85-100.

Pegoraro L, Palumbo A, Erikson J, Falda M, Giovanazzo B, Emanuel BS, Rovera G, Nowell PC et Croce CM. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1984;81(22): 7166–7170.

Petros AM, Olejniczak ET et Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1644(2-3):83-94.

Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM et Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular Cell* 1999;3(3):287-296.

Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC et Strasser A. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 2001;293(5536):1829-1832.

Ranger AM, Malynn BA et Korsmeyer SJ. Mouse models of cell death. *Nature Genetics* 2001;28(2):113-118.

Regula KM, Ens K et Kirshenbaum LA. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2003;35:559-567.

Rogers PM, Beale PJ, Al-Moundhri M, Boxall F, Patterson L, Valenti M, Raynaud F, Hobbs S, Johnston S et Kelland LR. Overexpression of BclXL in a human ovarian carcinoma cell line: paradoxical effects on chemosensitivity in vitro versus in vivo. *International Journal of Cancer* 2002;97(6):858-863.

Rosen K, Coll ML, Li A et Filmus J. Transforming growth factor-alpha prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(40):37273-37279.

Roy G, Horton JK, Roy R, Denning T, Mitra S et Boldogh I. Acquired alkylating drug resistance of a human ovarian carcinoma cell line is unaffected by altered levels of pro- and anti-apoptotic proteins. *Oncogene* 2000;19(1):141-150.

Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS et Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *The EMBO Journal* 1997;16(23):6914-6925.

Rudner J, Jendrossek V, Lauber K, Daniel PT, Wesselborg S et Belka C. Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies. *Oncogene* 2005;24(1):130-140.

Rytomaa M, Lehmann K et Downward J. Matrix detachment induces caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria: inhibition by PKB/Akt but not Raf signalling. *Oncogene* 2000;19(39):4461-4468.

Rytomaa M, Martins LM et Downward J. Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis. *Current Biology* 1999;9(18):1043-1046.

Schmitt E, Cimoli G, Steyaert A et Bertrand R. Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities. *Experimental Cell Research* 1998;240(1):107-121.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7265-7279.

Sorger PK, Dobles M, Tournebize R et Hyman AA. Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* 1997;9(6):807-814.

Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1644(2-3):169-177.

Smythe WR, Mohuiddin I, Ozveran M et Cao XX. Antisense therapy for malignant mesothelioma with oligonucleotides targeting the bcl-xl gene product. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2002;123(6):1191-1198.

Strater J, Wedding U, Barth TF, Koretz K, Elsing C et Moller P. Rapid onset of apoptosis in vitro follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. *Gastroenterology* 1996;110(6):1776-1784.

Stuart GC. First-line treatment regimens and the role of consolidation therapy in advanced ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2003;90(3 Pt 2):S8-15.

Stupack DG et Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *Journal of Cell Science* 2002;115(19):3729-3738.

Taylor JK, Zhang QQ, Monia BP, Marcusson EG et Dean NM. Inhibition of Bcl-xL expression sensitizes normal human keratinocytes and epithelial cells to apoptotic stimuli. *Oncogene* 1999;18(31):4495-4504.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267(5203):1456-1462.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E et Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*. 1985;228(4706):1440-1443.

Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL et Vaux DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor

necrosis factor receptor-associated factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1996;93(10):4974-4978.

Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM et Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003;302(5647):1036-1038.

Wang TH, Wang HS et Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000;88(11):2619-2628.

Williams BR. Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochemical Society Transactions* 1997;25(2):509-513.

Williams J, Lucas PC, Griffith KA, Choi M, Fogoros S, Hu YY et Liu JR. Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecologic Oncology* 2005;96(2):287-295.

Willingham MC. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1999;47:1101-1109.

Wu YJ, Muldoon LL et Neuwelt EA. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *The Journal Pharmacology Experimental Therapeutics* 2005;312(2):424-431.

Yakovlev AG, Di Giovanni S, Wang G, Liu W, Stoica B et Faden AI. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *The Journal Biological Chemistry* 2004;279(27):28367-28374.

Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhara Y, Kaneki M, Rosenzweig A et Martyn JA. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2003;51(7):873-885.

Xu L, Koumenis IL, Tilly JL et Giffard RG. Overexpression of bcl-xL protects astrocytes from glucose deprivation and is associated with higher glutathione, ferritin, and iron levels. *Anesthesiology* 1999;91(4):1036-1046.

Zhang H, Taylor J, Luther D, Johnston J, Murray S, Wyatt JR, Watt AT, Koo S, York-DeFalco C, Stecker K et Dean NM. Antisense oligonucleotide inhibition of Bcl-xL and Bid expression in liver regulates responses in a mouse model of Fas-induced fulminant hepatitis. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2003;307(1):24-33.

Zhang Z, Vuori K, Reed JC et Ruoslahti E. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1995;92(13):6161-6165.

Zhivotovsky B et Orrenius S. Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. *Seminars in Cancer Biology* 2003;13:125-134.